

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR**

**Modulação dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico na
secreção hipotalâmica de ocitocina sob condições
hiperosmóticas.**

Alan Barroso Araújo Grisólia

**Belém
2014**

Alan Barroso Araújo Grisólia

**Modulação dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico na
secreção hipotalâmica de ocitocina sob condições
hiperosmóticas.**

Tese de doutorado apresentado ao Programa de pós-graduação em Neurociências e Biologia celular da Universidade Federal do Pará, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Neurociências e Biologia celular, área de concentração Neurociência.

Orientador: Prof. Dr. Domingos Luiz Wanderley Picanço Diniz

Co-Orientador: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva

**Belém
2014**

Alan Barroso Araújo Grisólia

**Modulação dos sistemas GABAérgico e glutamatérgico na
secreção hipotalâmica de ocitocina sob condições
hiperosmóticas.**

Instituto de Ciências Biológicas – UFPA

Banca Examinadora:

Presidência da banca: Prof. Dr. Anderson Manoel Herculado (UFPA)

Profa. Dra. Karen Renata Oliveira
Instituição UFPA

Profa. Dra. Patrícia Neiva Coelho Schneider
Instituição UFPA

Profa. Dra. Marta Chagas Monteiro
Instituição UFPA

**Belém
2014**

Dedicado à **Julia Barroso Araújo**

Agradecimentos

À Universidade Federal do Pará pela oportunidade no desenvolvimento da minha carreira científica, e especialmente ao Laboratório de Neuroendocrinologia, onde foram planejados e executados todos os experimentos do presente estudo.

À Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular e seus professores que participaram direta ou indiretamente no meu aprendizado.

Ao meu orientador Prof. Dr. Domingos Diniz por me apresentar o hipotálamo e permitir liberdade de escolha no direcionamento de nosso estudo.

Aos meus amigos Prof. Dr. Anderson Herculano e sua esposa Prof^a Dra. Karen Renata Oliveira, pelo apoio, paciência e aprendizado durante os últimos anos no LNE. E com certeza, foi uma convivência produtiva, de grande evolução profissional para o resto de minha vida.

À minha família, minha vovó Ângela, meu irmão Paulo e minha mãe Júlia, principal responsável por minhas conquistas na vida.

À minha esposa Daniella Paternostro de Araújo Grisólia, por seu amor, carinho, apoio e companheirismo em todos os momentos, e nossa filha Lívia Paternostro de Araújo Grisólia, quem me apresentou o amor incondicional.

Aos companheiros e amigos de LNE, foram longas jornadas de trabalho, conversas científicas e também “descontração”. Incluindo todos, dos mais recentes até os mais antigos. E também nosso Prof. Dr. Evander Batista, sempre prestativo e acessível em ajudar os alunos no cotidiano do LNE.

Aos órgãos de fomento, pelo auxílio financeiro.

A todos, meu muito obrigado.

Toda a nossa ciência, comparada com a realidade, É primitiva e infantil não é, no entanto, É a coisa mais preciosa que temos.

Albert Einstein (1879-1955)

RESUMO

Em mamíferos, a osmolalidade do fluído extracelular é o parâmetro mais importante na manutenção do balanço hidroeletrólítico. Deste modo, variações de osmolalidade são detectadas por células hipotalâmicas especializadas, iniciando assim uma sinalização neuroquímica, com envolvimento dos sistemas glutamatergicos e GABAérgico, a qual pode desencadear a secreção da ocitocina. Entretanto, o modo como a relação dos aminoácidos GABA e glutamato pode modular a liberação de ocitocina durante a hiperosmolalidade ainda é pouco compreendida. Neste contexto, o objetivo do presente estudo foi caracterizar o efeito do meio hipertônico sobre os níveis extracelulares de GABA e glutamato e sua relação com a liberação de ocitocina em preparações de hipotálamo *in vitro*. Para tal, Ratos Wistar Machos (270-300g) foram mantidos em condições padrões de laboratório. E após decapitação o cérebro foi retirado rapidamente, os fragmentos hipotalâmicos foram imediatamente dissecados em Krebs Ringer Bicarbonato Glicose gelado (KRBG) e colocados no sistema de perinfusão com solução de KRBG isotônica (280 mOsm/Kg H₂O) fluxo de 0.5-1.0 ml/min, foram feitas as coletas a cada minuto durante 15 min. O estímulo hipertônico (340 mOsm/Kg H₂O) ocorreu por 3 minutos. As dosagens de glutamato, GABA e ocitocina foram efetuadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC). As dosagens de glutamato mostraram um aumento da liberação somente após a diminuição da concentração de GABA. Este padrão de liberação temporal motivou-nos a adicionar GABA (3 µM) durante o estímulo osmótico, resultando no bloqueio da liberação de glutamato anteriormente observada. Além disso, os resultados mostraram que a liberação de ocitocina estimulada por solução de NaCl hipertônica pode depender também de uma diminuição da liberação de GABA. O presente estudo sugere que a liberação de ocitocina estimulada por hipertonidade depende de alteração da relação GABA/glutamato.

Palavra chave: Glutamato, GABA, hiperosmolalidade, Ocitocina, hipotálamo

ABSTRACT

In mammals, the osmolality of extracellular fluid is a main factor for maintenance hydro electrolyte balance. Thus, changes in osmolality are detected by specialized hypothalamic cell, thereby starting a neurochemical signaling with glutamatergic and GABAergic system involvement, which may trigger the oxytocin release. However, the way of GABA glutamate aminoacids relationship could modulate the oxytocin release under hyperosmolality is till poorly understood. In this context, the aim in present study was characterize the hypertonic medium effect in GABA glutamate extracellular levels and its relationship with oxytocin release in the hypothalamus *in vitro*. For this, male wistar rats (270-300g) were kept under standard laboratory conditions. After decapitation, the brain was quickly removed and the hypothalamic fragments were immediately dissected in cold Krebs Ringer Bicarbonate Glucose Buffer (KRBG), and were transferred to perfusion chambers containing KRBG isotonic (280 mOsm/Kg H₂O), at flow rate of 0.5-1.0 ml/min, medium effluent was collected every during 15 min. The hypertonic stimulation (340 mOsm/kg H₂O) was performed during 3 minutes. Glutamate, GABA and oxytocin levels were determined by reverse phase high-performance liquid chromatograph (HPLC) system. The measurements of glutamate showed an increased release only after decrease in GABA concentration. This release temporal profile motivated us to add GABA (3 mM) during osmotic stimulation, resulting in blockage of glutamate release previously observed. Moreover the results showed oxytocin release by hypertonic solution may also depend on a GABA decrease. The present study suggests that oxytocin release stimulated by hypertonicity depends on altering the relationship GABA / glutamate.

Keyword: Glutamate: Glutamate, GABA, Hyperosmolality, Oxytocin, Hypothalamus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Respostas homeostáticas a variação de osmolalidade	14
Figura 2- Localização dos órgãos circumventriculares	15
Figura 3: Complexo osmorreceptor central	16
Figura 4: Esquema didático do sistema de perinfusão	28
Figura 5: Esquema didático do sistema de CLAE	29
Figura 6: Fluxograma do procedimento de preparação das amostras	34
Figura 7: Efeito do meio hipertônico sobre os níveis de GABA	36
Figura 8: Efeito do meio hipertônico sobre os níveis de glutamato	37
Figura 9: Efeito do meio hipertônico sobre os níveis de glutamato e GABA	38
Figura 10: Efeito do GABA sobre a elevação dos níveis de glutamato induzido por hiperosmolalidade	40
Figura 11: Efeito do meio hipertônico sobre a liberação de ocitocina	41
Figura 12: Efeito do glutamato sobre a liberação de ocitocina	42
Figura 13: Efeito do GABA sobre aumento da liberação de ocitocina	44
Figura 14: Efeito do muscimol sobre a elevação dos níveis de glutamato induzido por hiperosmolalidade	46
Figura 15: Efeito do blacofeno sobre a elevação dos níveis de glutamato induzido por hiperosmolalidade	48
Figura 16: Efeito do muscimol sobre o aumento da liberação de ocitocina induzido por hiperosmolalidade	50
Figura 17: Efeito do blacofeno sobre o aumento da liberação de ocitocina induzido por hiperosmolalidade	52
Figura 18: Eventos neuroquímicos desencadeados pela hipertonidade	66
Figura 19: Cromatograma padrão	80

Figura 20: Linearidade do glutamato	81
Figura 21: Linearidade do GABA	81
Figura 22: Curva de calibração do glutamato	83
Figura 23: Curva de calibração do GABA	84
Figura 24: Cromatograma padrão mostrando o tempo de retenção da ocitocina	87
Figura 25: Linearidade da ocitocina	88
Figura 26: Curva de calibração da ocitocina	89

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Fase móvel com gradiente para quantificação de aminoácidos	31
Tabela 2: Resumo das condições cromatográficas para dosagem de aminoácidos	31
Tabela 3: Resumo das condições cromatográficas para dosagem de ocitocina	33
Tabela 4: Efeito dos agonistas GABA _A e GABA _B sobre os níveis basais de glutamato	53
Tabela 5: Resultados de exatidão e precisão do glutamato e GABA	85
Tabela 6: Resultados de recuperação do glutamato e GABA	86
Tabela 7: Resultados de estabilidade do glutamato e GABA	86
Tabela 8: Resultados de exatidão e precisão da dosagem de ocitocina	90

LISTA DE ABREVIATURAS

AMPA-	alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico
AV3V-	região anteroventral do terceiro ventrículo
AVP-	argenina vasopressina
BSA-	Albumina sérica bovina
°C-	Graus Celcius
CLAE-	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
c-fos-	Feline osteosarcoma
CV-	Coeficiente de variação
E.P.M-	Erro padrão da média
GABA-	ácido gama aminobutírico
KRGB-	Krebs-Ringer Bicarbonato-Glicose
LD-	Limite de detecção
LQ-	Limite de detecção
mGluRs-	receptores metabotrópicos de glutamato
MNCs-	neurônios magnocelulares
MnPO-	núcleo mediano preóptico
NMDA-	N-metil D-aspartato
PVN-	núcleo paraventricular
SON-	núcleo supraóptico
OCVs-	órgãos circunventriculares
OPA-	o-phytaldehyde
OT-	ocitocina
OVLt-	órgão vascular da lamina terminal
RPM-	Rotações por minuto
SHN-	sistema hipotálamo-neurohipofisário
SFO-	órgão subfornical
SNC-	sistema nervoso central
TCA-	ácido tricloroacético

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	
1.1 As bases fisiológicas do controle neuroendócrino da homeostase dos fluidos corporais.	13
1.2 Papel dos sistemas GABAérgico e Glutamatérgico na fisiologia hipotalâmica	13
1.3 Papel da ocitocina no balanço hídrico e sua relação com os neurotransmissores glutamato e GABA	21
2 OBJETIVO	25
2.1 Geral	25
2.2 Específicos	25
3.METODOLOGIA	26
3.1 Aspectos éticos	26
3.2 Animais Experimentais	26
3.3 Explante hipotalâmico e sistema de perinfusão <i>in vitro</i>	26
3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	29
3.4.1 <i>Equipamentos cromatográficos</i>	29
3.4.2 <i>Reagentes e padrões</i>	30
3.4.3 <i>Condições cromatográficas para quantificação de aminoácidos</i>	30
3.4.4 <i>Procedimento de derivatização de aminoácidos</i>	32
3.4.5 <i>Condições cromatográficas para quantificação de ocitocina</i>	32
3.4.6 <i>Preparação das amostras</i>	33
3.5 Dosagem de proteína	35
3.6 Análise estatística	35
4.RESULTADOS	36
5.DISSCUSSÃO	54
6. REFERÊNCIAS	67
7. ANEXOS	77

1. INTRODUÇÃO

1.1 As bases fisiológicas do controle neuroendócrino da homeostase dos fluidos corporais.

Nas últimas décadas, vários estudos foram realizados para identificar os mecanismos e as áreas cerebrais envolvidas na regulação do volume e osmolalidade dos compartimentos corporais. Em mamíferos esses parâmetros são mantidos por uma complexa interação que envolve mecanismos neuroendócrinos, autonômicos, hemodinâmicos, renal e comportamental. Assim, variações no volume e osmolalidade tornam-se importantes estímulos para desencadear respostas adaptativas, sendo que a osmolalidade (normalmente na faixa de 280 a 295 mOsm/kg H₂O) é considerada o mais eficiente e sensível fator capaz de ativar mecanismos compensatórios. De fato, variações na ordem de 1-2% são o suficiente para desencadear essas respostas (Mark *et al.*, 2012; Fitzsimons, 1998), que em linhas gerais buscam manter a osmolalidade mais próxima do ideal (Figura 1) (Bourque *et al.*, 1994).

Os primeiros estudos anatômicos apontaram para o hipotálamo como órgão central responsável por essa regulação (Grossan, 1969), onde ocorre ativação de estruturas que são capazes de detectar as variações na osmolalidade, resultando no recrutamento de vários mediadores químicos, tais como; angiotensina II (Stancheva *et al.*, 2009), serotonina (Margatho *et al.*, 2002), óxido nítrico (Gomes *et al.*, 2010), adenosina (Menezes *et al.*, 2011), neuro-peptídeos vasopressina e ocitocina (Brennan *et al.*, 1984; Balment *et al.*, 1980), e também os dois principais neurotransmissores excitatório e inibitório do

sistema nervoso central (SNC), glutamato e ácido gama aminobutírico (GABA) respectivamente (Grossan., 1969; Li *et al.*, 2005).

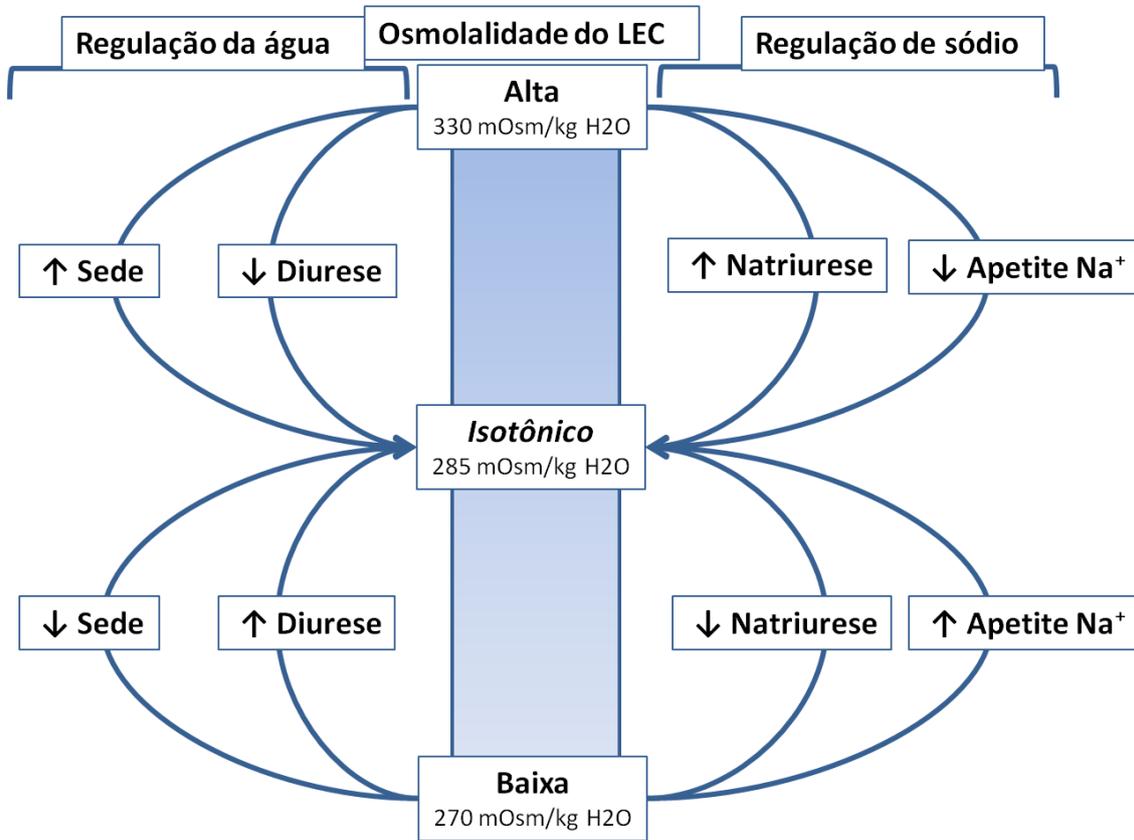


Figura 1: Respostas homeostáticas à variação de osmolalidade. O diagrama ilustra as respostas adaptativas que mantêm a osmolalidade do líquido extracelular (LEC) sempre próximo do valor isotônico ($\approx 285\text{mOsm/kg H}_2\text{O}$, para ratos). Setas para cima representa aumento, seta para baixo representa diminuição. Do lado esquerdo estão os mecanismos relacionados à regulação hídrica. Esses incluem alteração do comportamento de sede (busca por água) e o controle da excreção renal de água. Do lado direito estão os mecanismos da regulação de sódio. Esses incluem ingestão de sódio e sua excreção renal. (adaptado de Bourque *et al.*, 1994).

No hipotálamo, entre as estruturas responsáveis pela detecção e manutenção da osmolalidade, destaca-se a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), local onde encontramos os órgãos circumventriculares (OCVs), regiões desprovidas de barreira hematoencefálica, consideradas verdadeiras “janelas cerebrais”, essas estruturas são precocemente expostas

às variações na osmolalidade plasmática, e os principais núcleos são: O órgão subfornical (SFO), núcleo mediano preóptico (MnPO) e o órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT) (Figura 2). Esses tem um papel chave na resposta à variação da osmolalidade, neles encontramos células especializadas em detectar variações no conteúdo de sódio, chamadas de osmoreceptores (Andersson & McCann, 1956).

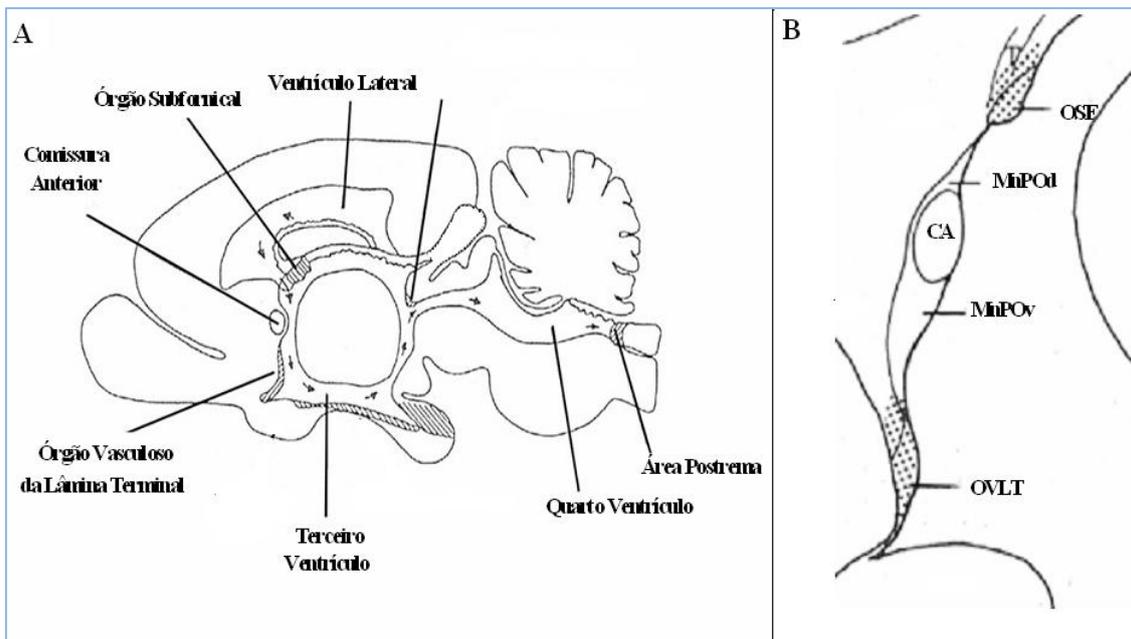


Figura 02: Secção Sagital do cérebro de rato, localização dos órgãos circumventriculares;(A), parede anterior do terceiro ventrículo (AV3V) (B).órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), órgão subfornical (SFO), núcleo mediano preóptico (MnPO) (adaptado de Summy-Long & Kadekaro 2001).

Essas células osmoreceptoras presente nos núcleos formadores do AV3V, comunicam se entre elas e apresentam conexões diretas com outros dois importantes núcleos do hipotálamo; o núcleo paraventricular (PVN) e o núcleo supraóptico (SON), essa rede de comunicação é citada como “complexo osmorreceptor central” (Figura 3) (Hussey *et al.*, 2001). Essas conexões são importantes para transmitir informações sobre a osmolalidade, e são consideradas predominantemente vias glutamatérgicas e/ou GABAérgicas

(Grob *et al.*, 2003; Decavel & Van den Pol 1990; Mason *et al.*, 1987; Van den Pol *et al.*, 1990). O recrutamento dessas vias vão desencadear eventos adaptativos que incluem a secreção de hormônios, ativação do sistema simpático, atividade renal e alteração no comportamento, todos com intuito de restabelecer a homeostase dos fluidos corporais. Conseqüentemente todas essas respostas adaptativas, incluindo: regulação da secreção dos neuropeptídeos, podem ser mediadas pela relação dos aminoácidos GABA e glutamato (Hussey *et al.*, 2001), porém a compreensão de como essa relação atua na regulação hidroeletrólítica e os efeitos da hiperosmolalidade sobre os níveis desses neurotransmissores ainda não são completamente elucidada (Grob *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2005; Patiense S, 2013).

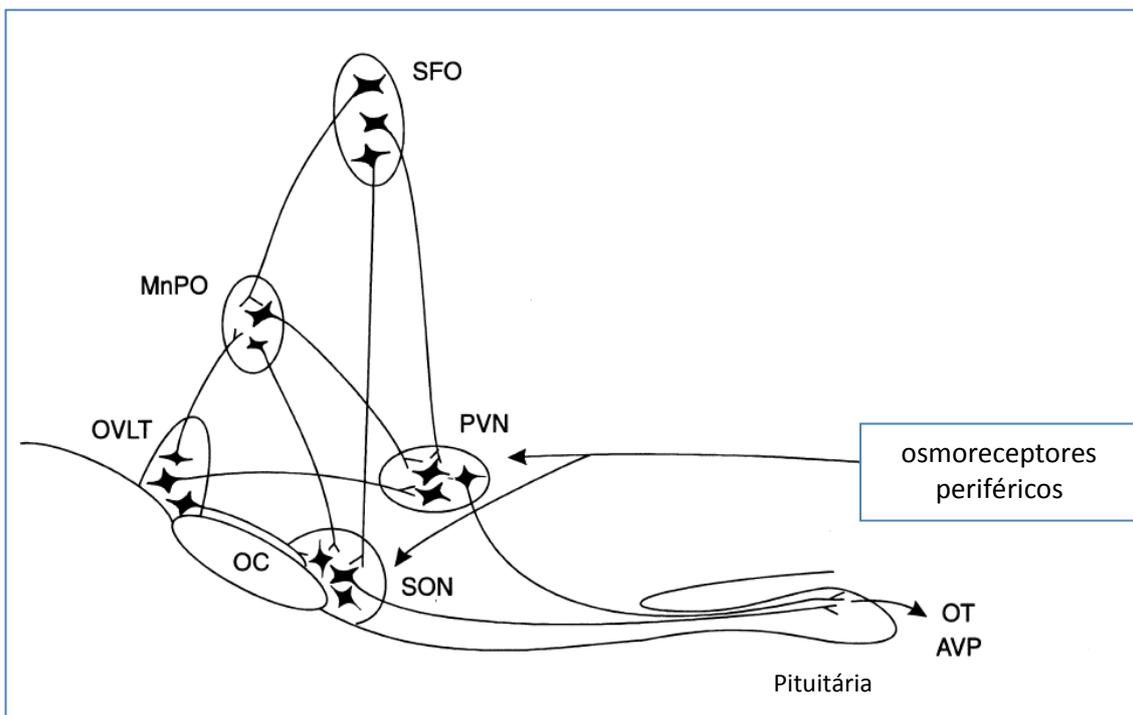


Figura 03: Complexo osmorreceptor central. Os corpos celulares dos neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supraóptico (SON) projetam seus axônios para o lobo posterior da pituitária, onde ocitocina (OT) e vasopressina (AVP) são liberados na circulação periférica. Eles recebem informações dos neurônios osmorreceptores centrais, muitos dos quais são glutamatérgicos e GABAérgicos; órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), órgão subfornical (SFO) e núcleo mediano préóptico (MnPO). OVLT e SFO enviam projeções para MnPO. Muitas dessas informações são mediadas por glutamato e GABA. Informações também chegam de osmoreceptores periféricos (adaptado de Hussey *et al.*, 2001).

De maneira geral, pequenas variações de osmolalidade dos fluidos corporais de mamíferos são detectadas por células especializadas (chamadas de osmoreceptores) localizadas em três importantes núcleos; MnPO, SFO e OVLT. Esses núcleos convertem essa alteração em sinalização neuroquímica, com envolvimento dos sistemas glutamatergicos e GABAérgico, e enviam essas informações para o PVN e SON, onde é produzido, armazenado e secretado os neuropeptídeos OT e AVP envolvidos no balanço hídrico. Esse circuito uma vez ativado pode determinar importantes respostas adaptativas. No entanto, a compreensão de como o balanço entre a sinalização inibitória e excitatória no hipotálamo se relaciona com a homeostase dos fluidos corporais, principalmente no que concerne a liberação de peptídeo, no estado basal e hiperosmótico, não são completamente elucidadas. Assim, entender o efeito da hiperosmolalidade sobre a relação entre os neurotransmissores GABA/glutamato pode elucidar o mecanismo neuroquímico da resposta hipotalâmica na homeostase dos fluidos corporais, e configura-se como um importante aspecto para compreensão da fisiologia hipotalâmica.

1.2 Papel dos sistemas GABAérgico e Glutamatérgico na fisiologia hipotalâmica

Glutamato e GABA são os principais neurotransmissores no hipotálamo (Decavel & Van den Pol 1990; Brann 1995). Estão envolvidos na regulação de varias funções hipotalâmicas, tais como: liberação de hormônios (Busnardo *et al.*, 2012), regulação da ingestão de alimentos (Stanley *et al.*, 1993), resposta ao estresse (Myers *et al.*, 2013), reprodução (McCarthy *et al.*, 1994), e também na manutenção do volume e osmolalidade plasmática (Busnardo *et al.*, 2012; Brennan *et al.*, 1984; Yamaguchi & Yamada 2008; Li *et al.*, 2006).

Evidências recentes apontam para um papel central desses aminoácidos na regulação hídrica. Dados usando hibridização *in situ* demonstraram que a região do AV3V, apresenta marcação para ambos os neurônios glutamatérgicos e GABAérgicos (Grob *et al.*, 2003). Além disso, alterações no conteúdo de Na⁺ induzem aumento na expressão de c-fos nessa região, sugerindo o recrutamento desses circuitos (Ho *et al.*, 2007; Grob *et al.*, 2003). Essas características, com a presença de ambos os circuitos excitatórios e inibitórios nos mesmos núcleos (OVLT, SFO e MnPO), indicam que essas estruturas poderiam em determinado momento serem predominantemente excitatórias ou inibitórias, dependendo do tipo de alteração detectada (Grob *et al.*, 2003). Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar qual neurotransmissor é predominante em diferentes condições fisiológicas.

Os sistemas glutamatérgicos e GABAérgicos não estão presentes somente na região responsável pela detecção da variação de osmolalidade (AV3V), mas também são constituintes do PVN e SON, onde já foram descritos os principais subtipos de receptores para o glutamato, incluindo NMDA, AMPA,

cainato e mGluRs (Al-Ghoul *et al.*, 1997; Meeker *et al.*, 1994; Kawasaki *et al.* 2009; Mateos *et al.*, 1998), bem como os receptores de GABA, tais como GABA_A e GABA_B (Kabashima *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2006). Sugerindo que o sistema hipotálamo-neurohipofisário possa ser diretamente modulado por esses aminoácidos, regulando assim a liberação dos peptídeos AVP e OT (Kabashima *et al.*, 1997).

Porém, apesar de ambos os neurônios secretores de OT e AVP recebem intensa inervação de vias glutamatergicas e GABAérgicas (van den Pol *et al.*, 1990; Decavel & Van den Pol 1990), algumas evidências sugerem que eles diferem em suas respostas frente aos aminoácidos (Yang *et al.*, 1994; Busnardo *et al.*, 2012). Por exemplo, aplicação de agonistas dos receptores tipo NMDA no NSO ativa fortemente os neurônios secretores de AVP, porém não os de OT (Busnardo *et al.*, 2012). Além das diferenças nas respostas das células AVP e OT, poucos estudos abordam o papel fisiológico dos aminoácidos na liberação de OT relacionado ao equilíbrio hidroeletrólítico. Neste sentido, mais estudos são necessários, buscando esclarecer a relação dos neurotransmissores GABA, glutamato e o peptídeo OT com a homeostase dos fluidos corporais.

Outro aspecto importante nessa fisiologia é a possível existência de um mecanismo indireto de regulação na liberação de OT, pois o fato de existir uma ação direta dos neurotransmissores glutamato e GABA sobre os neurônios secretores de OT (Kabashima *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2006; Busnardo *et al.*, 2012), não exclui a possibilidade de um mecanismo indireto, através da interação entre os próprios neurotransmissores, uma vez que já foi

demonstrado que a interação GABA/glutamato regula muitas funções do SNC (Schousboe *et al.*, 2003).

Neste sentido, estudos recentes estão sugerindo que relação GABA/glutamato também pode regular a excitabilidade neuronal hipotalâmica, incluindo a relacionada com a variação de osmolalidade. O trabalho de Li e colaboradores (2006) mostrou que o uso de agonista do receptor tipo NMDA bloqueia diminuição da pressão sanguínea, decorrente da ativação do receptor GABA_a no hipotálamo. Sugerindo que as ações dos circuitos GABAérgicos possam ser mediadas pelo glutamato. Em outro estudo foi mostrado que o bloqueio de receptores ionotrópicos de glutamato aboli a liberação de AVP tanto induzida por antagonista de GABA_a como em decorrência da infusão de salina hipertônica (Yamaguchi & Yamada 2008). Esses achados sugerem que a modulação GABAérgica sobre a liberação dos neuropeptídeos possa ocorrer via glutamato. Entretanto, mais estudos são necessários para esclarecer essas evidências.

Contudo, apesar de muitas evidências apontarem um importante papel dos sistemas GABAérgicos e glutamatérgicos na regulação da homeostase dos fluidos corporais, ainda não está bem esclarecido seu papel na liberação de OT relacionada com homeostase dos fluidos corporais. E por outro lado, apesar da literatura sugerir uma ação direta desses neurotransmissores sobre os neurônios produtores e liberadores OT, ainda não é bem documentado o papel de um mecanismo indireto. Portanto, entender esses mecanismos pode esclarecer importantes aspectos de como a relação dos neurotransmissores controlam a liberação de OT em condições basais e hiperosmótica.

1.3 Papel da ocitocina no balanço hídrico e sua relação com os neurotransmissores glutamato e GABA

Ocitocina, um peptídeo formado por nove aminoácidos, com peso molecular de 1007 KDa, foi descrita pela primeira vez em por Henry Dale (1906), que mostrou a capacidade do extrato da pituitária posterior em provocar contração uterina em gatas grávidas. Posteriormente foi descrita a ação da OT na lactação (Otto & Scott 1910). Embora não se soubesse que ambos os efeitos eram oriundos do mesmo hormônio, esses achados definiram as duas principais ações periféricas da OT (Carson *et al.*, 2013).

Após essas descobertas, a OT tornou-se um dos neuropeptídios mais estudados no sistema nervoso de mamíferos (Carson *et al.*, 2013). Conseqüentemente, novos estudos mostraram uma ampla participação em outros processos fisiológicos (Riem *et al.*, 2011; Stevens *et al.*, 2013; Burns *et al.*, 1997), incluindo a regulação do balanço hídrico e regulação da osmolalidade plasmática (Blackburn *et al.*, 1993; Favaretto *et al.*, 1997). De fato, apesar de não ser considerado seu principal papel na fisiologia, a OT exerce importantes efeitos relacionados às alterações no balanço hídrico, por exemplo, inibindo o apetite por sal sem alterar a ingestão de água (Blackburn *et al.*, 1993), e aumentando a excreção renal de sódio (Balment *et al.*, 1980; Favaretto *et al.*, 1997).

Além disso, trabalhos também mostraram que osmolalidade elevada é um importante estímulo para o aumento na liberação de OT na corrente sanguínea de ratos, reforçando sua participação na homeostase dos fluidos corporais (Balment *et al.*, 1980; Cunningham & Sawchenko 1991). Alguns estudos

mostraram que esta liberação envolve alguns mediadores neuroquímicos, como o óxido nítrico (Gomes, 2010) e peptídeo natriurético atrial (Chirquer, 2003). Entretanto, a participação dos aminoácidos na liberação de OT, induzida pela hiperosmolalidade, ainda não é bem estudada. Porém, algumas evidências apontam neste sentido. Como a capacidade do sistema glutamatérgico em induzir aumento na liberação de OT (Busnardo *et al.*, 2012; Morsette *et al.*, 2001), além do próprio envolvimento do glutamato na liberação fisiológica de OT durante a amamentação (Parker *et al.*, 1993). Sugerindo uma relação entre o sistema glutamatérgico e a liberação deste neuropeptídeo.

Entretanto, alguns estudos demonstraram resultados controversos sobre a relação do glutamato com a liberação de OT, induzida ou não pelo estímulo hiperosmótico. Morsette e colaboradores (2001) demonstraram que o bloqueio de receptores metabotrópicos de glutamato não altera a liberação de OT induzida por meio hipertônico. Além disso, um estudo farmacológico mostrou que o receptor NMDA pode inibir a liberação de OT (Nissen *et al.*, 1994). Esses resultados mostram a complexidade da interação entre o sistema glutamatérgico e os neurônios ocitocinérgico.

Tão complexa quanto a relação do glutamato com a OT, é a interação deste peptídeo com o “antagonista fisiológico” do sistema glutamatérgico no SNC, o neurotransmissor GABA. Este aminoácido parece agir como um potente modulador do sistema ocitocinérgico. Trabalhos demonstraram que a inervação GABAérgica diminui atividade de neurônios ocitocinérgicos em condições basais (Nicoll & Barker 1971; Decavel & Van den Pol 1990), sugerindo que o GABA exerça uma inibição tônica sobre essas células (Decavel & Van den Pol 1990; Kasai *et al.*, 1987; Park *et al.*, 2006). De fato,

essa modulação é tão significativa, que durante situações onde há necessidade do aumento na liberação de OT, tais como: parto e amamentação, criou-se mecanismos fisiológicos para diminuir a atuação do sistema GABAérgico sobre as células secretoras de OT (Brussard *et al.*, 1997; Crowley *et al.*, 1992). Entretanto, mesmo bem conhecidos os mecanismos relacionados com a liberação de OT e o sistema GABAérgico no parto e amamentação, poucos estudos buscam entender os fenômenos fisiológicos que envolvem esses mediadores químicos relacionados com a homeostase dos fluidos corporais, bem como os efeitos da osmolalidade elevada sobre esses sistemas.

Alguns estudos demonstraram a capacidade do GABA em modular importantes aspectos da homeostase dos fluidos corporais (Brennan *et al.*, 1984; Yamaguchi & Yamada 2008; Li *et al.*, 2005), incluindo a modulação da liberação do peptídeo hipotalâmico AVP, em condições basais ou durante a hiperosmolalidade (Yamaguchi & Yamada 2008). E apesar da região do AV3V expressar ambos os receptores (Kabashima *et al.*, 1997; Park *et al.*, 2006), parece que essa ação ocorre via receptores tipo GABA_A, sem a participação do receptor GABA_B (Yamaguchi & Yamada 2008). Entretanto, o receptor metabotrópico de GABA pode estar envolvido na modulação de outros parâmetros homeostáticos. Pois já foi demonstrado a capacidade do receptor GABA_B em modular o potencial excitatório pós-sináptico no NSO (Kombian *et al.*, 2001) e sua ação reguladora da pressão sanguínea em ratos (Li & Pan 2006).

Em linhas gerais, as respostas endócrinas hipotalâmicas, descritas em detalhes no campo do conhecimento em fisiologia, vão gerar uma cascata de eventos, os quais incluem: liberação de hormônios, alteração da atividade simpática, modificação da função renal e mudança de comportamentos, os quais buscam manter o equilíbrio interno e o funcionamento adequado dos diferentes órgãos e sistemas. Em concordância com a literatura atual, aparentemente todas essas respostas podem ser controladas e desencadeadas por mediadores neuroquímicos. Portanto conhecer e estudar a neuroquímica dessa estrutura do sistema nervoso central resulta não somente em descrever mecanismos de gatilho na resposta neuroendócrina, mas permite desbravar muito além do conhecimento em neuroquímica, permeando por regiões de fronteira na ciência, que envolve o conhecimento da fisiologia, biologia celular, farmacologia, neurociência e neuroendocrinologia. Portanto esse pode ser a chave para compreensão profunda da relação entre duas classes de moléculas sinalizadoras, as quais apresentam fisiologias totalmente diferentes, mas que no hipotálamo estão intimamente relacionadas e ainda pouco compreendidas, os neurotransmissores e os hormônios.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar o efeito do meio hipertônico sobre os níveis extracelulares dos neurotransmissores GABA e glutamato e sua relação com a liberação de ocitocina em preparações de hipotálamo de ratos.

2.2 Específicos

- Caracterizar o efeito do meio hipertônico nos níveis extracelulares de glutamato, GABA e ocitocina.
- Avaliar o papel do GABA sobre os níveis extracelulares de glutamato e ocitocina em meio hipertônico.
- Avaliar o papel do Glutamato sobre os níveis extracelulares de ocitocina.
- Avaliar o efeito da adição de agonista GABA_a e GABA_b sobre os níveis extracelulares de glutamato e ocitocina em meio hipertônico e isotônico.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

O presente projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação da Universidade Federal do Pará (CEPAE-UFPA), sob o protocolo nº CEPAE-UFPA 140-13.

3.2 Animais Experimentais

Ratos Wistar Machos (260-300g) foram mantidos em condições padrões de biotério, com controle de temperatura (23 ± 2 °C) e luz ambiente (08:00 às 18:00 h), com água e ração *ad libitum*.

3.3 Explante hipotalâmico e sistema de perinfusão *in vitro*

Após decapitação o cérebro foi retirado rapidamente, os *explants* hipotalâmicos foram imediatamente dissecados em gelo como descrito por Gomes e colaboradores (2010), e imediatamente colocado em meio de incubação gelado; Krebs-Ringer Bicarbonato-Glicose (KRBG) isotônico com 1% de glicose (118.46 mM NaCl, 5 mM KCl, 2.5 mM CaCl₂, 1.18 mM NaH₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄, 24.88 mM NaHCO₃, pH 7.4, 280 mOsm/kg H₂O) (Gomes *et al.*, 2010), para posteriormente serem transferidos para câmaras individuais no sistema de perinfusão (Figura 4) com solução KRBG isotônica a uma temperatura de $37 \pm 0,5$ °C (a qual teve por finalidade não somente nutrir e manter viável o tecido, mas também foi o veículo para as drogas usadas no presente estudo) e foi estabelecido um fluxo de 0,5-0,1 ml/min, e após estabilização de vinte minutos, foram feitas as coletas, do lavado tecidual, com intervalo de um minuto, durante o período que transcorreu o experimento. O estímulo hipertônico foi realizado com solução de KRBG hipertônica, pela

adição de NaCl (340 mOsm/Kg H₂O). No final de cada experimento o tecido foi exposto a 60 mM de KCl, para testar a capacidade de resposta do tecido.

O sistema de perinfusão consiste num tipo de microdiálise, adaptado ao monitoramento e quantificação das concentrações de fármacos, substâncias endógenas e metabólitos em fluidos biológicos, baseando-se na difusão passiva de substâncias através de um gradiente de concentração. O equipamento é composto de um banho-maria contendo água destilada com temperatura em torno de 37°C, distribuidor de fluxo de um para cinco canais, cinco câmaras de acrílico forradas com filtro, para acomodar o hipotálamo e permitir que apenas a solução que banha o tecido seja difusa por capilares. Estes capilares estão conectados nas câmaras, e interligados a uma bomba de microinfusão, que perfunde o líquido a fluxo constante. A solução de estímulo fica em um béquer suspenso por uma estante adaptada ao banho-maria (Figura 4).

Desta forma, a bomba promove sucção da solução de estímulo contida no béquer, perpassa pelos capilares, banha o tecido nas câmaras por um tempo determinado de acordo com o protocolo experimental, então o líquido que lava o tecido hipotalâmico é armazenado no tubo coletor e mensurado por técnicas de detecção do analito de interesse.

O volume de água do banho-maria deve estar no nível da câmara contendo o tecido e do béquer contendo a solução de estímulo, com temperatura de 37°C, mimetizando a temperatura corpórea.

Quando a solução de estímulo for trocada, apenas será substituído o béquer por outro contendo a nova solução, espera-se a solução antiga ser

difundida e põe-se a nova solução no sistema, iniciando então um novo tratamento.

Tal sistema foi previamente calibrado com uma análise temporal de aproximadamente sessenta minutos, medindo-se cada fluxo da bomba e a respectiva vazão proporcionada por ele, verificando-se então o fluxo ótimo para os experimentos.

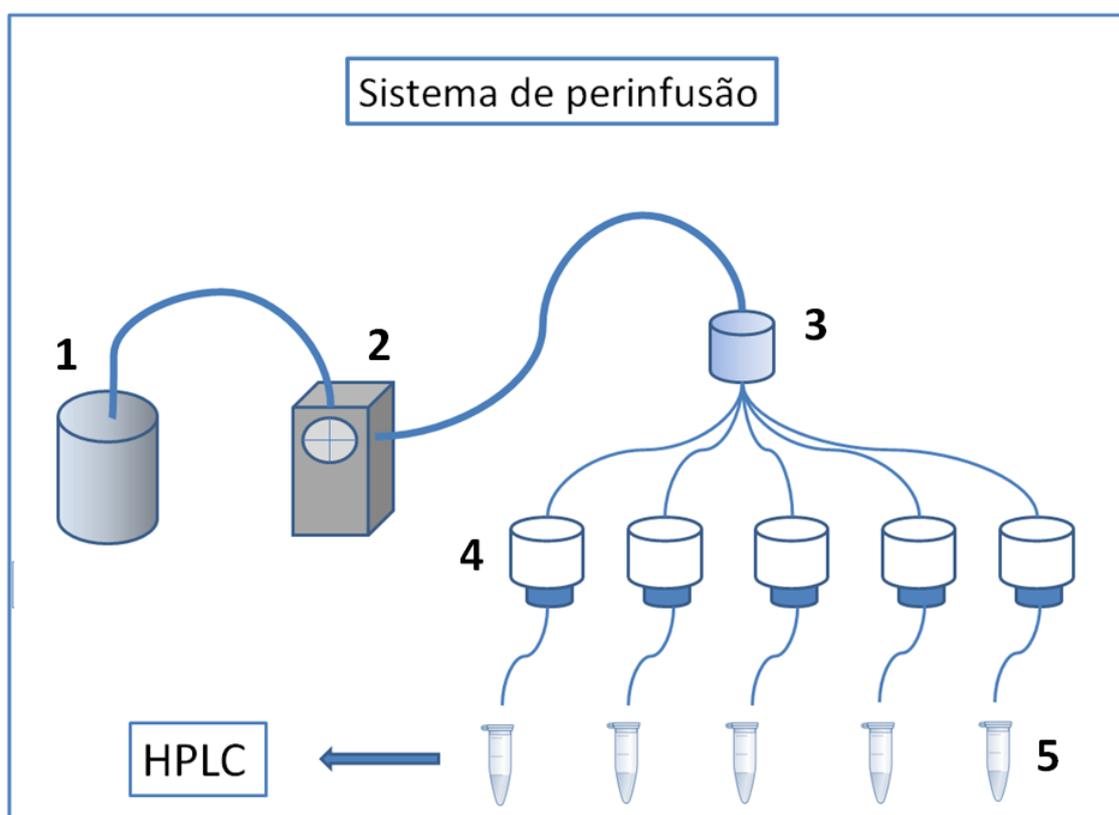


Figura 4: Esquema didático do sistema de perinfusão: Composto por reservatório (1) onde a solução de lavagem é aspirada através de uma bomba peristáltica (2) com um determinado fluxo de trabalho, posteriormente passa para o distribuidor (3) que divide o fluxo em cinco canais individuais, sendo que em cada canal encontra-se uma câmara de perinfusão (4) (volume 0,5 mL) onde o tecido é colocado, o fluxo passa pela câmara lavando o tecido, e então é coletado para posterior análise (5). As manipulações farmacológicas podem ser realizadas mudando a solução do reservatório.

3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

3.4.1 Equipamentos cromatográficos

O sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) usado no presente estudo foi composto por Bomba (Shimadzu, LC20AT), detector de fluorescência (Shimadzu, RF-10AxI), detector de UV/VIS (Shimadzu, SPD-20A), degaseificador (Shimadzu, DGA-20A5), módulo comunicador (Shimadzu, CBM-20A), injetor de amostras Rheodyne com alça de injeção de 20 microlitros, forno (Shimadzu, CTO-20A), coluna cromatográfica Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 μm . Acoplado a um microcomputador com software de integração *Lab Solution*, esquematicamente representado na figura 5.

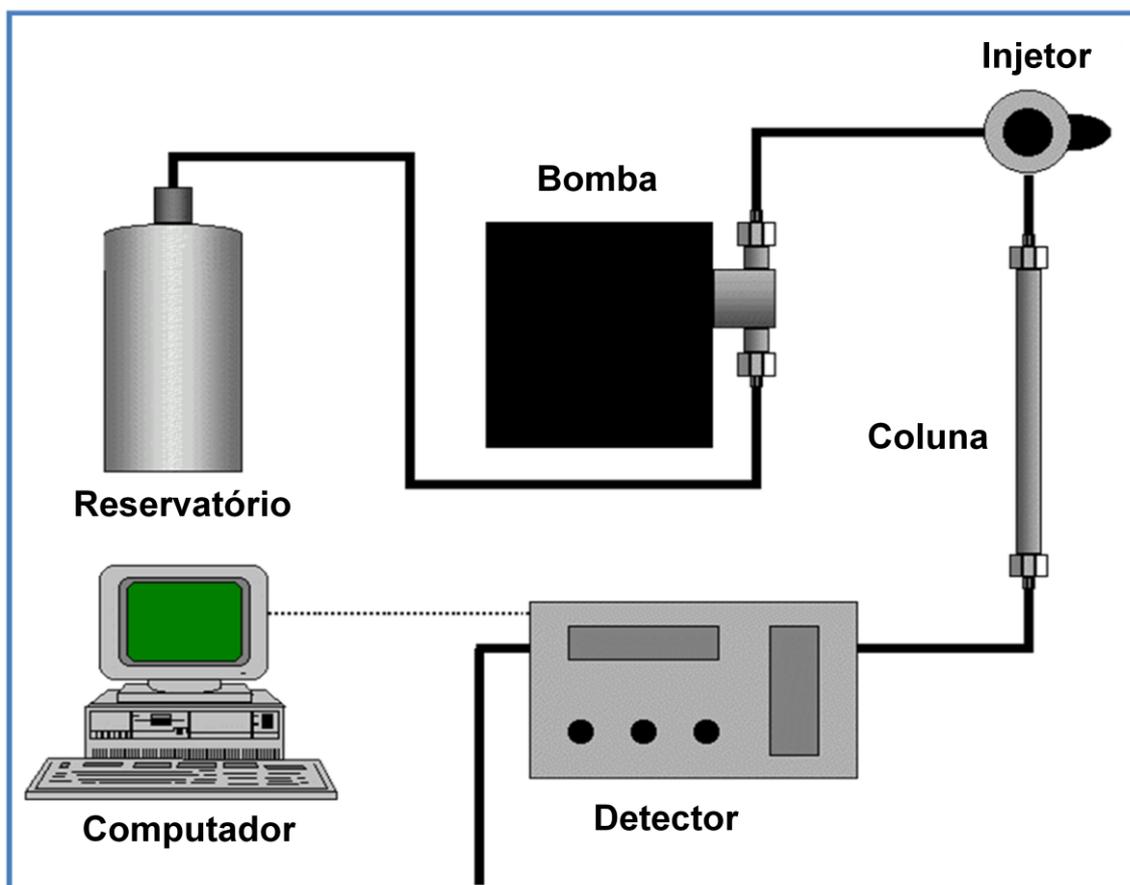


Figura 5: Sistema de CLAE composto por reservatório, bomba, injetor, coluna, detector e microcomputador.

3.4.2 Reagentes e padrões

Todos os reagentes e padrões usados no presente estudo foram grau de pureza CLAE (99 % de pureza), acetato de sódio, ácido acético, ácido bórico, o-phytaldehyde (OPA), N-acetilcisteína, L-glutamato, Ácido gama-aminobutírico, Acetato de Ocitocina, Muscimol, Cloridrato de baclofen e L-homoserina foram obtidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), Metanol foi comprado da TEDIA Co (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (Millipore).

3.4.3 Condições cromatográficas para quantificação de aminoácidos

Foram adotadas as seguintes condições operacionais: Coluna cromatográfica Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm; vazão da fase móvel 1,2 mL/min. Eluição da fase móvel foi realizada por gradiente (tabela 1) composto por fase A tampão acetato de sódio 50 µM, metanol e propanol (95% de tampão acetato com pH 5,67; 5% de metanol e 12 mL de propanol para cada litro de fase A), e fase B metanol 70 %; Tempo total da corrida foi de 25 minutos; volume injetado foi de 40 µL; detector fluorescência, comprimento de onda de excitação 340 nm e emissão de 460 nm; A homoserina foi usada como padrão interno (Tabela 2).

Tabela 1: Fase móvel com gradiente para quantificação de aminoácidos: composto por fase A tampão acetato de sódio 50 µM, metanol e propanol. pH = 5,67. Fase B metanol 70 %, fluxo de 1,2 mL/min, eluição de 25 minutos

Tempo (minutos)	Fase A%	Fase B%
0,01	100	0
10	70	30
20	50	50
25	100	0

Tabela 2: Resumo das condições cromatográficas para dosagem de aminoácidos

Característica do protocolo	Especificações
Fase móvel	Gradiente: Fase A (tampão acetato de sódio) e Fase B (metanol 70%)
Coluna analítica	VP-ODS, 250 x 4,6 mm, 5 µm
Fluxo	1,2 mL/min
Temperatura	26 °C
Agente Derivatizante	OPA/ N-acetilcisteína
Detector	Fluorescência, comprimento de onda de excitação 340 nm e emissão de 460 nm.
Tempo de eluição	25 min

3.4.4 Procedimento de derivatização de aminoácidos

Devido ausência de características fluorescentes intrínsecas dos aminoácidos (glutamato e GABA), esses não são detectáveis por fluorescência, desta maneira utilizamos a técnica de derivatização pré-coluna para separação e detecção dos componentes. O agente derivatizante usado no presente estudo foi o OPA, que reage com aminas primárias na presença de grupamento tiol gerando derivados fluorescentes.

A derivatização foi realizada em duas etapas: Primeiramente em um tubo cônico âmbar de 2 mL de volume foi feita a mistura de 16,3 mg de N-acetilcisteína, 13 mg de OPA e solubilizado em 300 µL de metanol (chamada de 1^o solução). Nesta reação o OPA se ligou ao grupamento tiol da cisteína. Foi necessário manter repouso por 30 minutos para formar o complexo —OPA + cisteína (Shah *et al*, 2002). Decorrido o tempo de reação, a 1^o solução foi misturada a amostra (ou padrões de aminoácidos) e tampão borato (pH 9.5) na proporção de 1:6:4 (v/v) respectivamente, em um tubo âmbar 2 mL de volume, A solução resultante foi agitada e injetada no sistema cromatográfico após 5 minuto.

3.4.5 Condições cromatográficas para quantificação de ocitocina

Foram adotadas as seguintes condições operacionais: Coluna cromatográfica Shimadzu, Shim-Pack VP-ODS, dimensão 250 x 4,6 mm, com partículas de 5 µm; vazão da fase móvel 1 mL/min; Eluição isocrática, com fase móvel composta por metanol 70 %, pH 3.1; Tempo total da corrida foi de 10

minutos; volume injetado foi de 40 μ L; detector UV-vis, comprimento de onda de 280 nm (tabela 3).

Tabela 3: Resumo das condições cromatográficas para dosagem de ocitocina

Característica do protocolo	Especificações
Fase móvel	metanol 70%
Coluna analítica	VP-ODS, 250 x 4,6 mm, 5 μ m
Fluxo	1 mL/min
Temperatura	26 °C
Agente Derivatizante	Sem derivatização
Detector	UV-vis, 280 nm
Tempo de eluição	10 min

3.4.6 Preparação das amostras

As amostras do lavado do tecido coletadas no sistema de perinfusão (bem como os padrões submetidos ao ensaio de recuperação) foram submetidas ao processo de preparação, o qual consistiu: Adição do padrão interno (somente usado na dosagem de aminoácidos); exposição ao ácido tricloroacético (TCA 1%); agitação em vórtex durante 1 minuto, centrifugação a 10000 RPM por 5 minutos, retirada do sobrenadante, este foi novamente agitado por 1 minuto, para então ser realizada a derivatização (Figura 6).

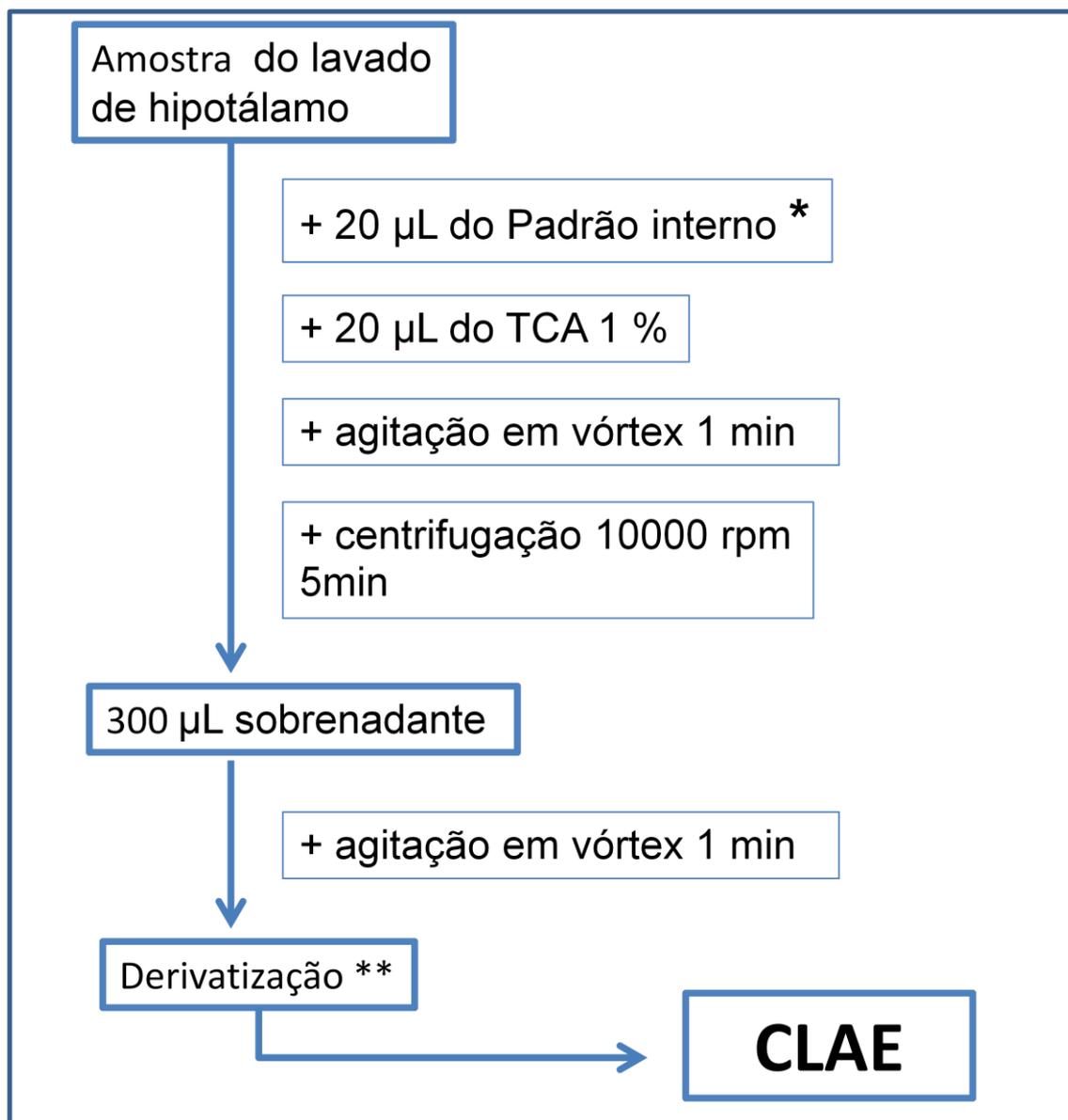


Figura 6: Fluxograma do procedimento de preparação das amostras. *Padrão interno foi usado somente para detecção de aminoácidos. ** Derivatização somente para detecção de aminoácidos.

3.5 Dosagem de proteína

A dosagem de proteína foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976). Este método consiste no seguinte fundamento, ocorre ligação do corante azul de Coomassie com grupos funcionais ou aromáticos das proteínas. A ligação ocorre em dois minutos e esta dura aproximadamente duas horas. Durante o processo, a interação entre a proteína de alto peso molecular e o corante provoca o deslocamento do equilíbrio do corante para a forma aniônica, que absorve fortemente em comprimento de onda de 595 nm. Para a dosagem de proteína, separou-se em tubos de 1,5 mL, homogeneizado de 100 µL de amostra de tecido em água destilada, a seguir acrescentou-se 100 µL de hidróxido de sódio (NaOH) 1N e completados 500 µL com água destilada. Para analisar estas amostras, colocou-se, em tubos de ensaio, 50 µL destas e adicionou-se 150 µL de água destilada. Após isto, adicionou-se 2 mL do reativo de Bradford e deixou-se reagir por dois minutos. De três em três tubos, foram realizadas leituras no espectrofotômetro com comprimento de onda de 595 nm. Os valores foram obtidos pelo uso de uma curva pré-estabelecida com BSA (albumina sérica bovina) e reativo.

3.6 Análise estatística

Todos os dados são expressos em média \pm E.P.M. As comparações dentro do grupo experimental foram feitas por meio de análise de variância (ANOVA) com Newman-Keus pós-teste. Comparações entre grupos foram feitas utilizando ANOVA de duas vias, com Bonferroni pós-teste. $P < 0.05$ foi considerado significativo.

4. RESULTADOS

Efeito do meio hipertônico sobre os níveis extracelular de glutamato e GABA

Com intuito de avaliar o efeito da hiperosmolalidade sobre os níveis dos neurotransmissores glutamato e GABA, colocamos o hipotálamo em meio hiperosmótico (340 mOsm/Kg H₂O) durante três minutos. Em relação ao aminoácido GABA, os resultados mostraram os níveis basais (quando o tecido foi exposto ao meio isotônico) em torno de 3.9 ± 0.72 nmol/mg ptn, este nível foi imediatamente diminuído (redução de $\approx 80\%$) durante a hiperosmolalidade (0.7 ± 0.25 nmol/mg ptn ($P < 0.01$), 1.4 ± 0.33 nmol/mg ptn ($P < 0.05$) e 1.3 ± 0.37 nmol/mg ptn ($P < 0.05$), no primeiro, segundo e terceiro minuto do estímulo hipertônico respectivamente), retornando aos valores basais após o fim do estímulo (Figura 7).

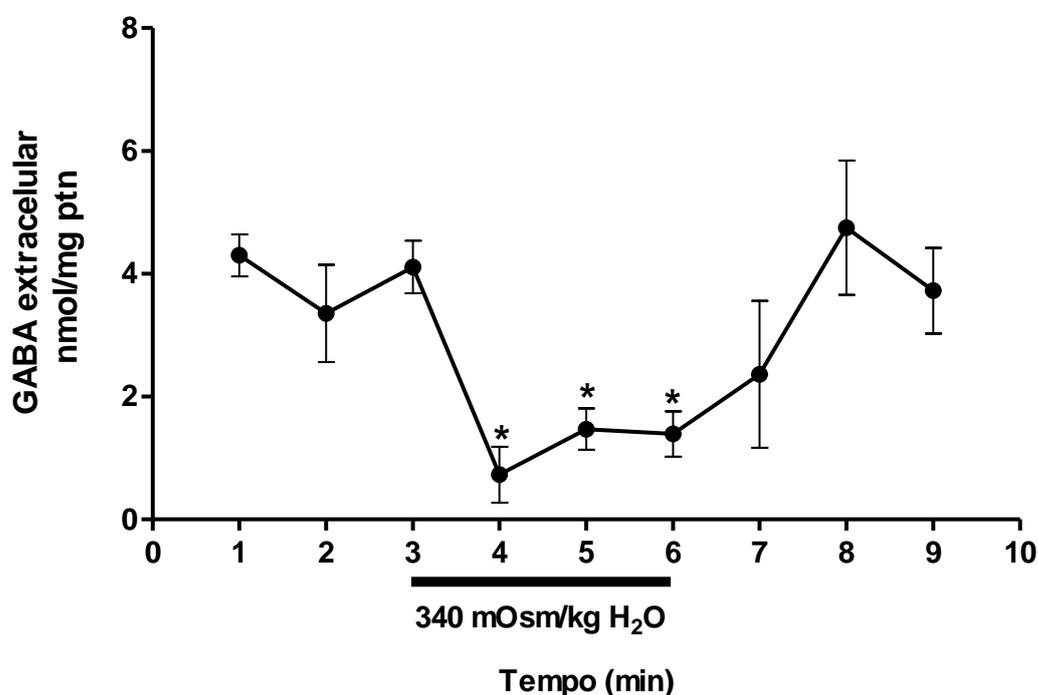


Figura 7: Efeito do meio hipertônico sobre os níveis de GABA. A barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O representa o período (tempo de 3 minutos) em que o hipotálamo foi exposto a hiperosmolalidade. * $p \leq 0.05$; 4, 5 e 6 minutos *versus* basal.

Simultaneamente foram feitas as dosagens de glutamato, apresentando níveis basais em torno de 2.4 ± 0.22 nmol/mg ptn, porém a resposta do sistema glutamatérgico, frente a osmolalidade elevada, ocorreu com atraso de um minuto (quando comparado com a resposta GABAérgica), pois o nível basal de glutamato foi elevado somente a partir do segundo minuto de exposição ao meio hipertônico (4.3 ± 0.21 nmol/mg ptn ($P < 0.01$) e 6.1 ± 0.47 nmol/mg ptn ($P < 0.001$), segundo e terceiro minuto de estímulo osmótico respectivamente), após o fim do estímulo os valores retornaram aos níveis basais (Figura 8).

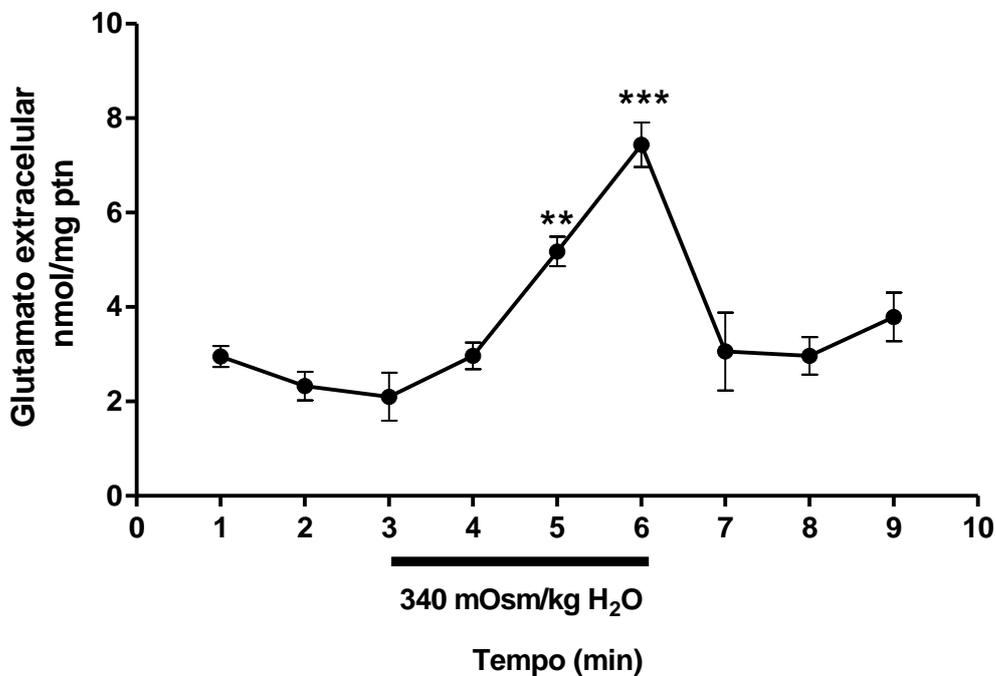


Figura 8: Efeito do meio hipertônico sobre os níveis de glutamato. A barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O representa o período (tempo 3 minutos) em que o hipotálamo foi exposto a hiperosmolalidade. ** $p \leq 0.01$; 5 minutos *versus* basal. *** $p \leq 0.001$ 6 minutos *versus* basal.

A relação temporal dos níveis extracelular de GABA e glutamato durante a hiperosmolalidade é visualizada com mais clareza quando a linha temporal desses dois aminoácidos foi colocada no mesmo eixo (Figura 9). Onde visualizamos no primeiro minuto do meio hipertônico (entre terceiro e quarto minuto) diminuição imediata do GABA e atraso na resposta do glutamato, levantando a hipótese de que o efeito do meio hipertônico sobre o glutamato seria dependente da diminuição dos níveis extracelulares de GABA, e por esse motivo o glutamato somente se elevaria após o segundo minuto, quando o GABA já apresenta valores significativamente menores que o nível basal.

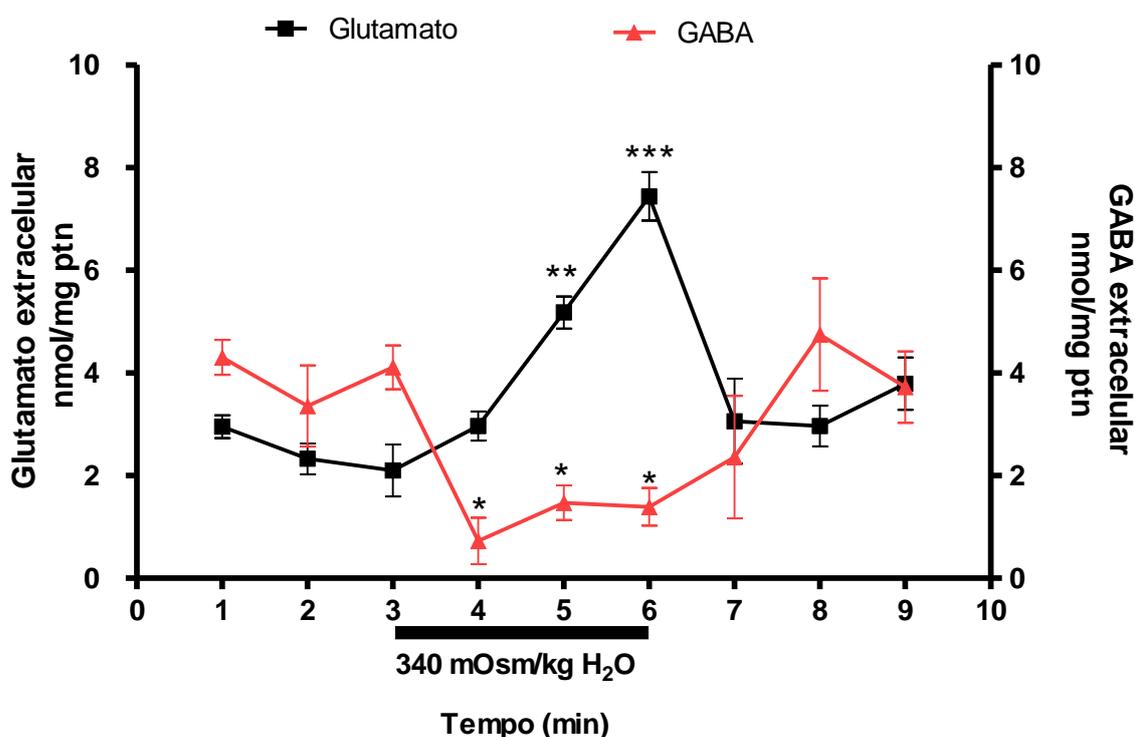


Figura 9: Efeito do meio hipertônico sobre os níveis de glutamato e GABA. A barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O representa o período (3 minutos) em que o hipotálamo foi exposto à hiperosmolalidade. A linha escura com quadrado representa os níveis de glutamato. ** p ≤ 0.01; 5 minutos *versus* basal do glutamato. *** p ≤ 0.001 6 minutos *versus* basal glutamato. A linha vermelha com triângulo representa os níveis de GABA. * p ≤ 0.05; 4, 5 e 6 minutos *versus* basal de GABA. No primeiro minuto de exposição ao meio hipertônico não houve alteração significativa nos níveis de glutamato, mas ocorreu uma diminuição do GABA extracelular.

Efeito da adição de GABA exógeno sobre os níveis extracelular de glutamato durante a hiperosmolalidade

Com intuito de confirmar a hipótese da necessidade de diminuição dos níveis de GABA antecedendo resposta glutamatérgica, o experimento anterior foi repetido, mas com adição de GABA (3 μ M) exógeno durante o período em que o tecido foi exposto à hiperosmolalidade. Os resultados mostraram que o GABA foi capaz de bloquear o aumento de glutamato induzido por estímulo osmótico, mantendo os valores em 1.7 ± 0.57 e 1.8 ± 0.30 nmol/mg ptn no segundo e terceiro minuto de hiperosmolalidade, sem diferenças significativas com os valores basais (Figura 10a), sendo esses valores significativamente menores quando comparados à hiperosmolalidade sem adição de GABA, (no segundo minuto de hiper+GABA (1.7 ± 0.57) vs hiper (4.3 ± 0.21 nmol/mg ptn) ($P < 0.001$), e no terceiro minuto de hiper+GABA (1.8 ± 0.30 nmol/mg ptn) vs hiper (6.1 ± 0.47 nmol/mg ptn) ($P < 0.001$), (Figura 10b). Os níveis de glutamato retornaram a faixa de concentração basal após o fim do estímulo.

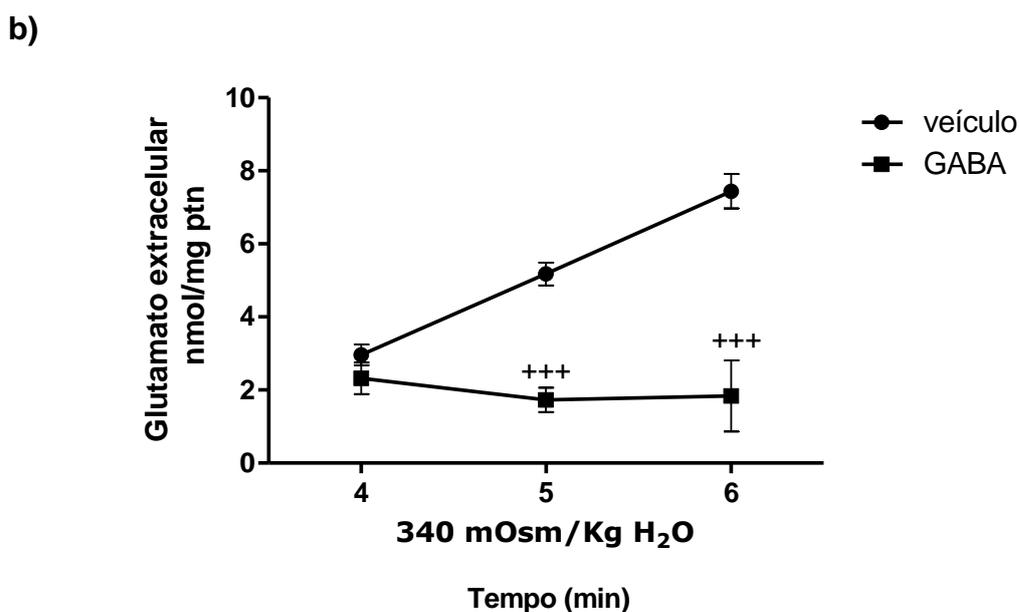
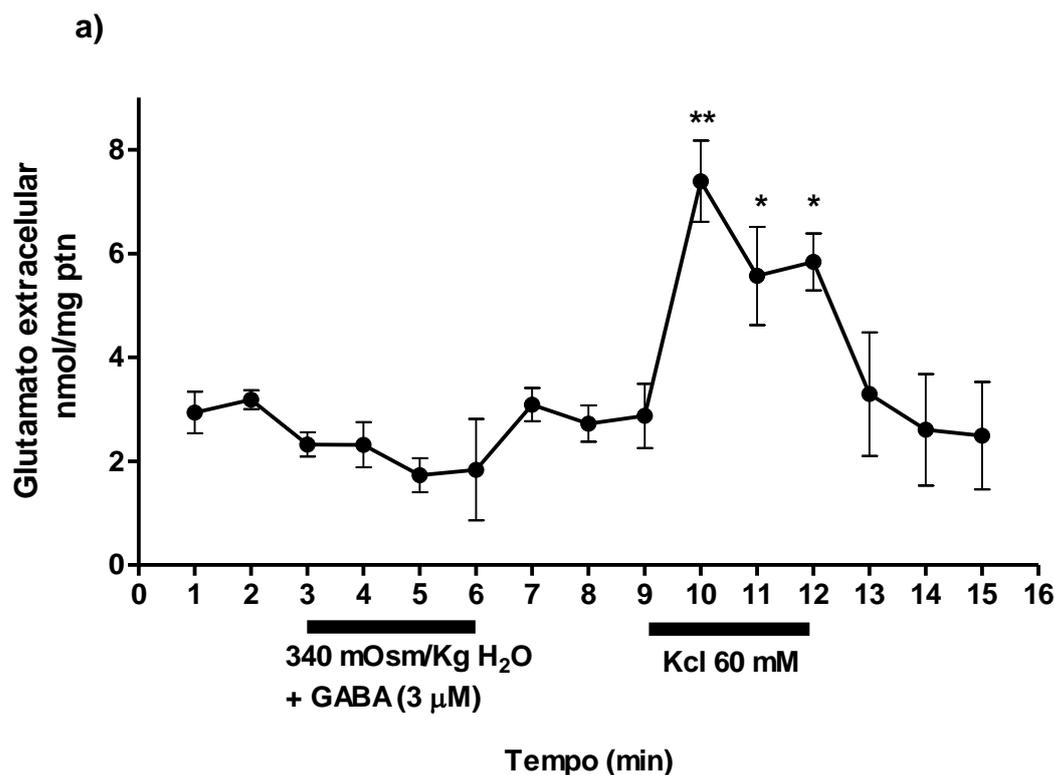


Figura 10: Efeito do GABA sobre a elevação dos níveis de glutamato induzido por hiperosmolalidade. **a)** Barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O + GABA (3 μM) representa o período (3 minutos) em que o hipotálamo foi exposto à hiperosmolalidade na presença do GABA exógeno. A segunda barra representa a exposição do tecido ao KCl (60 mM), para mostrar viabilidade do tecido. Adição de GABA durante o estímulo osmótico manteve os valores iguais aos do nível basal (sem diferença estatística, p>0.05). **b)** Comparação entre hiperosmolalidade na presença de GABA (3 μM) e hiperosmolalidade. +++ p≤ 0.001; 5 minutos hiper+GABA versus hiper, +++ p≤ 0.001; 6 minutos hiper+GABA versus hiper.

Efeito do meio hipertônico sobre a liberação de ocitocina

Com objetivo de mostrar que o modelo de estudo também é adequado para avaliar a liberação de ocitocina no hipotálamo, tentamos demonstrar a capacidade da hiperosmolalidade em aumentar a liberação de OT. Para tal, o hipotálamo foi exposto ao meio hipertônico durante 5 minutos. Os resultados mostraram um aumento na liberação de OT no quinto minuto de estímulo ($p \leq 0.01$ quando comparado com valor basal) que se sustentou por mais um minuto após o fim da hiperosmolalidade (nono minuto $p \leq 0.05$ quando comparado com valor basal). Esses níveis retornaram ao valor basal nos minutos seguintes (Figura 11).

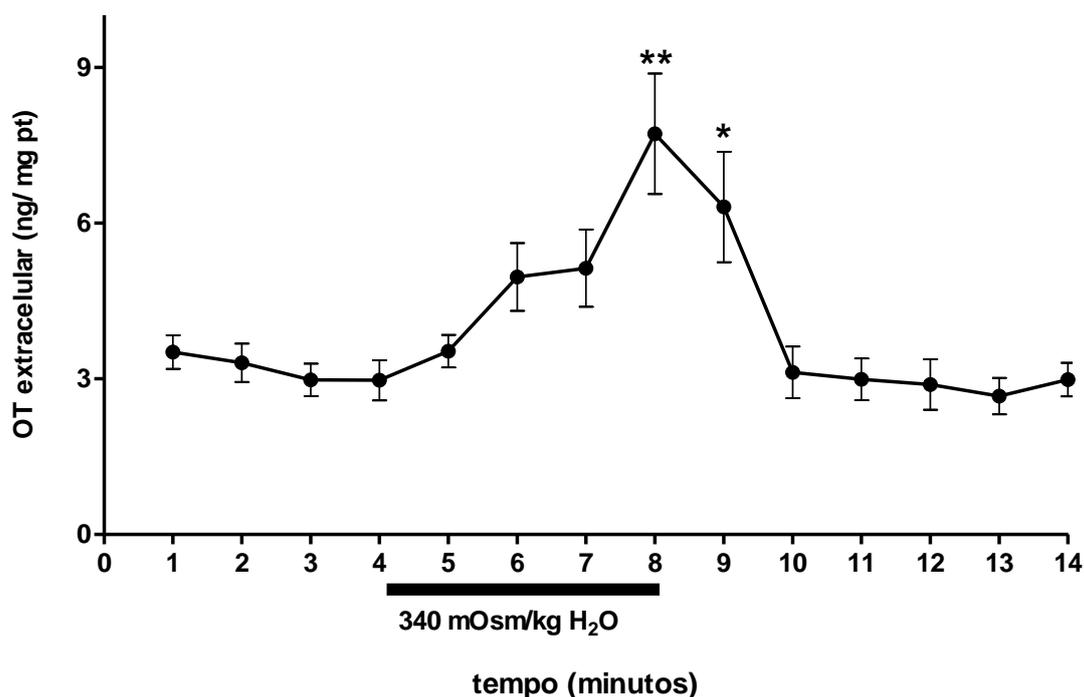


Figura 11: Efeito do meio hipertônico sobre a liberação de ocitocina. A barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O representa o período (5 minutos) em que o hipotálamo foi exposto a hiperosmolalidade. ** $p \leq 0.01$; 8 minutos *versus* basal. * $p \leq 0.05$, 9 minutos *versus* basal.

Efeito do glutamato sobre a liberação de ocitocina

Uma vez que nossos resultados mostraram a capacidade do meio hipertônico em liberar ambos, OT e glutamato. Questionamos a possibilidade de que a liberação de OT induzida por hiperosmolalidade seja mediada por glutamato. Se essa hipótese for verdadeira, então glutamato poderia também induzir liberação de OT, no intuito de confirmar este fenômeno, o tecido hipotalâmico foi exposto ao glutamato (10 μ M) durante 3 minutos. Os resultados mostraram um aumento significativo na liberação de OT no sexto minuto ($p \leq 0.001$ quando comparado com valor basal) este aumento se sustentou por mais dois minutos, retornando aos valores basais após nono minutos de experimento (Figura 12).

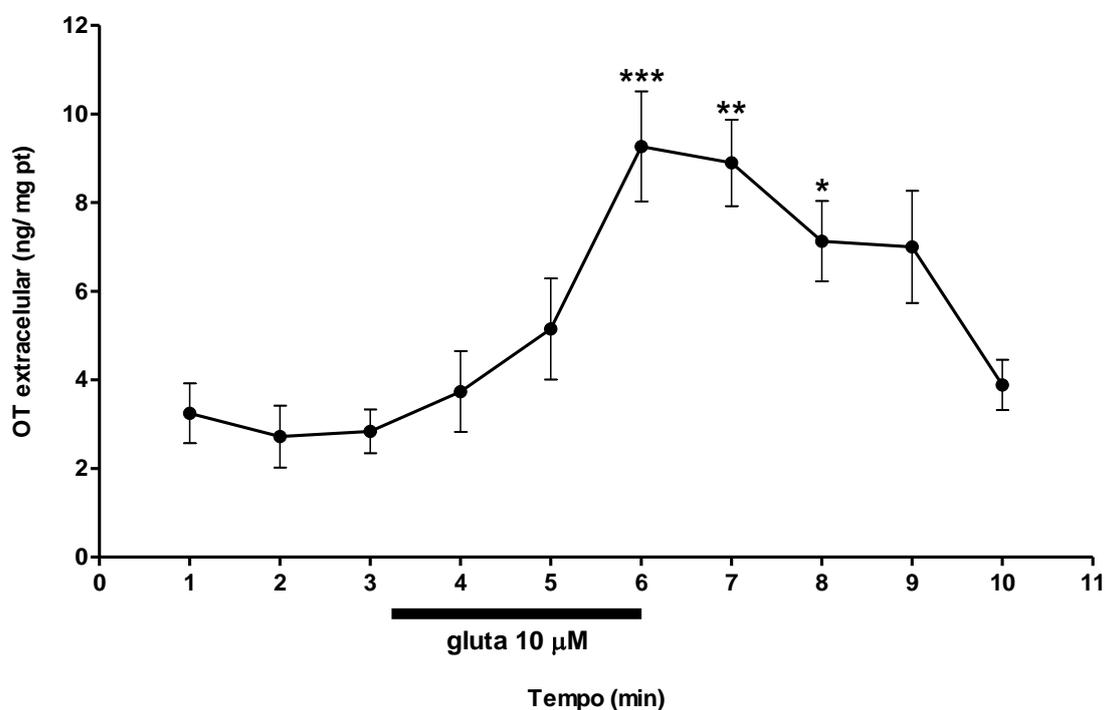
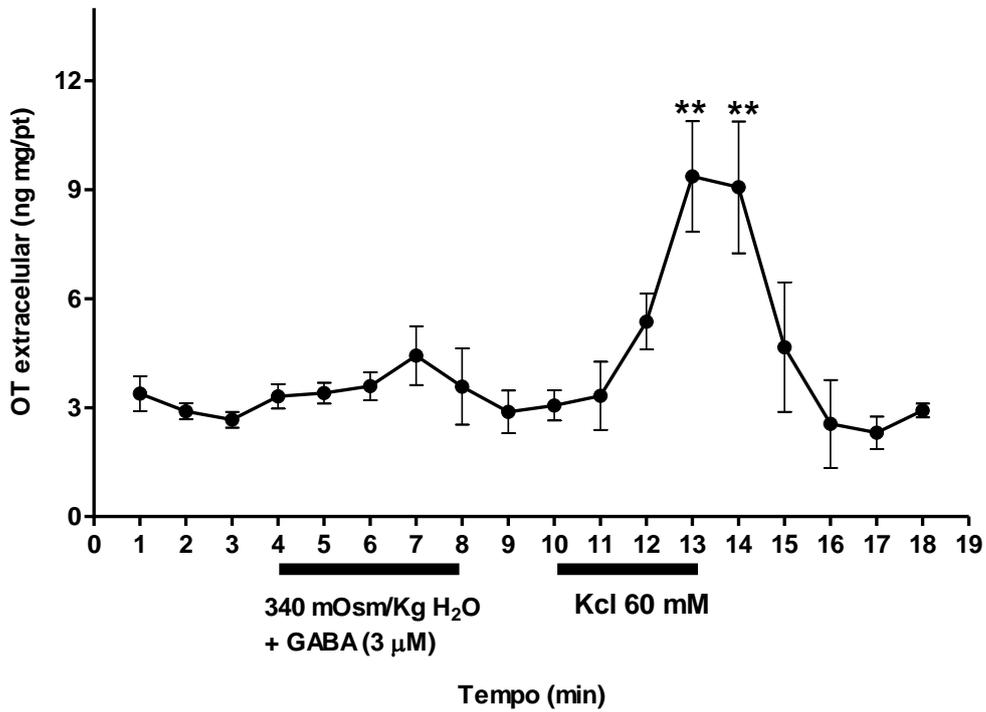


Figura 12: Efeito do glutamato (10 μ M) sobre a liberação de ocitocina. A barra com gluta 10 μ M representa o período (3 minutos) em que o hipotálamo foi exposto ao glutamato exógeno. *** $p \leq 0.001$; 6 minutos (9.2 ± 1.2 ng/mg ptn) *versus* basal. ** $p \leq 0.01$, 7 minutos (8.8 ± 1.1 ng/mg ptn) *versus* basal. * $p \leq 0.05$, 8 minutos (7.3 ± 1.2 ng/mg ptn) *versus* basal.

Efeito da adição de GABA exógeno sobre a liberação de ocitocina induzida por hiperosmolalidade

Se de fato a liberação de OT induzida por hiperosmolalidade for medida pelo glutamato, poderíamos então supor que adição de GABA durante o estímulo osmótico pode bloquear o aumento na liberação da OT, uma vez que mostramos a capacidade do GABA em bloquear o aumento dos níveis de glutamato durante a hiperosmolalidade. Para fortalecer essa relação, realizamos o experimento colocando o tecido hipotalâmico diante do meio hipertônico na presença de GABA (3 μ M) exógeno durante cinco minutos, e quantificamos a ocitocina liberada pelo tecido. O resultado mostrou que o GABA exógeno foi capaz de bloquear a liberação de OT induzida por hiperosmolalidade no minuto 8 e 9. Mantendo os níveis iguais aos valores basais (Figura 13a), minuto 8 (3.5 ± 1.0 ng/mg ptn) *versus* basal (3.3 ± 0.8 ng/mg ptn) $p > 0.05$, minuto 9 (2.8 ± 0.6 ng/mg ptn) *versus* basal (3.3 ± 0.8 ng/mg ptn) $p > 0.05$. E diferença significativa quando comparamos os níveis de OT do estímulo osmótico sem adição de GABA (figura 13 b), minuto 8 hiper (7.7 ± 1.1 ng/mg ptn) *versus* minuto 8 hiper+GABA (3.6 ± 1.0 ng/mg ptn) $p \leq 0.01$, e minuto 9 hiper (6.3 ± 1.0 ng/mg ptn) *versus* minuto 9 hiper+GABA (2.8 ± 0.5 ng/mg ptn) $p \leq 0.05$.

a)



b)

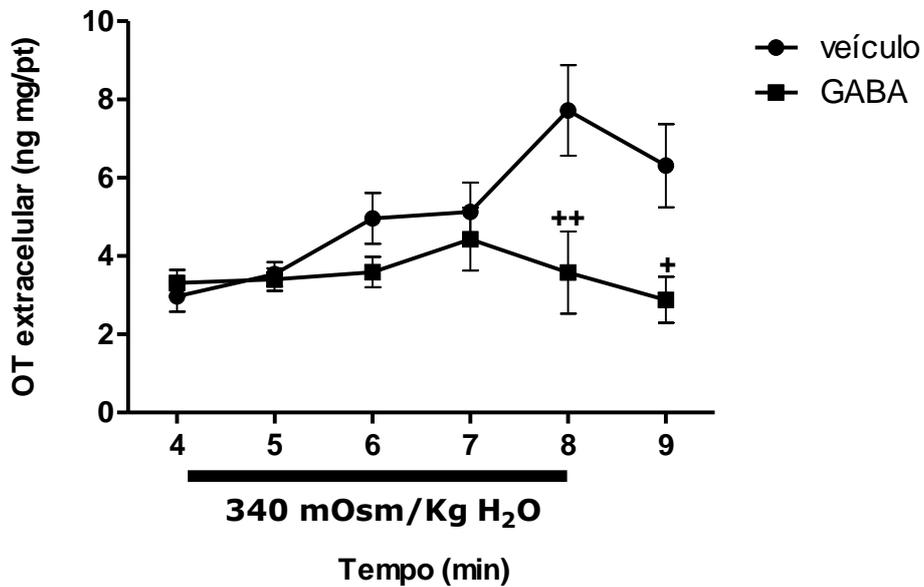


Figura 13: Efeito do GABA sobre o aumento da liberação de OT induzida por hiperosmolalidade. **a)** Barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O + GABA (3 μM) representa o período em que o hipotálamo foi exposto à hiperosmolalidade na presença do GABA exógeno, a segunda barra representa a exposição do tecido ao KCl (60 mM), no intuito de mostrar a viabilidade do tecido. Adição de GABA durante o estímulo osmótico manteve os valores iguais aos do nível basal (sem diferença estatística, $p > 0.05$). **b)** Comparação entre hiperosmolalidade mais GABA (3 μM) e hiperosmolalidade. ++ $p \leq 0.01$; minuto 8 hiper+GABA versus minuto 8 hiper, + $p \leq 0.05$; minuto 9 hiper+GABA versus minuto 9 hiper.

Efeito do agonista GABA_a sobre o aumento dos níveis extracelular de glutamato induzida por hiperosmolalidade

Após mostrar a capacidade do GABA em bloquear o efeito do meio hipertônico sobre o glutamato e ocitocina, buscamos entender qual receptor GABAérgico estaria envolvido. Neste sentido para avaliar a participação do receptor GABA_a utilizamos o agonista específico, Muscimol (1 µM) durante a hiperosmolalidade (3 minutos), e quantificamos o glutamato. O resultado mostrou que ativação do receptor GABA_a foi capaz de bloquear o aumento dos níveis extracelular de glutamato induzido por meio hipertônico, mantendo os níveis iguais aos valores basais (Figura 14a), minuto 5 (3.2 ± 0.3 ng/mg ptn) *versus* basal (3.1 ± 0.3 ng/mg ptn) $p > 0.05$, minuto 6 (3.8 ± 1.6 ng/mg ptn) *versus* basal (3.1 ± 0.3 ng/mg ptn) $p > 0.05$. E diferença significativa quando comparamos os níveis de glutamato durante estímulo osmótico sem adição de muscimol (Figura 14b); minuto 5 hiper (5.1 ± 0.2. nmol/mg ptn) *versus* minuto 5 hiper+Muscimol (3.2 ± 1.0 nmol/mg ptn) $p \leq 0.01$, e minuto 6 hiper (7.4 ± 0.4 nmol/mg ptn) *versus* minuto 6 hiper+muscimol (3.8 ± 1.6 nmol/mg ptn) $p \leq 0.05$.

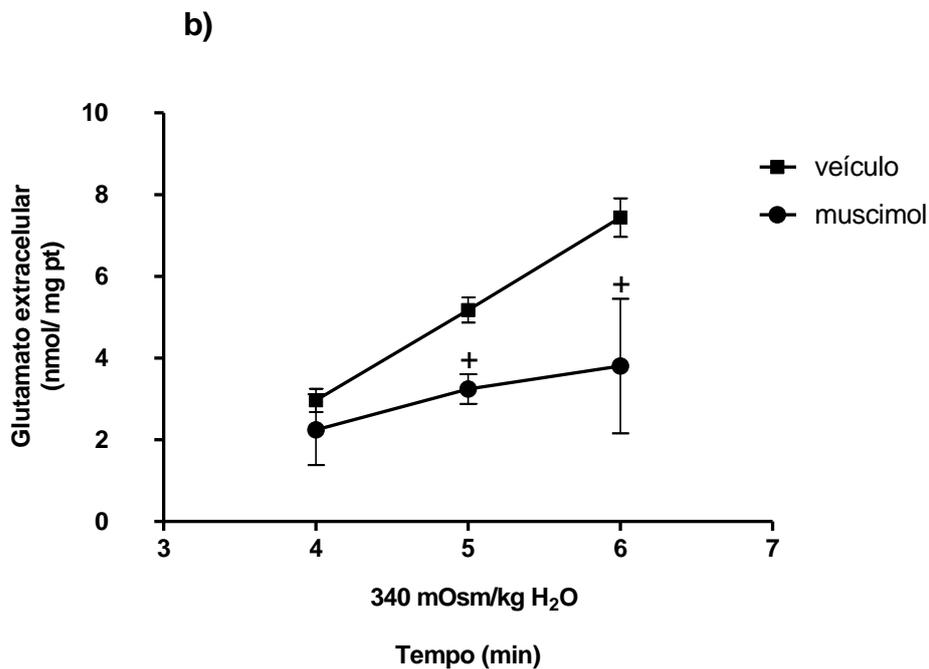
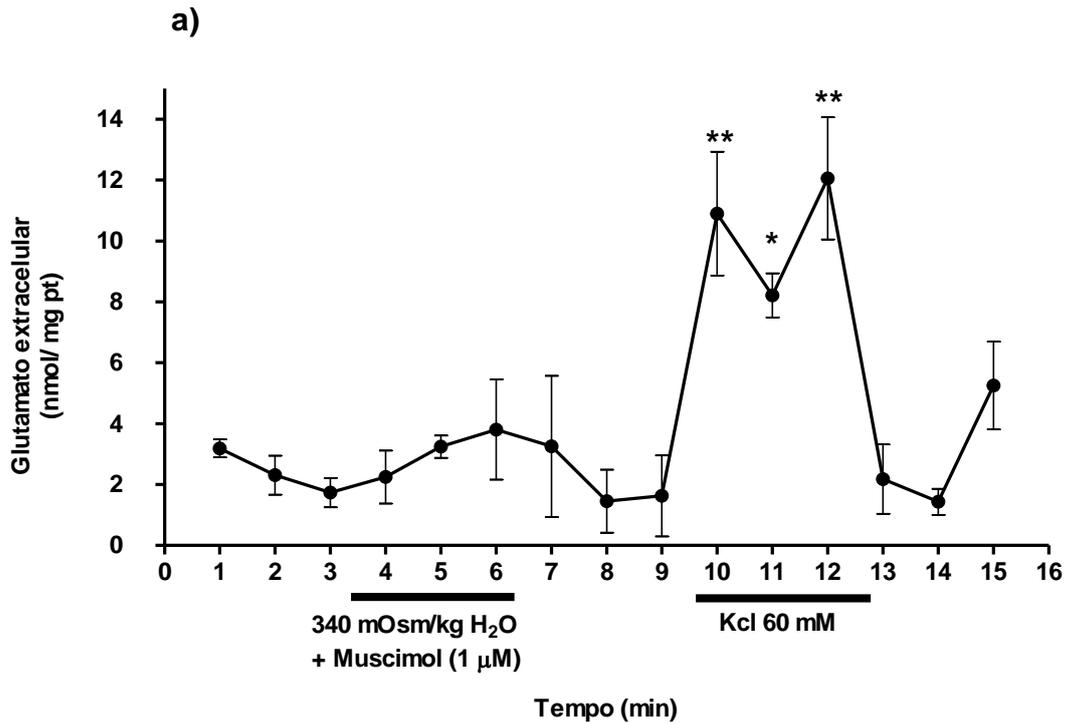


Figura 14: Efeito do muscimol sobre a elevação dos níveis de glutamato induzido por hiperosmolalidade. **a)** Barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O + Muscimol (1 μM) representa o período (3 minutos) em que o hipotálamo foi exposto à hiperosmolalidade na presença do muscimol, a segunda barra representa a exposição do tecido ao KCl (60 mM), para mostrar viabilidade do tecido. Adição de muscimol durante o estímulo osmótico manteve os valores iguais aos do nível basal (sem diferença estatística, p>0.05). **b)** Comparação entre hiperosmolalidade na presença de muscimol (1 μM) e hiperosmolalidade sem muscimol; + p≤ 0.05; 5 minutos hiper+muscimol versus hiper, + p≤ 0.05; 6 minutos hiper+muscimol versus hiper.

Efeito do agonista GABA_b sobre o aumento dos níveis extracelular de glutamato induzida por hiperosmolalidade

No sentido de avaliar a participação do receptor GABA_b utilizamos o agonista específico, baclofeno (3 μM) durante a hiperosmolalidade (3 minutos), e quantificamos o glutamato. O resultado mostrou que ativação do receptor GABA_b não foi capaz de bloquear o aumento dos níveis extracelular de glutamato induzido por meio hipertônico, os valores durante a hiperosmolalidade foram significativamente maiores que os níveis basais (Figura 15a), minuto 5 (7.2 ± 1.0 ng/mg ptn) *versus* basal (2.8 ± 0.4 ng/mg ptn) p≤0.05, minuto 6 (9.4 ± 1.9 ng/mg ptn) *versus* basal (2.8 ± 0.4 ng/mg ptn) p≤0.05. E valores iguais quando comparamos os níveis de glutamato durante estímulo osmótico sem adição de baclofeno (Figura 15b); minuto 5 hiper (5.1 ± 0.2. nmol/mg ptn) *versus* minuto 5 hiper+baclofeno (7.2 ± 1.0 nmol/mg ptn) p≤; 0.01, e minuto 6 hiper (7.4 ± 0.4 nmol/mg ptn) *versus* minuto 6 hiper+baclofeno (9.4 ± 1.9 nmol/mg ptn) p≤; 0.05.

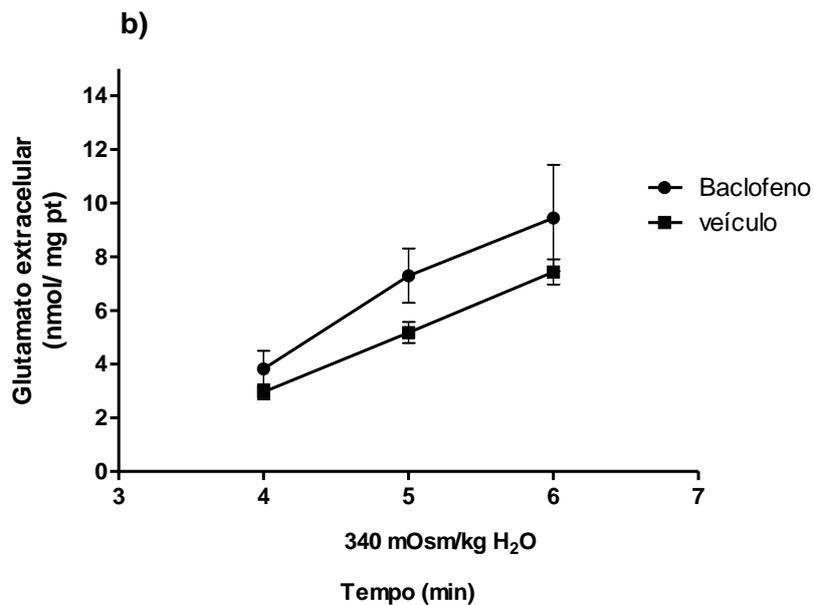
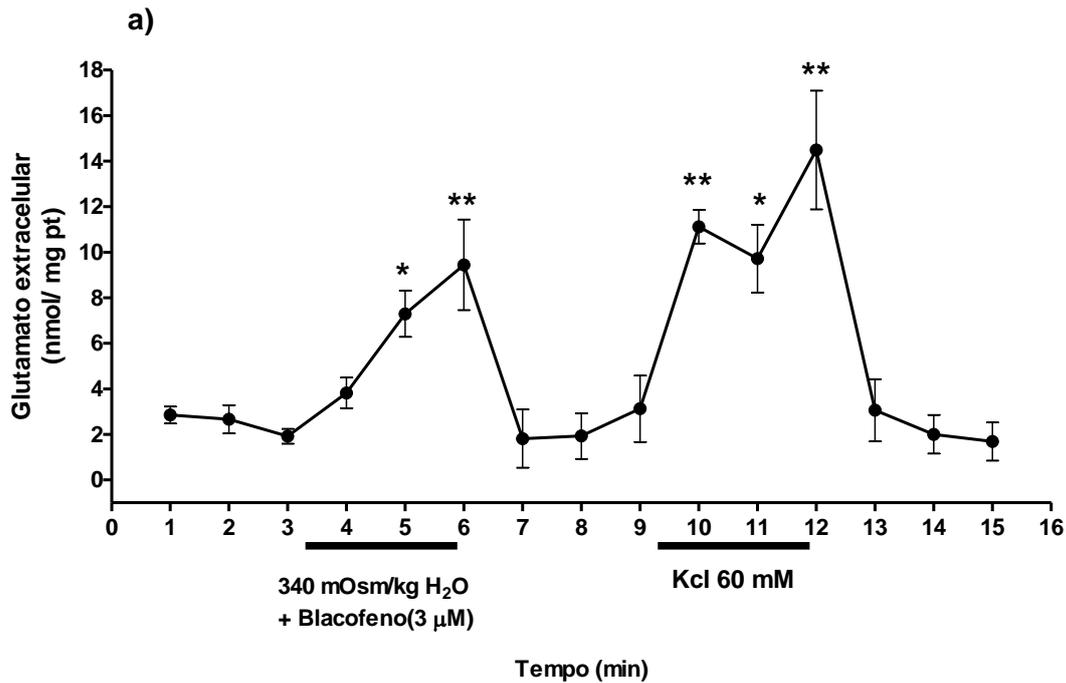
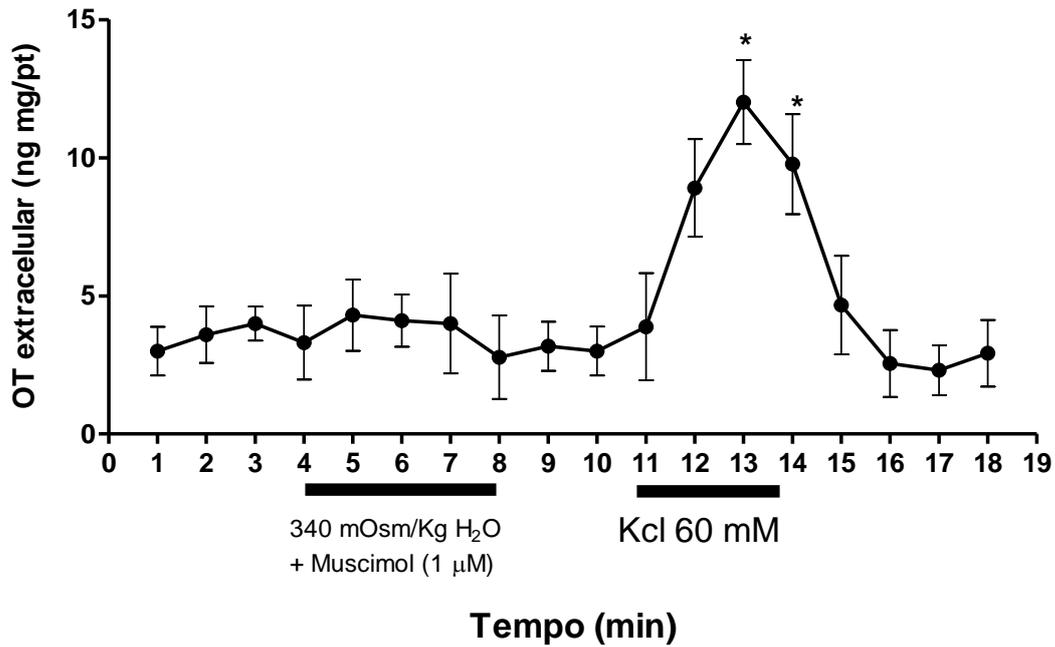


Figura 15: Efeito do baclofeno sobre a elevação dos níveis de glutamato induzido por hiperosmolalidade. **a)** Barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O + baclofeno (3 μM) representa o período (3 minutos) em que o hipotálamo foi exposto à hiperosmolalidade na presença do baclofeno, a segunda barra representa a exposição do tecido ao KCl (60 mM), para mostrar viabilidade do tecido. Adição do baclofeno durante o estímulo osmótico não alterou a liberação de glutamato. * p ≤ 0.05; 5 minutos hiper+baclofeno *versus* basal. ** p ≤ 0.01, 6 minutos hiper+baclofeno *versus* basal **b)** Comparação entre hiperosmolalidade na presença de baclofeno e somente hiperosmolalidade, não ocorreu diferença estatística em todos os tempos (p > 0.05).

Efeito do agonista GABA_a sobre a liberação de ocitocina induzida por hiperosmolalidade

Após estudar o papel dos receptores (inotrópicos e metabotrópicos) de GABA na liberação de glutamato, buscamos também entender como esses receptores estão relacionados com a liberação de OT durante a hiperosmolalidade. Neste sentido para avaliar a participação do receptor GABA_a utilizamos o agonista específico, Muscimol (1 μM) durante a hiperosmolalidade, e quantificamos o neuropeptídeo ocitocina. O resultado mostrou que ativação do receptor GABA_a foi capaz de bloquear o aumento da liberação de OT induzido por meio hipertônico, mantendo os níveis iguais aos valores basais (Figura 16a), minuto 8 (2.8 ± 1.5 ng/mg ptn) *versus* basal (3.0 ± 0.9 ng/mg ptn) p>0.05, minuto 9 (3.0 ± 1.1 ng/mg ptn) *versus* basal (3.1 ± 0.9 ng/mg ptn) p>0.05. E diferença significativa quando comparamos os níveis de OT durante o estímulo osmótico sem adição de GABA (Figura 16b), minuto 8 hiper (7.7 ± 1.1 ng/mg ptn) *versus* minuto 8 hiper+Muscimol (2.8 ± 1.5 ng/mg ptn) p≤ 0.01, e minuto 9 hiper (6.3 ± 1.0 ng/mg ptn) *versus* minuto 9 hiper+GABA (3.0 ± 1.1 ng/mg ptn) p≤ 0.05.

a)



b)

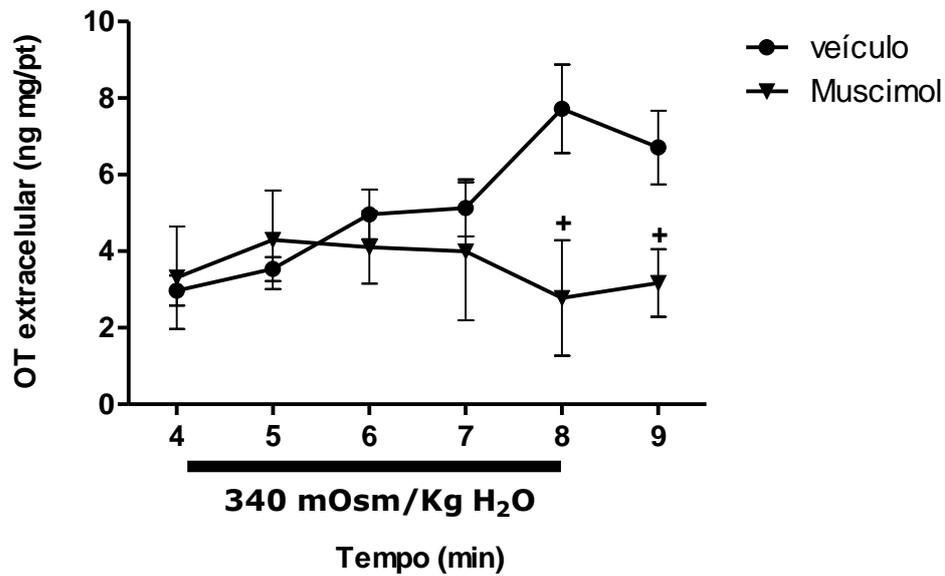
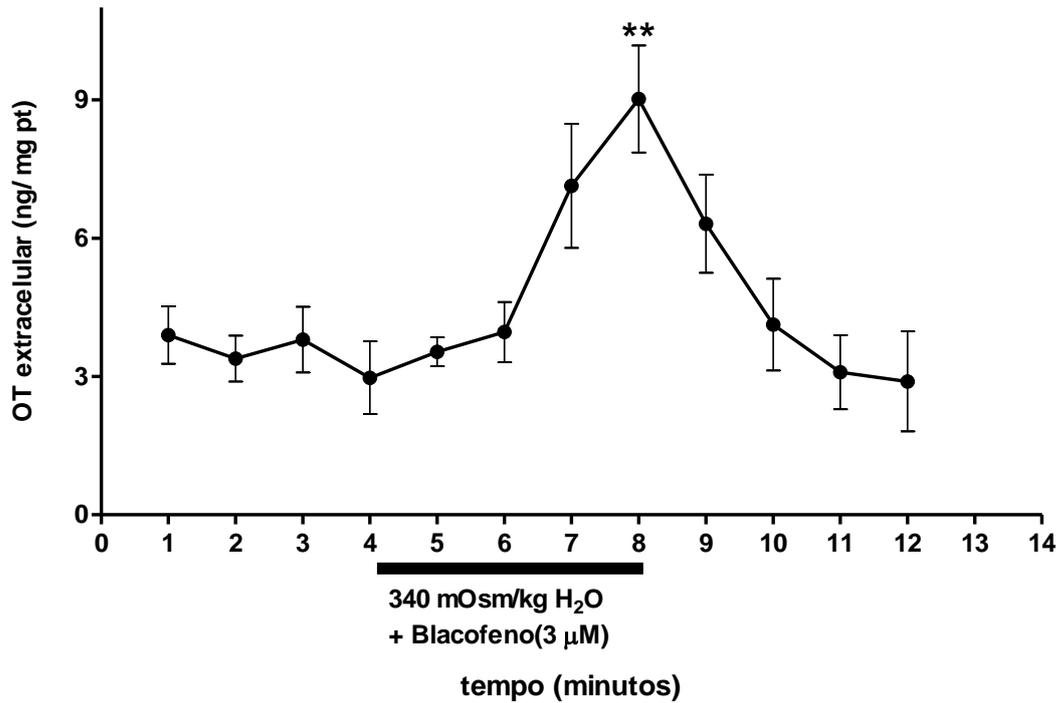


Figura 16: Efeito do muscimol sobre o aumento da liberação de OT induzida por hiperosmolalidade. **a)** Barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O + muscimol (1 μM) representa o período em que o hipotálamo foi exposto à hiperosmolalidade na presença de muscimol, a segunda barra representa a exposição do tecido ao Kcl (60 mM), com intuito de mostrar a viabilidade do tecido. Adição de muscimol durante o estímulo osmótico manteve os valores iguais aos do nível basal (sem diferença estatística, p>0.05). **b)** Comparação entre hiperosmolalidade mais muscimol (1 μM) versus hiperosmolalidade. + p≤ 0.05, minuto 8 hiper+muscimol versus minuto 8 hiper, + p≤ 0.05; minuto 9 hiper+GABA versus minuto 9 hiper.

Efeito do agonista GABA_b sobre a liberação de ocitocina induzida por hiperosmolalidade

No sentido de avaliar a participação do receptor GABA_b utilizamos o agonista específico, baclofeno (3 µM) durante a hiperosmolalidade, e quantificamos a ocitocina. O resultado mostrou que ativação do receptor GABA_b não foi capaz de bloquear o aumento da liberação de ocitocina induzida por meio hipertônico, os valores durante a hiperosmolalidade foram significativamente maiores que os níveis basais (Figura 17a), minuto 8 (9.0 ± 1.2 ng/mg ptn) *versus* basal (3.8 ± 0.8 ng/mg ptn) p≤0.05. E valores iguais quando comparamos os níveis de ocitocina durante estímulo osmótico sem adição de baclofeno (figura 17 b); minuto 8 hiper (7.7 ± 1.1. nmol/mg ptn) *versus* minuto 8 hiper+baclofeno (9.0 ± 1.2 nmol/mg ptn) p>0.05, e minuto 9 hiper (6.7 ± 0.9 nmol/mg ptn) *versus* minuto 9 hiper+baclofeno (6.3 ± 1.0 nmol/mg ptn) p>0.05.

a)



b)

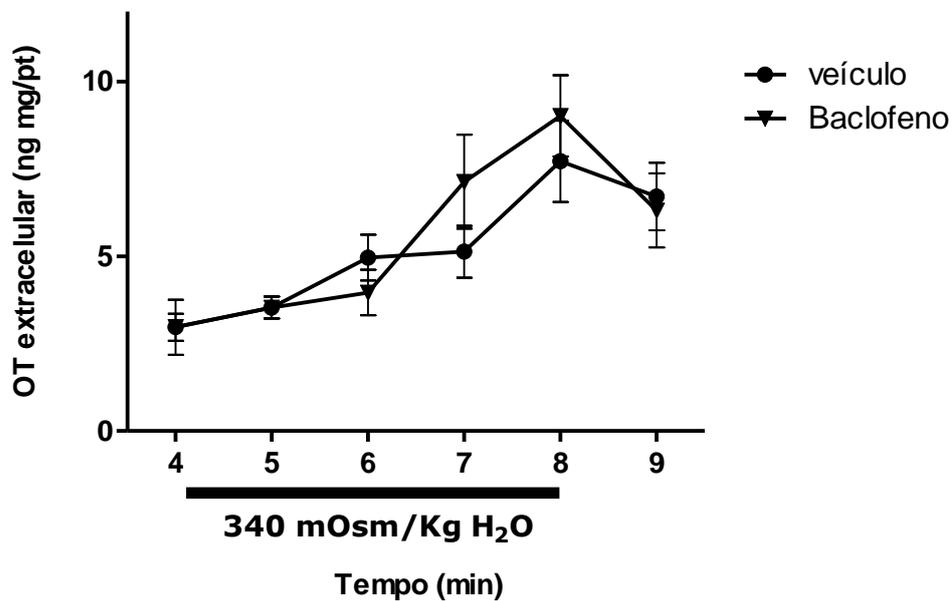


Figura 17: Efeito do baclofeno sobre o aumento da liberação de OT induzida por hiperosmolalidade. **a)** Barra com valor da osmolalidade de 340 mOsm/Kg H₂O + baclofeno (3 μM) representa o período em que o hipotálamo foi exposto à hiperosmolalidade na presença do baclofeno. Adição do baclofeno durante o estímulo osmótico não alterou a liberação de OT, ** p≤ 0.01; 8 minutos hiper+baclofeno *versus* basal. **b)** Comparação entre hiperosmolalidade na presença de baclofeno e somente hiperosmolalidade, não demonstrou diferença estatística significativa (p>0.05).

Efeito da ativação dos receptores GABA_a e GABA_b sobre os níveis basais de glutamato.

Após demonstrar o feito modulador do sistema GABAérgico sobre os níveis de glutamato durante a osmolalidade elevada, buscamos entender se este sistema também poderia regular os níveis de glutamato no ambiente isotônico. Para tal, o hipotálamo foi exposto aos agonistas específicos dos receptores GABA_a e GABA_b. Os resultados mostraram que tanto a ativação do receptor GABA_a quanto o receptor GABA_b não foi capaz de causar alterações significativas nos níveis do neurotransmissor glutamato (Tabela 04).

Tabela 4: Efeito dos agonistas GABA_a e GABA_b sobre os níveis basais de glutamato.

	Muscimol (1 µM)	Baclofeno (3 µM)
basal	1.84 ± 0.48	2.55 ± 0.51
1º minuto	1.82 ± 0.67	1.98 ± 0.57
2º minuto	2.36 ± 0.87	1.43 ± 1.17
3º minuto	1.77 ± 0.78	1.29 ± 1.01

5. Discussão

É bem descrito na literatura que o adequado balanço entre os sistemas de neurotransmissão glutamatérgico e GABAérgico, regulam varias funções no SNC de mamíferos (Decavel & Van den Pol 1990; Brann 1995; Grob *et al.*, 2003; Li *et al.*,2006). Contudo, poucos estudos são voltados para a avaliação da relação entre estes dois sistemas com a regulação da fisiologia hipotalâmica. O presente estudo procura elucidar o comportamento destes neurotransmissores no tecido hipotalâmico submetido à hiperomolalidade e sugerir como esta relação participaria do controle do equilíbrio hidroeletrólítico. Estudos recentes têm demonstrado o envolvimento desses sistemas independentemente nas respostas a alteração de osmolalidade, com destaque para: liberação de hormônios (Delmore *et al.*, 2001), regulação da atividade simpática (Li & Pan 2006), variação da pressão arterial e indução de comportamento (Brennan *et al.*,1984).

Como demonstrado nos resultados o ambiente hipertônico causou aumento significativo nos níveis de glutamato (Figura 8). Vários estudos demonstram que um dos importantes fenômenos associados à liberação de glutamato no meio são eventos despolarizantes que, neste caso, podem estar associados à hipertonicidade. A relação entre hiperosmolaridade e despolarização é fortemente sugerida por Ciura & Bourque (2006), onde é demonstrado que as células chamadas osmoreceptores expressam em sua membrana canais não seletivos para cátions sensíveis a deformação (TRPV, *transient receptor potential vanilloid*), deste modo, durante a hipertonicidade a célula perde água para o meio extracelular, ocasionando deformação de sua membrana, abrindo os canais, causando o influxo de cátions e despolarização,

podendo então levar à liberação do neurotransmissor. Essa hipótese também é fortalecida pelo achado de Grob *et al* (2003), que através do estudo histológico na região do AV3V, mostraram o aumento da probabilidade de liberação do glutamato ocasionada pelo aumento do sódio extracelular, além do aumento da expressão de c-fos dessas populações neuronais. Porém, também é amplamente descrito na literatura que outros mecanismos celulares podem disparar ou favorecer eventos despolarizantes que culminariam na liberação de glutamato. Dentre estes mecanismos podemos destacar o conteúdo de GABA na fenda sináptica. De fato é bem reconhecido que a diminuição da liberação ou aumento da captação de GABA no SNC favorece eventos despolarizantes. Como pouco é conhecido sobre o concomitante comportamento destes neurotransmissores frente ao estímulo hiperosmótico nosso trabalho tem muito a acrescentar para o conhecimento da neuroquímica hipotalâmica.

No que concerne aos nossos resultados observamos que o sistema GABAérgico responde de maneira oposta ao glutamato frente a hiperosmolalidade, (Figura 7). O mecanismo que explique este fenômeno observado em nosso trabalho ainda será fruto de avaliação, contudo, o aumento da captação do GABA induzida pelo estímulo no ambiente hipotalâmico seria uma hipótese razoável. Baseamo-nos em dois fatos principais: sabe-se que os transportadores de GABA, Na⁺ dependente, (GAT, divididos em quatro subtipos GAT1-3 e BGT-1) controlam o conteúdo deste aminoácido no espaço extracelular de diferentes regiões dos SNC (Shousboe *et al.*, 2004), incluindo o hipotálamo (Park *et al.*, 2006), e segundo, já foi demonstrado que a elevação na concentração de Na⁺ extracelular é capaz de aumentar a afinidade desses transportadores por seu substrato (GABA) (Bricho

& Grewer 2005). Deste modo poderíamos então supor que a hipertonicidade, causada pela elevação no conteúdo extracelular de Na^+ , aumentaria afinidade dos GATs localizados no hipotálamo, levando ao aumento da captação do GABA, e conseqüentemente diminuição de sua concentração extracelular. Esse possível fenômeno foi recentemente descrito em cultura de células da retina (Yahara *et al.*, 2010), tornando nossa hipótese ainda mais plausível. Entretanto, estudos que consideram o efeito do estímulo hiperosmótico na captação ou liberação de GABA são necessários para elucidar essa questão.

Embora os mecanismos envolvidos na diminuição dos níveis de GABA decorrente à hiperosmolalidade não sejam totalmente esclarecidos, parece ser esta resposta fundamental para uma adequada fisiologia do hipotálamo frente a este estímulo, posto que, fora descrito o importante papel do GABA mediando diferentes modalidades de inibição no hipotálamo sendo ela tônica ou fásica (Park *et al.*, 2006).

Esses achados demonstram efeitos opostos da hiperosmolalidade sobre os níveis de glutamato e GABA, sugerindo funções antagônicas dessas substâncias na homeostase dos fluidos corporais. E, além disso, a metodologia usada no presente estudo tornou possível, não somente a análise individual de cada neurotransmissor, mas também realizar uma caracterização da relação temporal desses aminoácidos durante a hipertonicidade, uma vez que eles foram mensurados simultaneamente (Figura 9).

Por conseguinte, quando avaliamos o curso temporal dos aminoácidos frente à hipertonicidade podemos destacar um padrão de resposta que ocorreu durante o primeiro minuto de estímulo, nesse momento tivemos uma resposta imediata do sistema GABAérgico, com diminuição significativa da concentração

deste neurotransmissor inibitório no meio, porém, sem alteração significativa nos níveis de glutamato, ou seja, o sistema glutamatérgico se torna responsivo somente após diminuição dos níveis de GABA, um retardo relativo de um minuto para a elevação dos níveis de glutamato. Esse padrão temporal de resposta, nos levou a questionar a possibilidade do sistema GABAérgico modular a liberação de glutamato no hipotálamo. Na literatura temos alguns dados que suportam nossa hipótese, por exemplo, já foi bem descrita a inibição tônica do receptor GABA_A sobre essa região (Park *et al.*, 2006) e sua modulação em importantes aspectos da homeostase dos fluidos corporais, os quais são controlados pelo sistema glutamatérgico (Li *et al.*, 2006), trabalhos usando eletrofisiologia também demonstraram diminuição da frequência de disparos, das células hipotalâmicas na presença do GABA e/ou seus agonistas (Park *et al.*, 2007; Kabashima *et al.*, 1997). Nossa hipótese é fortalecida por estudos morfológicos da citoarquitetura de células GABAérgicas e glutamaérgicas nos principais núcleos hipotalâmicas (Grob *et al.*, 2003).

Buscando então confirmar essa ação GABAérgica inibitória sobre a liberação de glutamato, questionamos o que aconteceria se o níveis de GABA fossem mantidos durante a hipertonicidade. Assim, experimentos com a adição de GABA exógeno durante o período de tempo em que o tecido foi exposto ao ambiente hipertônico resultou no bloqueio da liberação de glutamato induzida por meio hipertônico (Figura 10 a e b). Esse achado confirma a modulação GABAérgica sobre a liberação de glutamato induzida por hiperosmolaridade, contribuindo em parte para o esclarecimento da neuroquímica hipotalâmica sob condição hipertônica, uma vez que tal fenômeno ainda não havia sido descrito. Além disso, como nossos experimentos também mostraram que esta ação é

mediada pelo receptor GABA_A (Figura 14 a e b), sem envolvimento do receptor GABA_B (Figura 15 a e b), e considerando que a ativação do receptor inotrópico pode gerar influxo de íons cloreto, ocasionando hiperpolarização da membrana e reduzindo a probabilidade de que estímulos excitatórios possam iniciar potenciais de ação (Farrant & Nusser, 2005), podemos supor que isso seria suficiente para anular ou diminuir a capacidade de resposta da célula osmoreceptora, mesmo com abertura de canais de cátions sensíveis a deformação (Ciura & Bourque, 2006), e consequente influxo de cátions, ocasionada pela hiperosmolalidade. Porém mais estudos são necessários para estabelecer os mecanismos que envolvem a modulação do sistema GABAérgico no hipotálamo, na condição hipertônica.

Neste ponto, os principais resultados desse estudo, permitem postular um novo mecanismo para a liberação de glutamato mediada por osmolalidade elevada. Considerando o GABA como o principal mediador inibitório no hipotálamo (Li *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2006), o qual controla a excitabilidade local (Mason *et al.*, 1986), podemos supor, que a diminuição de seus níveis extracelulares durante a hipertonidade, descrita no presente estudo, poderia sozinha já causar elevação dos níveis de glutamato (sem o envolvimento dos TRPVs), o que em parte, explicaria a relação temporal da resposta desses dois sistemas (GABAérgico e glutamatérgico) na hipertonidade. E de fato, essa hipótese é reforçada pelo estudo de Li *et al.* (2006) que mostrou que o aplicação da bicuculina (antagonista GABA_A) na condição isotônica promove aumento dos níveis de glutamato. Ou seja, o bloqueio deste receptor somente, já é suficiente para aumentar os níveis do aminoácido excitatório, pois no ambiente isotônico (observado no trabalho de Li *et al.*, 2006) não temos

abertura dos canais de cátion (TRPV), decorrente da desidratação celular, que ocorre somente em condições hipertônicas. Na literatura atual, o mecanismo envolvendo os TRPVs é postulado como a principal explicação para o aumento da excitabilidade neuronal hipotalâmica durante hipertonicidade (Ciura & Bourque, 2006; Sharif-Naeni *et al.*, 2008), e nosso achado, não anula ou desqualifica essa teoria, podemos supor que o mecanismo relacionado ao sistema GABAérgico pode ser um facilitador da resposta, ou talvez um gatilho inicial. Nesse ponto dependendo de qual evento poderia ocorrer primeiro: a diminuição dos níveis GABA ou alteração do volume celular (e consequente abertura dos TRPVs).

Além disso, supondo a importância do sistema GABAérgico nessa resposta, e se a diminuição do GABA durante a hiperosmolalidade ocorrer através dos GATs, fica evidente que que esses transportadores teriam um papel chave na fisiologia do equilíbrio hidro eletrolítico, alcançando uma nova importância na fisiologia hipotalâmica, semelhante aos TRPVs que vêm sendo colocados como canais osmoreguladores (Liedtke 2006; Sharif-Naeni *et al.*, 2008). É bem provável, que de fato esses transportadores possam estar envolvidos na resposta à osmolalidade, pois explicariam a diferença na magnitude da resposta de solução osmoticamente equivalente com Na^+ , que apresentam uma resposta de maior magnitude, em relação a soluções com açúcares, com menor eficiência na resposta (Bourque & Oliet 1997). Uma vez que somente o Na^+ pode aumentar a afinidade dos GATs (Bricho & Grewer 2005), anulando nessa condição a atuação do receptor GABA_A decorrente da diminuição dos níveis de GABA extracelular, o que não ocorre no ambiente hipertônico causado por açúcares, ou seja ao que parece a ativação do

receptor inotrópico de GABA pode prejudicar a resposta hipotalâmica à osmolalidade.

Os achados descritos no presente trabalho fornecem novas informações para o entendimento da resposta neuroquímica hipotalâmica à hiperosmolalidade, esses indicam novos mecanismos, os quais abrem caminho para futuros estudos no campo de neurociência, em especial da neuroquímica, apenas este fato já é de grande relevância, entretanto, devido à peculiaridade dessa região do SNC, a qual controla varias funções sistêmicas, os achados neuroquímicos ganham verdadeiro sentido, principalmente campo da fisiologia, quando buscamos entender sua relação com as respostas sistêmicas desencadeadas pelo estímulo osmótico, ou seja, temos a oportunidade buscar entender como os níveis desses neurotransmissores podem se relacionar e influenciar a liberação de um hormônio, tal como a ocitocina. Para tal, primeiramente, demonstramos a capacidade da hiperosmolalidade em aumentar a liberação de OT, como se pode observar na Figura 11. Este achado confirma trabalhos anteriores (Balment *et al.*, 1980), que demonstram que a osmolalidade é um importante estímulo para liberação de OT em ratos, e primordialmente no contexto do nosso estudo, mostra que a metodologia empregada no presente trabalho é adequada tanto para análise dos aminoácidos bem como do neuropeptídeo OT. Desta maneira, relacionando aminoácidos e OT, evidenciamos a liberação prévia do glutamato à secreção da ocitocina estimulada por hipertonidade, levando-nos a sugerir que o glutamato possa mediar a secreção de ocitocina, colabora com nossa interpretação o fato de que já foi descrito a presença de receptores de glutamato nas células ocitocinérgicas (Busnardo *et al.*, 2012). Assim, com o

intuito de fortalecer essa possibilidade o tecido hipotalâmico foi exposto ao glutamato em ambiente isotônico, o qual induziu aumento significativo na liberação de OT (Figura 12), confirmando achados anteriores por estudos in vivo (Busnardo *et al.*, 2012) ou in vitro (Delmore *et al.*, 2001), os quais mostraram que tanto receptores ionotrópicos como metabotrópicos de glutamato estimularam a liberação de ocitocina. Sugerindo o envolvimento do sistema glutamatérgico na ativação de neurônios secretores de OT durante a hiperosmolalidade.

Quando comparamos o padrão de liberação de OT induzida por glutamato e o induzido por meio hipertônico, podemos notar uma diferença temporal. Aparentemente a adição do glutamato foi capaz de gerar uma liberação sustentada por mais tempo (Figura 12), sugerindo a participação de receptores metabotrópicos. Entretanto, surpreendentemente na hiperosmolalidade (Figura 11) parece não haver a participação desses receptores, indicando primordialmente um componente ionotrópico. Essa hipótese é reforçada pelo estudo de Delmore e colaboradores (2001), o qual mostrou a capacidade dos receptores metabotrópicos de glutamato em liberar OT, porém o uso dos antagonistas desses receptores não reduzem ou bloqueiam a liberação de OT induzida por hiperosmolalidade. Entretanto, mais estudos são necessários neste sentido.

Apesar de não sabermos com clareza qual receptor pode estar envolvido, nosso estudo sugere um papel importante para o sistema glutamatérgico na liberação de OT frente à hiperosmolalidade, além disso, tendo em vista que ele é considerado o principal neurotransmissor na região hipotalâmica (Van Den Pol *et al.*, 1990), e a capacidade do GABA em bloquear

sua liberação por hiperosmolalidade (descrita no presente estudo), podemos supor que adição de GABA exógeno durante o estímulo osmótico poderia então bloquear o aumento na liberação de OT. Para esclarecer este aspecto, realizamos o experimento, o qual confirmou nossa hipótese, demonstrando a capacidade do GABA em bloquear também a liberação de OT (figura 13). Este achado sugere que o sistema glutamatérgico, se não for o principal, pode ser um dos principais mediadores da liberação de OT induzida por osmolalidade elevada. Entretanto, não podemos excluir também uma ação direta da via GABAérgica sobre os neurônios ocitocinergicos, visto que esses expressam receptores para GABA (Brussaard *et al.*, 1997; Kabashima *et al.*, 1997; Li). Oportunamente, vale destacar que a principal colaboração do presente resultado é resaltar a importância do adequado balanço entre vias excitatórias e inibitórias bem como a própria interação GABA/glutamato na regulação da excitabilidade neuronal no hipotálamo.

Os mecanismos bioquímicos envolvidos na liberação de ocitocina foram amplamente estudados e tema de revisão na literatura atual (Tobin *et al.*, 2012), porém no que concerne a liberação induzida por osmolalidade elevada, temos ainda alguns aspectos não totalmente esclarecidos, incluindo sua modulação. Classicamente é relatada a dependência e o importante papel das células osmorreceptoras para liberação desse peptídeo (Summy-Long & Kadekaro 2001; Andersson & Mccann 1956). Entretanto, recentemente, vem sendo descrito uma resposta intrínsecas dos neurônios ocitocinérgicos frente à hiperosmolalidade (Meeker, 2002; Bourque *et al.*, 1994), sugerindo que essas células possam responder diretamente a variações de osmolalidade, porém o papel fisiológico desses achados, na regulação dos fluidos corporais, são

questionáveis e não totalmente esclarecidas, uma vez que lesão nos núcleos onde encontramos as células osmoreceptoras abolem quaisquer respostas a osmolalidade elevada, incluindo a liberação de ocitocina (Oliveira *et al.*, 2004).

Em nosso estudo, observamos um padrão de resposta temporal bem como de inibição pelo sistema GABAérgico, que sugere que a liberação de OT ocorra principalmente pela ação de inputs extrínsecos glutamatérgicos, sem participação aparente de uma resposta intrínseca das células secretoras de OT. Por um lado temos o receptor GABA_A bloqueando a liberação de OT (Figura 18), o que nos permite supor que tal fenômeno ocorra em consequência da próprio bloqueio da liberação do glutamato, e de fato, estudos mostraram que os antagonistas dos receptores de glutamato bloqueiam muitas respostas à osmolalidade elevada, entre elas destacamos a liberação dos neuropeptídeos AVP e OT (Onaka & Yagi 2001). Reforçando o papel central das vias glutamatérgicas na resposta hipotalâmica ao aumento do conteúdo de sódio extracelular. Oportunamente, também podemos supor o envolvendo da inibição tônica do receptor GABA_A nesta modulação, pois quando adicionamos o agonista do GABA_A em ambiente isotônico não tivemos alterações significativas nos níveis de glutamato (Tabela 4), sugerindo que durante o estado basal os níveis de GABA são suficientes para ativar continuamente o referido receptor. Essa interpretação é reforçada pelo estudo de Li e colaboradores (2006) que mostrou que o aplicação da bicuculina (antagonista GABA_A) no ambiente isotônico induz aumento dos níveis de glutamato.

Ainda avaliando o sistema GABAérgico, mostramos que o receptor GABA_B não bloqueia a liberação do hormônio (Figura 17), resultado aparentemente controverso diante do documentado papel deste receptor

metabotrópico na modulação da liberação de OT durante a amamentação (Richards *et al.*, 2005), ao que parece então a capacidade intrínseca dessas células em responder à osmolalidade elevada (Meeker, 2002) atua em conjunto com os *inputs* glutamatérgicos extrínsecos diferenciando a capacidade de resposta do neurônio ocitocinérgico diante desses dois estímulos; osmolalidade elevada e amamentação. Nossa hipótese ainda não esclarece o verdadeiro papel dessa resposta intrínseca dos neurônios ocitocinérgicos, mas, apesar da abertura desses canais sensíveis a deformação, nessas células, não ser capaz de gerar uma despolarização substancial (Meeker, 2002), é possível que ele facilite atuação de sinapses excitatórias. Esses dados juntos sugerem que o receptor GABA_b pode estar envolvido em outros aspectos da fisiologia hipotalâmica mediada pela ocitocina, porém, em decorrências das propriedades intrínsecas dos neurônios ocitocinérgicos, não participa significativa na regulação da homeostase dos fluidos corporais.

Em conclusão, os achados descritos no presente estudo permitem descrever uma sequência de eventos neuroquímicos desencadeados pela hipertonidade, os quais culminam com a liberação de OT. Primeiramente, no ambiente isotônico encontramos concentrações de GABA suficientes para manter uma inibição tônica, mediada pelo receptor GABA_A, sobre a liberação de glutamato, e, deste modo a própria excitabilidade hipotalâmica. Finalmente, este estudo contribuiu com evidências *in vitro* que suportam a hipótese de que a liberação de ocitocina estimulada por hipertonidade depende da relação GABA/glutamato favorável ao glutamato para ocorrer. Uma vez instalada a condição de hiperosmolalidade (Figura 18 a), observamos a diminuição imediata dos níveis do neurotransmissor GABA, que conseqüentemente elimina/diminui a inibição tônica presente no estado basal (Figura 18 b), sucedido pelo aumento dos níveis de glutamato, o que inverteu a relação GABA/glutamato anterior, tornando as vias excitatórias predominantes no tecido hipotalâmico (Figura 18 c), e os níveis elevados de glutamato resultaram na liberação de OT.

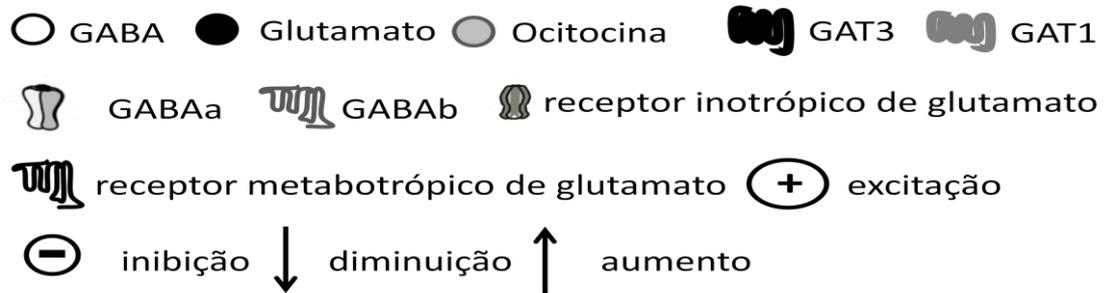
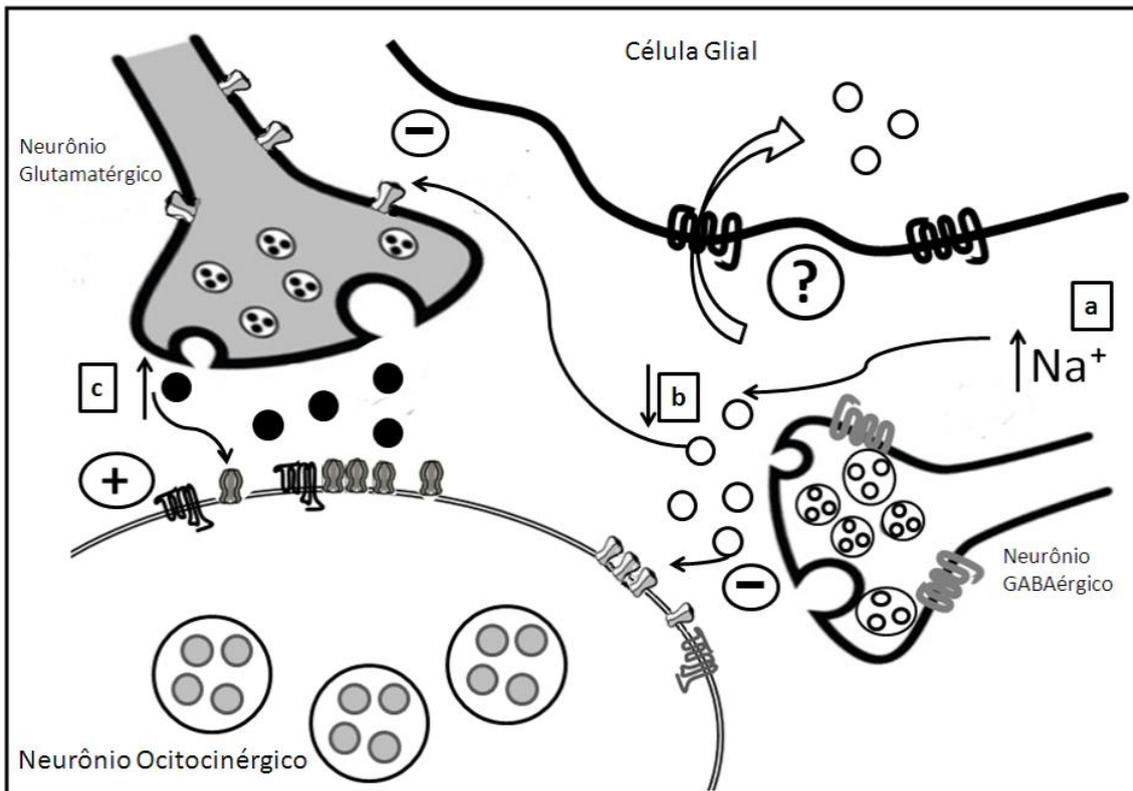


Figura 18: Eventos neuroquímicos desencadeados pela hipertonicidade. Esquemáticamente representados, a) Aumento da osmolalidade extracelular. b) Diminuição do neurotransmissor GABA. c) Aumento dos níveis de glutamato, que culminam no aumento da liberação de ocitocina.

6 REFERÊNCIAS

ANDERSSON B AND MCCANN SM. Effect of hypothalamic lesions on water intake of dog. **Acta Physiol Scand.** 35: 313-320, 1956.

AL-GHOUL WM., MEEKER RB., GREENWOOD RS. Differential expression of five *N*-methyl-D-aspartate receptor subunit mRNAs in vasopressin and oxytocin neuroendocrine cells. **Brain Res Mol Brain Res.** 44:262–272. 1997.

BAK LK., SCHOUSBOE A., WAAGEPETERSEN HS. The glutamate/GABA-glutamine cycle: aspects of transport, neurotransmitter homeostasis and ammonia transfer. **Journal of Neurochemistry.** 98: 641–653. 2006.

BALMENT JR., BRIMBLET MJ., FORSLING ML. Release of oxytocin induced by salt loading and its influence on renal excretion in the male rat. **J. Physiol.** 308: 439-449. 1980.

BISSET GW., CHOWDREY HS., FAIRFALL., GUNN K. Central inhibition by γ -aminobutyric acid and muscimol of the release of vasopressin and oxytocin by an osmotic stimulus in the rat. **J Pharmacol.** 99: 529-535. 1990.

BLACKBURN RE., SAMSON WK., FULTON RJ., STRICKER EM., VERBALIS JG. Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: Evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 90: 10380-4. 1993.

BOURQUE CW., OLIET SH., RICHARD D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. **Front Neuroendocrinol.** 15(3); 231-74. 1994.

BOURQUE CW & OLIET SH. Osmoreceptors in the central nervous system. **Ann Rev Physiol.** 59: 601-619. 1997.

BURFORD GD., DYBALL REJ., MOSS RL., PICKETING BT. Synthesis of both neurohypophysial hormones in both paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **J Anat.** 117: 261-269. 1974.

BURNS PD., TSAI SJ., WILTBANK MC., HAYES SH., GRAF GA., SILVIA WJ. Effect of oxytocin on concentrations of prostaglandin H synthase-2 mRNA in ovine endometrial tissue in vivo. **Endocrinology.** 138: 5637-5640. 1997.

BUSNARDO C., CRESTANI CC., RESSTEL LB., TAVARES RF., ANTUNES-RODRIGUES J., CORRÊA FM. Ionotropic glutamate receptors in hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei mediate vasopressin and oxytocin release in unanesthetized rats. **Endocrinology.** 153 (5): 2323-31. 2012.

BRANN DW. Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. **Neuroendocrinology.** 61: 213–225. 1995.

BRENNAN TJ., MORRIS M., HAYWOOD JR. GABA agonists inhibit central sodium-induced vasopressin-dependent increases in arterial pressure. **Eur. J. Pharmacol.** 103: 223–234. 1984.

BRUSSAARD AB., KITS KS., BAKER RE., WILLEMS WP., LEYTING-VERMEULEN JW., VOORN P., SMIT AB., BICKNELL RJ., HERBISON AE. Plasticity in fast synaptic inhibition of adult oxytocin neurons caused by switch in GABAA receptor subunit expression. **Neuron.** 19: 1103–1114. 1997.

BICHO A & GREWER C. Rapid Substrate-Induced Charge Movements of the GABA Transporter GAT1. **Biophysical Journal.** 89: 211-231. 2005.

CARSON DS., GUASTELLA AJ., TAYLOR ER., MCGREGOR IS. A brief history of oxytocin and its role in modulating psychostimulant effects. **J Psychopharmacol.** 27: 231-47. 2013.

CIURA S & BOURQUE CW. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in Organum Vasculosum Lamina Terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. **The journal of neuroscience.** 26: 9069-9075. 2006.

CUNNINGHAM ETJR & SAWCHENKO PE. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. **Trends Neurosci.** 14: 406–410. 1991.

CROWLEY WR., ARMSTRONG WE. Neurochemical regulation of oxytocin secretion during lactation. **Endocr Rev.** 13: 33–65, 1992.

DECAVEL C & VAN DEN POL AN. GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. **Journal of Comparative Neurology.** 302: 1019-1037. 1990.

DALE HH. The action of extracts of the pituitary body. **Biochem J.** 4: 427–447. 1909.

DELMORE J., MORSETTE., HANNA SIDOROWICZ., CELIA D. SLADEK. Role of metabotropic glutamate receptors in vasopressin and oxytocin release. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** 281: R452–R458. 2001.

FARRANT M & NUSSER Z. Variations on an inhibitory theme: phasic and tonic activation of GABA_A receptors. **Nature Reviews.** 6: 215-229. 2005.

FAVARETTO AL., BALEEJO GO., ALBUQUERQUE-ARAÚJO WI., GUTKOWSKA J., ANTUNES-RIDRIGUES J., MCCANN SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. **Peptides**. 18(9): 1377-81. 1997.

FITZSIMONS JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**. 78: 583-686, 1998.

GOMES DA., GIUSTI-PAIVA A., VENTURA RR., ELIAS LL., CUNHA FQ., ANTUNES-RODRIGUES J. Carbon monoxide and nitric oxide modulate hyperosmolality-induced oxytocin secretion by the hypothalamus in vitro. **Biosci Rep**. 30: 351-357. 2010.

GROB M., TROTTIER JF., DROLET G., MOUGINOT D. Characterization of the neurochemical content of neuronal populations of the lamina terminalis activated by acute hydromineral challenge. **Neuroscience**. 122; 247-57. 2003.

GROSSMAN SP. A neuropharmacological analysis of hypothalamic and extrahypothalamic mechanisms concerned with the regulation of food and water intake. **Ann N Y Acad Sci**. 157; 902-917, 1969.

HENDRY C., FARLEY A., MCLAFFERTY E. Introduction to the life sciences series and homeostasis. **Nurs Stand**. 26; 46.

HO JM., ZIERATH DK., SAVOS AV., FEMIANO DJ., BASSETT JE., MCKINLEY MJ., FITTS DA. Differential effects of intravenous hyperosmotic solutes on drinking latency and c-Fos expression in the circumventricular organs and hypothalamus of the rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**. 292: 1690-1698. 2007.

HUSSY N., DELEUZE C., DESARMÉNIEN MG., MOOS FC. Osmotic regulation of neuronal activity: a new role for taurine and glial cells in a hypothalamic neuroendocrine structure. **Prog Neurobiol.** 62 (2); 113-34. 2000.

JIANG S., YUAN H., DUAN L., CAO R., GAO B., XIONG YF., RAO ZR. Glutamate release through connexin 43 by cultured astrocytes in a stimulated hypertonicity model. **Brain Res.** 1392: 9-15. 2011.

KABASHIMA N., SHIBUYA I., IBRAHIM N., UETA Y., YAMASHITA H. Inhibition of spontaneous EPSCs and IPSCs by presynaptic GABA_B receptors on rat supraoptic magnocellular neurons. **J Physiol.** 504: 113-126. 1997.

KASAI M., OSAKA T., INENAGA K., KANNAN H. & YAMASHITA H. γ -Aminobutyric acid antagonist blocks baroreceptor-activated inhibition of neurosecretory cells in the hypothalamic paraventricular nucleus of rats. **Neuroscience Letters.** 81: 319-324. 1987.

KAWASAKI M., PONZIO TA., YUE C., FIELDS RL., GAINER H. Neurotransmitter regulation of c-fos and vasopressin gene expression in the rat supraoptic nucleus. **Exp Neurol.** 219: 212-222. 2009.

LENG G., BROWN CH., BULL PM., BROWN D., SCULLION S., CURRIE J., BLACKBURN RE., FENQ J., ONAKA T., VERBALIS JG., RUSSELL JA., LUDWIG M. Responses of magnocellular neurons to osmotic stimulation involves coactivation of excitatory and inhibitory input: an experimental and theoretical analysis. **J Neurosci.** 21: 6967-6977. 2001.

LI DP & PAN HL. Role of gamma Aminobutyric Acid (GABA)_A and GABA_B Receptors in Paraventricular Nucleus in Control of Sympathetic Vasomotor Tone in Hypertension. **J Pharmacol Exp Ther.** 320(2): 615-626. 2006.

LI DP & PAN HL. Plasticity of GABAergic control of hypothalamic presympathetic neurons in hypertension. **Am J Physiol.** 290: 1110-1119. 2006 B.

LI YF., JACKSON KL., STERN JE., RABELER B., PATEL KP. Interaction between glutamate and GABA systems in the sympathetic outflow by the paraventricular nucleus of the hypothalamus. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.** 291 (6); 2847-56. 2006.

LIEDTKE W. Transient receptor potential vanilloid channels functioning in transduction of osmotic stimuli. **J Endocrinol.** 191: 515-523. 2006.

MASON WT., POULAIN D., COBBETT P. γ -Aminobutyric acid as an inhibitory neurotransmitter in the rat supraoptic nucleus: intracellular Recordings in the hypothalamic slice. **Neuroscience Letters.** 73: 259-265. 1987.

MATEOS JM., AZKUE J., BENITEZ R., SARRIA R., LOSADA J., CONQUET F., FERRAGUTI F., KUHN R., KNOPFEL T., GRANDES P. Immunocytochemical localization of the mGluR1b metabotropic glutamate receptor in the rat hypothalamus. **J Comp Neurol.** 390: 225–233. 1998.

MARGATHO LO, BARBOSA SL, DE LUCA JR, MENANI JV. Central serotonergic and adrenergic / imidazoline inhibitory mechanisms on sodium and water intake. **Brain Research.** 956: 103-109. 2002.

MARK, L., ZEIDEL, M.D. Water homeostasis: evolutionary medicine. **Trans Am Clin Climatol Assoc.** 123: 93-105. 2012.

MCCARTHY MM., MASTERS DB., RIMVALL K., SCHWARTZ-GIBLIN S., PFAFF DW. Intracerebral administration of antisense oligodeoxynucleotides to GAD65 and GAD67 mRNAs modulate reproductive behavior in the female rat. **Brain Res.** 636: 209-220. 1994.

MENEZES MF., BARBOSA SP., DE ANDRADE CA., MENANI JV., DE PAULA PM. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. **Brain Res.** 4;1372: 49-58. 2011.

MEEKER RB, GREENWOOD RS, HAYWARD JN. Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary. **Endocrinology.** 134:621–629. 1994.

MEEKER RB. Metabotropic and NMDA glutamate receptor interaction with osmotic stimuli in supraoptic neurons. **Pharmacol Biochem Behav.** 73(2): 475-484. 2002.

MORSETTE DJ., SIDOROWICZ H., SLADEK CD. Role of metabotropic glutamate receptors in vasopressin and oxytocin release. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 281 (2): 452-8. 2001.

MYERS B., MARK DOLGAS C., KASCKOW J., CULLINAN WE., HERMAN JP. Central stress-integrative circuits: forebrain glutamatergic and GABAergic projections to the dorsomedialhypothalamus, medial preoptic area, and bed nucleus of the stria terminalis. **Brain Struct Funct.** 2013.

NICOLL RA. AND BARKER JL. The pharmacology of recurrent inhibition in the supraoptic neurosecretory system. **Brain Res.** 35; 501-511. 1971.

NISSEN R., HU B., RENAUD LP. N-Methyl-D-aspartate receptor antagonist ketamine selectively attenuates spontaneous phasic activity of supraoptic vasopressin neurons in vivo. **Neuroscience.** 59: 115–120. 1994.

ONAKA T & YAGI K. Involvement of N-methyl-D-aspartic acid receptor activation in oxytocin and vasopressin release after osmotic stimuli in rats. **J Endocrinol.** 13(2): 166-174. 2001.

OLIVEIRA GR., FRANCI CR., RODOVALHO GV., FRANCI JA., MORRIS M., ROCHA MJ. Alterations in the central vasopressin and oxytocin axis after lesion of brain osmotic sensory region. **Brain Res Bull.** 64(6): 515-520. 2004.

Ott I & Scott JC. The action of infundibulum upon mammary secretion. **Proc Soc Exper Biol Med.** 8: 48–49. 1910.

PATIENCE S. Understanding the relationship between salt intake and hypertension. **Nurs Stand.** 27; 45-47. 2013.

PARKER SL., CROWLEY WR. Stimulation of oxytocin release in the lactating rat by central excitatory amino acid mechanisms: evidence for specific involvement of R,S- α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid-sensitive glutamate receptors. **Endocrinology.** 133: 2847–2854. 1993.

PARK JB, SKALSKA S, STERN JE. Characterization of a novel tonic GABA_A receptor-mediated inhibition in magnocellular neurosecretory neurons and its modulation by glia. **Endocrinology.** 147: 3746-3760. 2006.

RICHARDS DS., VILLALBA RM., ALVARES FJ., STERN JE. Expression of GABAB receptors in magnocellular neurosecretory cells of male, virgin female and lactating rats. *J Neuroendocrinol.* 17(7): 413-423. 2005.

RIEM MM., BAKERMANS-KRANENBURG MJ., PIEPER S. Oxytocin modulates amygdala, insula, and inferior frontal gyrus responses to infant crying: a randomized, controlled trial. **Biol Psychiatry.** 70: 291–297. 2011.

SCHOUSBOE A, WAAGEPETERSEN, HS. Role of astrocytes in homeostasis of glutamate and GABA during physiological and pathophysiological conditions. **Non-Neuronal Cells of the Nervous System.** 4: 461–475. 2003.

SCHOUSBOE A., SARUP A., BAK LK., WAAGEPETERSEN, HS., LARSSON OM. Role of astrocytic transport processes in glutamatergic and GABAergic neurotransmission. **Neurochemistry International**. 45: 521–527. 2004.

STANCHEVA S,ALOVA L, STEFANOVA M. Effect of peptide and nonpeptide antagonists of angiotensin II receptors on noradrenaline release in hypothalamus of rats with angiotensin II-induced increase of water intake. **Pharmacol Rep**. 61: 1206-10. 2009.

STANLEY BG., HA LH., SPEARS LC., DEE MG. Lateral hypothalamic injections of glutamate, kainic acid, D, L- α -amino-3-hydroxy-5-methyl-isoxazole propionic acid or N-methyl-D-aspartic acid rapidly elicit intense transient eating in rats. **Brain Res**. 613: 88–95. 1993.

STEVENS FL., WIESMAN O., FELDMAN R., HURLEY RA., TABER KH. Oxytocin and behavior: evidence for effects in the brain. **J Neuropsychiatry Clin Neurosci**. 25 (2): 96-102. 2013.

SUMMY-LONG JY, KADEKARO M. Role of circumventricular organs (CVO) in neuroendocrine responses: interactions of CVO and the magnocellular neuroendocrine system in different reproductive states. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 28(7): 590-601. 2001.

TOBIN V., GARETH L., LUDWING M. The involvement of actin, calcium channels and exocytosis proteins in somato-dendritic oxytocin and vasopressin release. **Frontiers in Physiology**. 3: 1-6. 2012.

VAN DEN POL AN., WUARIN JP., DUDEK FE. Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. **Science**. 250:1276–8. 1990.

VOISEN DL., HERBISON., CHAPMAN C. POULAIN DA. Effects of central GABAB receptor modulation upon the milk ejection reflex in the rat. *Neuroendocrinology*. 63: 368-376. 1996.

YAMAGUCHI K, YAMADA T. Roles of forebrain GABA receptors in controlling vasopressin secretion and related phenomena under basal and hyperosmotic circumstances in conscious rats. **Brain Res Bull**. 5: 61-69. 2008.

YAMAGUCHI K & WATANABE K. Pursuit of roles for metabotropic glutamate receptors in the anteroventral third ventricular region in regulating vasopressin secretion and cardiovascular function in conscious rats. **Brain Res Bull**. 64: 321-329. 2004.

YANG CR, SENATOROV VV, RENAUD LP. Organum vasculosum lamina terminalis evoked postsynaptic responses in rat supraoptic neurons in vitro. **J Physiol**. 15: 59-74. 1994.

YAHARA T., TACHIKAWA M., AKANUMA S., HOSOYA K. Hypertonicity enhances GABA uptake by cultured rat retinal capillary endothelial cells. **Drug Metab. Pharmacokinet**. 25 (6): 611–615. 2010.

7 ANEXOS

Validação dos métodos cromatográficos

Tempo de retenção

É o parâmetro que verifica o período para eluição do analito desde o ato da injeção até a saída do ponto máximo do pico do sistema. Engloba o tempo que o componente em questão fica no sistema cromatográfico, quer na fase móvel quer na fase estacionária. A obtenção deste parâmetro permite a identificação do analito de interesse frente às condições cromatográficas previamente estabelecidas.

Linearidade

Corresponde à capacidade do método de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância em exame. Recomenda-se que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, 6 concentrações diferentes em triplicata. Os resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados como, por exemplo, o cálculo de regressão linear. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,95.

Curva de calibração

A curva de calibração representa a relação entre a resposta do instrumento e a concentração conhecida do analito, utilizando-se a mesma matriz biológica proposta para o estudo. A curva de calibração deve incluir no mínimo seis amostras contendo padrão do analito e padrão interno. Os

resultados devem ser analisados por métodos estatísticos apropriados como, por exemplo, o cálculo de regressão linear. O critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) deve ser = 0,95.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O LD do método representa a menor concentração do analito em exame que pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado. O limite de detecção é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base. O LQ é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (desvio menor ou igual a 15%).

Exatidão (teste de recuperação)

Representa o grau de concordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro. Os ensaios foram feitos em triplicata durante três dias consecutivos. Para calcular a exatidão efetuou-se a divisão da concentração obtida pela concentração teórica multiplicado por cem.

A recuperação do analito indica o quanto foi perdido durante as diversas etapas ocorridas nos procedimentos de preparo da amostra, esse também é considerado um parâmetro que mede exatidão. A recuperação do presente método foi determinada a partir das soluções controle que foram mensuradas antes e após os diferentes processos. Os resultados obtidos com soluções padrão não submetidas aos processos representam 100% de recuperação.

Repetibilidade (precisão intra-dia e inter dia)

É a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, sob condições definidas. A repetibilidade é verificada utilizando-se, no mínimo, 3 (três) concentrações (baixa, média e alta), contemplando a faixa de variação do procedimento, realizando-se, no mínimo, 5 (cinco) determinações por concentração. Deve ser avaliada pelo coeficiente de variação (CV%), não se admitindo valores superiores a 15%.

Estabilidade

Para a realização do estudo de estabilidade devem ser observados os parâmetros de exatidão, precisão, linearidade, limite de detecção, limite de quantificação e especificidade previamente validados. A estabilidade do analito depende de suas propriedades químicas, da matriz biológica e do material de acondicionamento utilizado.

As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Deve ser avaliada a estabilidade do analito durante a coleta e manuseio da amostra, após

armazenagem de longa duração (congelamento) e curta duração (à temperatura ambiente), após ciclos de congelamento e descongelamento e nas condições de análise.

Parâmetros obtidos na validação da dosagem de aminoácidos

Tempo de retenção

O tempo de retenção dos aminoácidos glutamato, Homoserina (padrão interno) e GABA foram respectivamente 9.7, 14.6 e 22.4 minutos (figura 19).

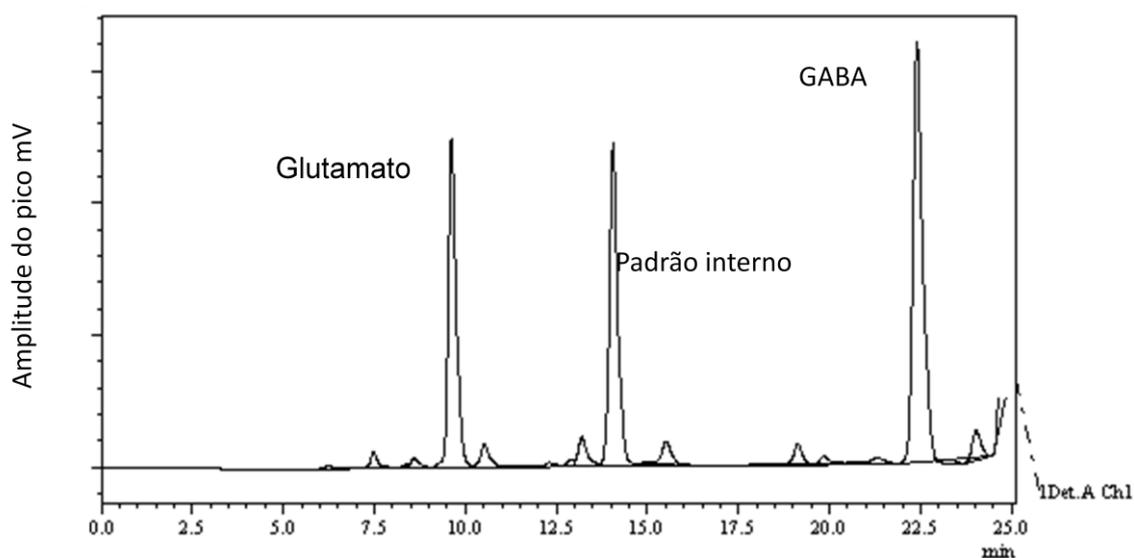


Figura 19: Cromatograma padrão mostrando o tempo de retenção dos aminoácidos nas condições cromatográficas estabelecidas

Linearidade

O teste de linearidade mostrou que o sistema cromatográfico respondeu de maneira linear para ambos os aminoácidos (glutamato e GABA), na faixa de concentração de 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5, 10 e 15 nmol para glutamato e 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5 e 10 nmol para o GABA, com coeficiente de correlação igual a

0.9878 e 0.9958 para glutamato (Figura 20) e GABA (Figura 21) respectivamente.

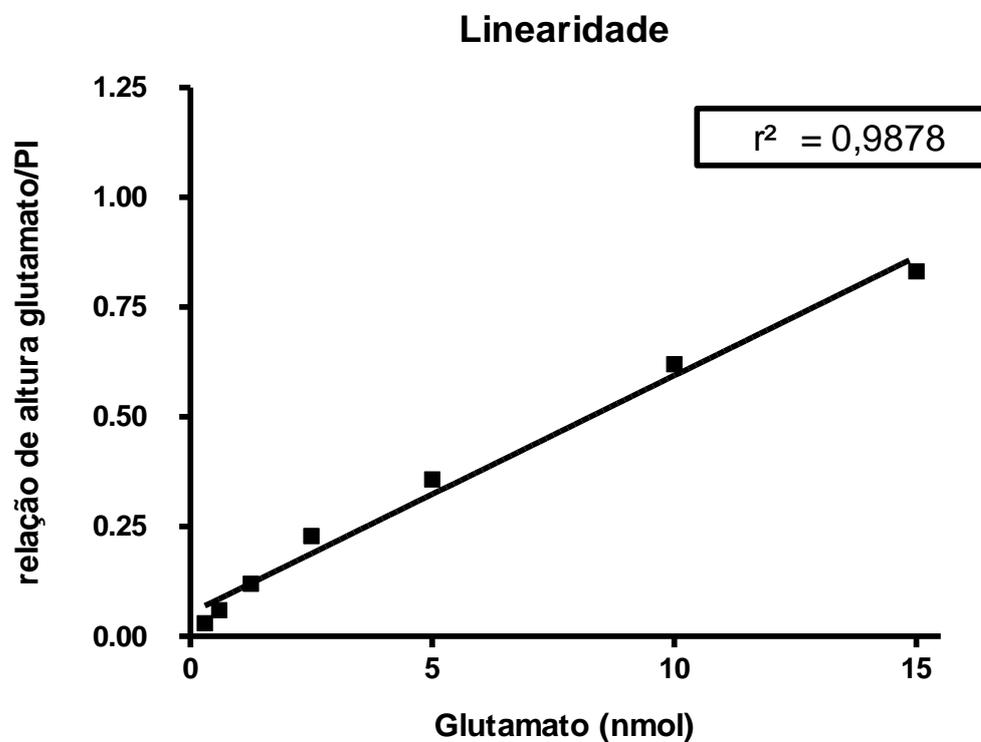


Figura 20: Linearidade do glutamato. No eixo das ordenadas a relação de altura do pico dos padrões de glu e padrão interno e nas abscissas as diferentes concentrações de glutamato

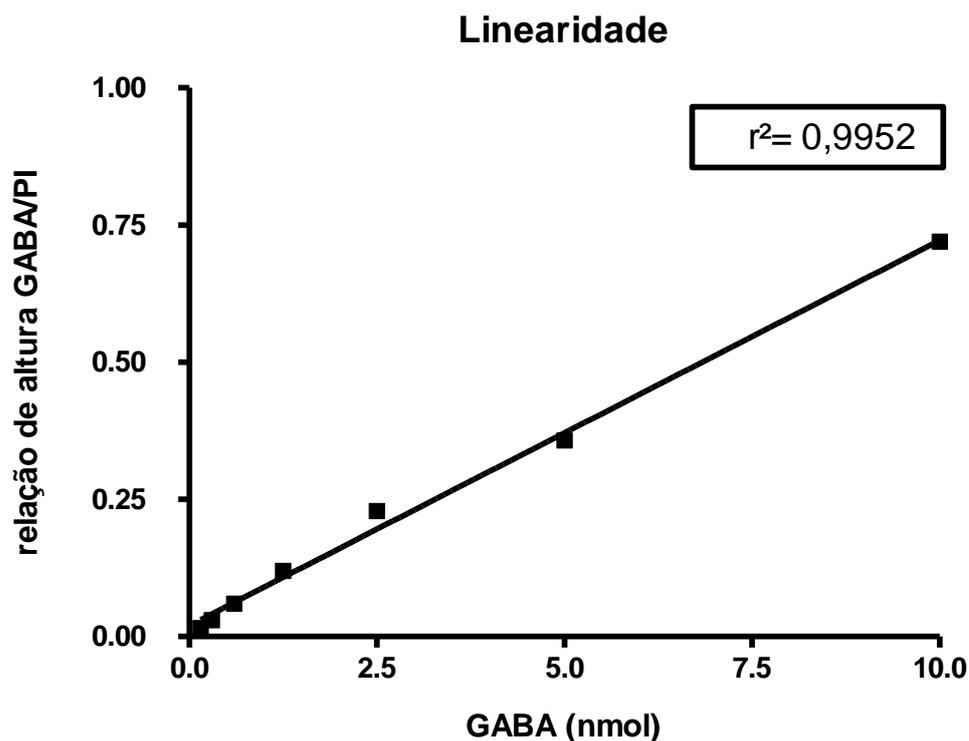


Figura 21: Linearidade do GABA. No eixo das ordenadas a relação de altura do pico dos padrões de GABA e padrão interno e nas abscissas as diferentes concentrações de GABA

Curva de calibração

Os resultados obtidos com a curva de calibração mostraram que a diluição dos analitos na matriz biológica submetidos e o processo de preparação das amostras não interferiu na linearidade, a resposta do detector foi proporcional a concentração dos aminoácidos faixas de 0.3, 0.6, 1.25, 2.5, 5 e 10 nmol para glutamato e 0.15, 0.3, 0.6, 1.25, 2.5 e 5 nmol para o GABA, com coeficiente de correlação igual a 0.9914 e 0.9972 para glutamato (figura 22) e GABA (figura 23) respectivamente.

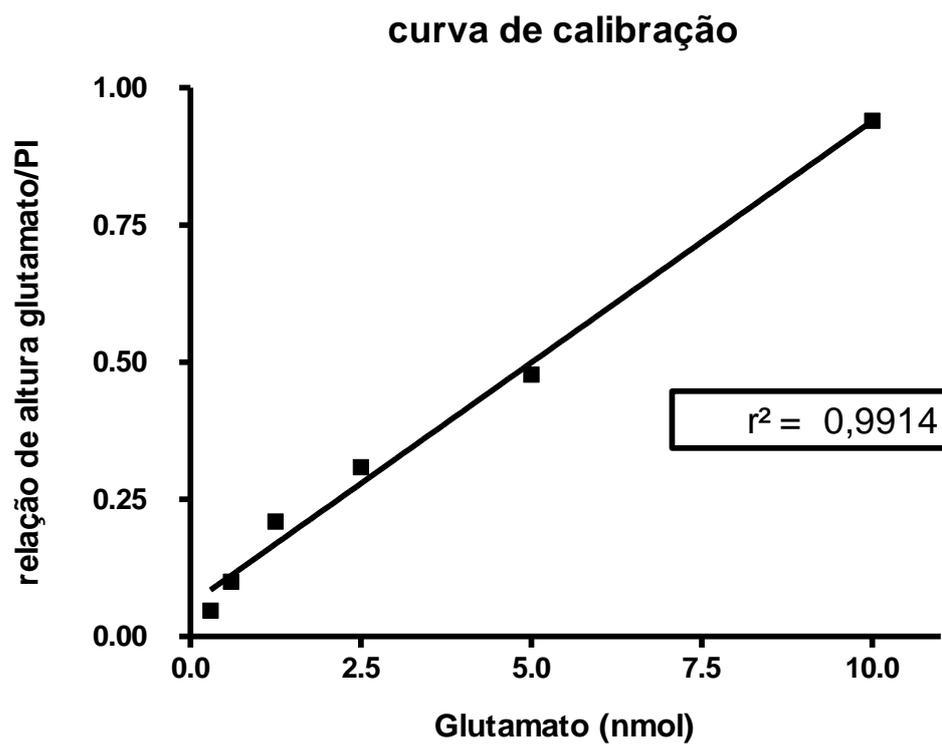


Figura 22: Curva de calibração do glutamato. No eixo das ordenadas a relação de altura do pico dos padrões de glu e padrão interno e nas abscissas as diferentes concentrações de glutamato

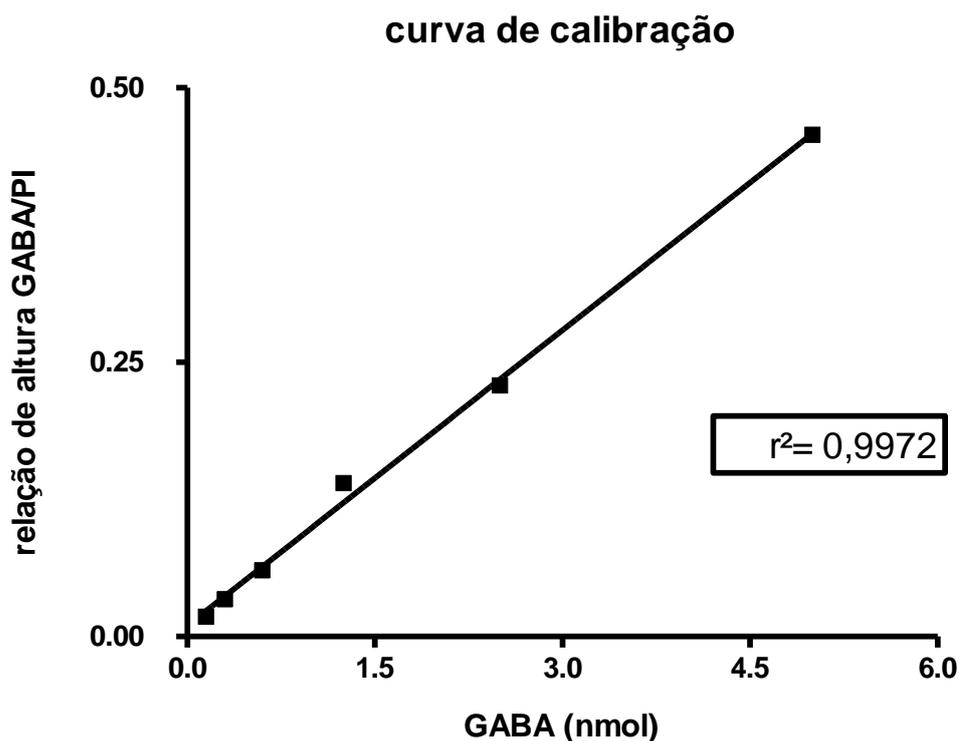


Figura 23: Curva de calibração do GABA. No eixo das ordenadas a relação de altura do pico dos padrões de GABA e padrão interno e nas abscissas as diferentes concentrações de GABA

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

Os limites de detecção obtidos nas condições cromatográficas foram de 0.006 (28% CV) e 0.001 nmol (23% CV) para glutamato e GABA respectivamente. Enquanto que os limites de quantificação foram de 0.015 e 0.005 nmol para glutamato GABA respectivamente.

Exatidão (teste de recuperação)

Os resultados de exatidão estão expressos na tabela 4 e mostram valores aceitáveis, menores que 15%, mostrando que as condições cromatográficas geram resultados exatos para ambos os aminoácidos. Os resultados do ensaio de recuperação estão expressos na tabela 5 e mostram

que o tratamento da amostra não causou alterações significativas nas concentrações dos aminoácidos.

Repetibilidade (precisão intra-dia e inter dia)

Os resultados de precisão estão expressos na tabela 5 e mostram valores dentro do preconizado para considerar o ensaio analítico preciso e reproduzível para ambos os aminoácidos.

Tabela 5: Resultados de exatidão e precisão do glutamato e GABA: em três dias consecutivos e três concentrações diferentes (baixa, média e alta)

Analito	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Inter dia
Glutamato				
Baixo (0,3 nmol)	7,6 CV% Exatidão 105%	5,8 CV% Exatidão 98%	4,6 CV% Exatidão 102%	6,2 CV%
Médio (2,5 nmol)	4,3 CV% Exatidão 98%	6,9 CV% Exatidão 101%	3,7 CV% Exatidão 99%	5,6 CV%
Alto (10 nmol)	1,5 CV% Exatidão 95%	1,3 CV% Exatidão 97%	1,2 CV% Exatidão 104%	1,6 CV%
GABA				
Baixo (0,15 nmol)	4,9 CV% Exatidão 93%	3,9 CV% Exatidão 98%	5,0 CV% Exatidão 109%	4,8 CV%
Médio (1,2 nmol)	2,9 CV% Exatidão 103%	3,0 CV% Exatidão 94%	5,1 CV% Exatidão 97%	3,9 CV%
Alto (5 nmol)	1,7 CV% Exatidão 97%	0,8 CV% Exatidão 102%	2,3 CV% Exatidão 104%	2,4 CV%

Estabilidade

Os testes de estabilidade em condições ambientes e de congelamento/descongelamento estão expressos na tabela 6 e mostram que glutamato e GABA são estáveis nas condições impostas (mimetizando as reais condições de manuseio e análise das amostras).

Tabela 6: Resultados de recuperação do glutamato e GABA: em três concentrações diferentes (baixa, média e alta)

Analito	Recuperação (%)	Coefficiente de variação (%)
Glutamato	110	5,7
Baixo (0,3 nmol)		
Médio (2,5 nmol)	98	4,9
Alto (10 nmol)	102	3,1
GABA	109	6,7
Baixo (0,15 nmol)		
Médio (1,2 nmol)	97	5,3
Alto (5 nmol)	96	1,1

Tabela 7: Resultados de estabilidade do glutamato e GABA em três concentrações diferentes (baixa, média e alta). * Estabilidade em temperatura ambiente por 24 h. ** Estabilidade de congelamento/descongelamento, ciclo de 48 h (estocado a -20 °C)

Analito	Estabilidade %*			Estabilidade de congelamento %**		
	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta
glutamato	89	98	103	91	97	99
GABA	93	109	111	108	95	103

Parâmetros obtidos na validação da dosagem de Ocitocina

Tempo de retenção

O tempo de retenção da ocitocina foi de 4.89 minutos (figura 24). Tempo total da corrida foi de sete minutos.

Linearidade

O teste de linearidade mostrou que o sistema cromatográfico respondeu de maneira linear para os níveis de ocitocina (faixa de 6.2, 12.5, 25, 50, 75 e 100 ng), coeficiente de correlação igual a 0.9908 (figura 25).

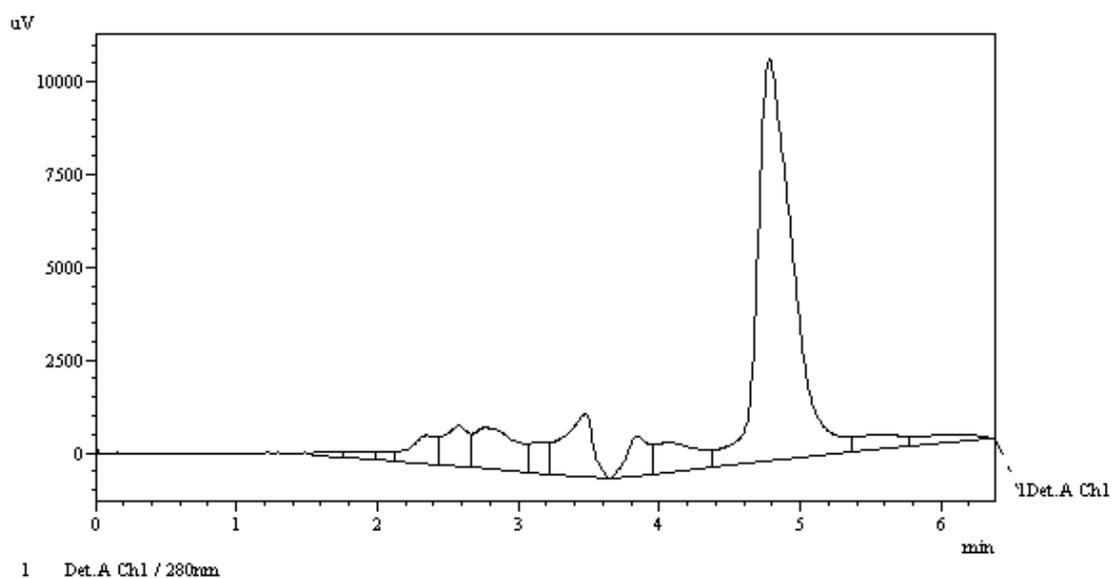


Figura 24: Cromatograma padrão mostrando o tempo de retenção da Ocitocina nas condições cromatográficas estabelecidas

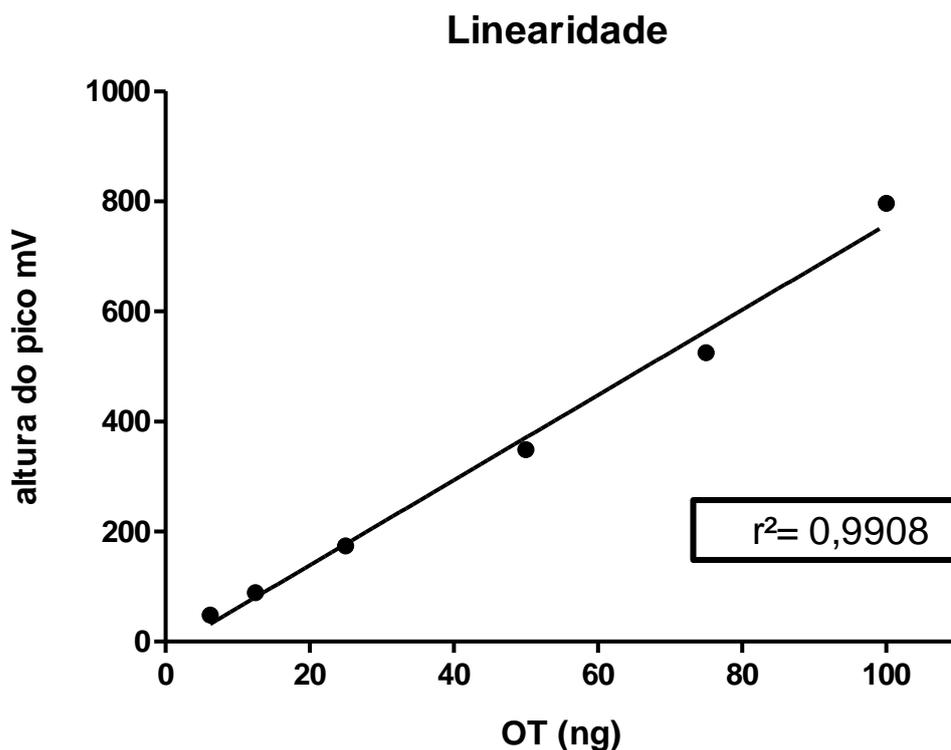


Figura 25: Linearidade da ocitocina. No eixo das ordenadas altura do pico e nas abscissas as diferentes concentrações de ocitocina

Curva de calibração

Os resultados obtidos com a curva de calibração mostraram que a diluição do analito na matriz biológica submetido ao processo de preparação das amostras não interferiu na linearidade, a resposta do detector foi proporcional a concentração da ocitocina (faixa de 3.1, 6.2, 12.5, 25, 50, 75 ng), coeficiente de correlação igual a 0.9896 (figura 26).

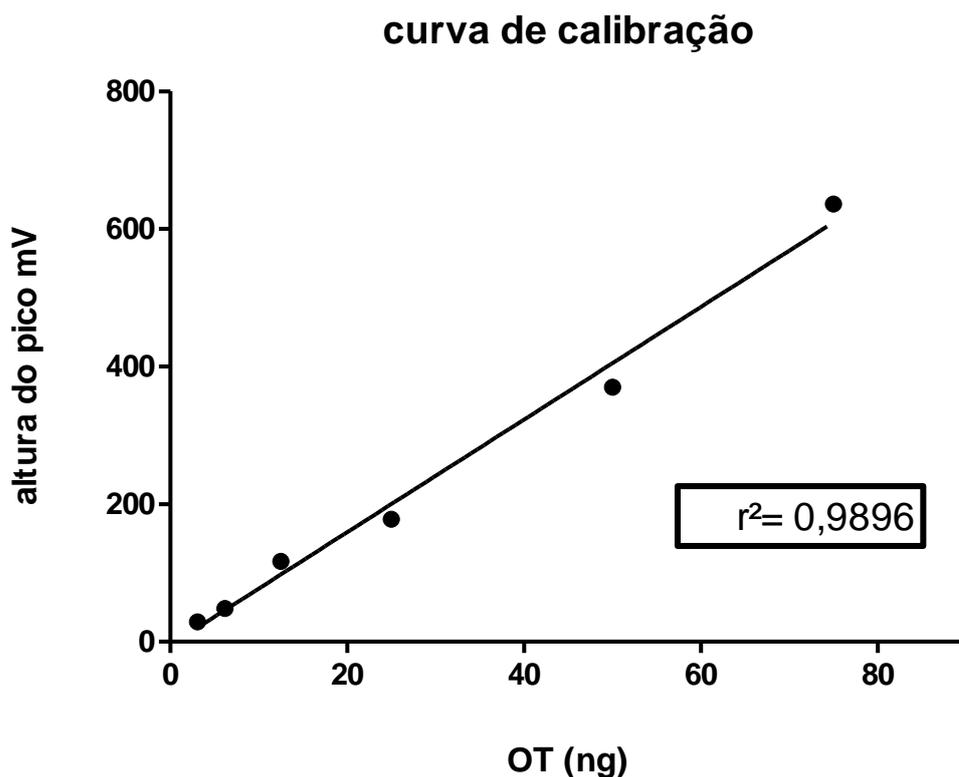


Figura 26: Curva de calibração da ocitocina. No eixo das ordenadas a altura do pico e nas abscissas as diferentes concentrações de ocitocina.

Limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção obtido nas condições cromatográficas foi de 0.015 ng (27% CV). Enquanto que o limite de quantificação foi de 0.3 ng.

Exatidão (teste de recuperação)

Os resultados de exatidão estão expressos na tabela 8, com valores dentro do preconizado, menores que 15%, mostrando que as condições cromatográficas geram resultados exatos para a dosagem de ocitocina. Os resultados do ensaio de recuperação estão expressos na mesma tabela e mostram que o tratamento da amostra não causou alterações significativas nas concentrações de ocitocina.

Tabela 8: Resultados de exatidão e precisão da dosagem de ocitocina em três dias consecutivos e três concentrações diferentes; baixa (3.1 ng), média (12.5) e alta (75ng).

Ocitocina	Dia 1			Dia 2			Dia 3		
	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta	Baixa	Média	Alta
CV%	1,2	1,6	3,1	2,2	2,9	2,6	2,2	2,9	2,6
Exatidão %	102	111	96	97	109	96	97	98	93
Recuperação %	110	92	94	98	97	104	97	106	103

