

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA -DEPARTAMENTO
DE FISIOLOGIA E PATOLOGIA

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA – UFSCar/UNESP

**AJUSTES CARDIOVASCULARES E DO EQUILÍBRIO
HIDROELETROLÍTICO INDUZIDOS POR SOLUÇÕES
HIPERTÔNICAS EM RATOS COM LESÃO DO NÚCLEO DO
TRATO SOLITÁRIO COMISSURAL**

Graziela Torres Blanch

ARARAQUARA

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS – UFSCar

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA -
DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA E PATOLOGIA

PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS ASSOCIAÇÃO AMPLA – UFSCar/UNESP

**AJUSTES CARDIOVASCULARES E DO EQUILÍBRIO
HIDROELETROLÍTICO INDUZIDOS POR SOLUÇÕES
HIPERTÔNICAS EM RATOS COM LESÃO DO NÚCLEO DO
TRATO SOLITÁRIO COMISSURAL**

Graziela Torres Blanch

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – Área Fisiologia do centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade de São Carlos e da Faculdade de Odontologia de Araraquara da Universidade Estadual Paulista como requisito pra obtenção do grau de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Dra. Débora S. A. Colombari

ARARAQUARA

2010

Blanch, Graziela Torres

Ajustes cardiovasculares e do eletrolítico induzidos por soluções hipertônicas em ratos com lesão do núcleo do trato solitário comissural/
Graziela Torres Blanch. – Araraquara: [s.n.], 2010.

86 f. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Odontologia

Orientadora: Profa. Dra. Débora S. A. Colombari

1. Homeostase 2. Ingestão de líquidos 3. Hipertensão I. Título

GRAZIELA TORRES BLANCH

**AJUSTES CARDIOVASCULARES E DO EQUILÍBRIO
HIDROELETROLÍTICO INDUZIDOS POR SOLUÇÕES
HIPERTÔNICAS EM RATOS COM LESÃO DO NÚCLEO
DO TRATO SOLITÁRIO COMISSURAL**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

Presidente e Orientadora: Prof. Dra. Débora Simoes de Almeida
Colombari

2º examinador: Prof. Dr. Colin Sumners (Universidade da Florida)

3º examinador: Prof. Dra. Cássia Marta de Toledo Bermagaschi
(UNIFESP)

4º examinador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes (USP)

5º examinador: Prof. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias (FMRP –
USP)

Araraquara, 12 de agosto de 2010.

DADOS CURRICULARES

GRAZIELA TORRES BLANCH

NASCIMENTO	02/09/1978
FILIAÇÃO	Arnaldo Blanch Filho Rivanci Torres Blanch
1997/2001	Licenciatura e Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Presbiteriana Mackenzie – São Paulo, SP.
2004/2006	Mestrado em Ciências Fisiológicas pelo programa de pós graduação da Universidade Federal de São Carlos (convênio UFSCar/UNESP).
2006/2010	Doutorado em Ciências Fisiológicas pelo programa interinstitucional de pós graduação da UFSCar/UNESP.

AGRADECIMENTOS

- À Prof Dra. Débora Simões de Almeida Colombari, não somente pela orientação desta tese, mas também pela confiança e amizade ao longo desta trajetória na pós-graduação;

- À CNPq, pelo financiamento desta tese.

- Aos professores do departamento, Eduardo, Laurival, Patrícia e Vanderlei pela paciência, conselhos e sugestões no decorrer destes anos.

- Aos Profs Dr. Colin Sumners (Universidade da Flórida), Prof. Dr. David Murphy (Universidade de Bristol) e Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues (USP/FMRP) por permitir a realização de experimentos em seus laboratórios.

- Ao meu marido, André, que está ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, não deixando-me esmorecer.

- Aos meus pais, meus irmãos, e demais membros da minha família, por fazerem parte da minha história e por me ajudarem em minhas tentativas de crescimento.

- Aos amigos do Laboratório de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara e Departamento de Fisiologia e Genética Funcional da UF pela amizade e por todo conhecimento adquirido com cada um especial.

- A todos os funcionários do laboratório de Fisiologia, Ana Victor, Silas, Reginaldo, Sílvia e Silvana pelo auxílio na realização desta tese.

- A todos que contribuíram meus sinceros agradecimentos.

PENSAMENTO

"O homem nasceu para aprender, aprender tanto quanto a vida lhe permita."

João Guimarães Rosa

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	9
LISTA DE TABELAS.....	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
INTRODUÇÃO.....	19
OBJETIVOS	26
MATERIAL E MÉTODO.....	27
1 Animais.....	27
2 Lesão do NTS comissural (commNTS)	27
3 Estímulo osmótico.....	28
4 Registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) em animais não anestesiados	28
5 Medidas de ingestão de água	29
6 Coleta de sangue e determinações bioquímicas.....	29
7 Dosagem de vasopressina e ocitocina.....	29
8 Radioimunoensaio para vasopressina (AVP).....	30
9 Radioimunoensaio para ocitocina (OT).....	30
10 Real time RT-PCR para expressão gênica	30
11 Perfusão e fixação do tecido encefálico	31
12 Imunohistoquímica para detecção de c-Fos e dupla marcação para c-Fos/vasopressina ou c-Fos/ocitocina.....	31
13 Substâncias utilizadas:	33
14 Análise Estatística.....	33
Parte 1:.....	34
Lesão do commNTS e sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M.....	34
PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS – Parte 1	35
1 Participação da vasopressina na resposta pressora em animais com lesão do commNTS após administração intragástrica (ig) de NaCl 2 M.....	35
2 Efeito da lesão do commNTS sobre parâmetros sanguíneos após sobrecarga de NaCl 2 M.	36
3 Efeito da lesão do commNTS na expressão da proteína c-Fos no PVN e SON após a sobrecarga de NaCl 2 M (ig).	36
4) Efeito da sobrecarga de NaCl 2 M na secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) em animais sham e com lesão do commNTS após sobrecarga de NaCl 2 M (ig).	37

5) Efeito da sobrecarga de NaCl 2 M (ig) sobre a expressão gênica no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN).....	37
RESULTADOS – Parte 1	38
1 Análise histológica da lesão do commNTS.	38
2 Participação da vasopressina na resposta pressora em animais com lesão do commNTS após sobrecarga de NaCl 2 M (ig).	39
3 Sódio, potássio e proteína plasmáticos em animais com lesão do commNTS após a sobrecarga de NaCl 2 M (ig).	43
4 Expressão da proteína c-Fos e dupla marcação para vasopressina e ocitocina no PVN e SON em animais com lesão do commNTS após sobrecarga de NaCl 2 M (ig).	44
5 Efeito da sobrecarga de NaCl 2 M na secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) em animais sham e com lesão do commNTS após sobrecarga de NaCl 2 M (ig).	48
6 Expressão gênica no PVN após sobrecarga de NaCl 2 M (ig) em animais intactos.	50
Resumo – Parte 1	51
Parte 2:	52
Lesão do commNTS e sobrecarga intragástrica de NaCl 0,6 M.....	52
PROCOLOS EXPERIMENTAIS – Parte 2	53
1 Efeito da lesão do commNTS na pressão arterial e frequência cardíaca após sobrecarga de NaCl 0,6 M e a possível participação da vasopressina.	53
2 Efeito da lesão do commNTS sobre parâmetros sanguíneos após sobrecarga de NaCl 0,6 M.	53
3 Efeito da lesão do commNTS na ingestão de água e excreção urinária após sobrecarga de NaCl 0,6 M (ig).....	54
4 Efeito da lesão do commNTS na expressão da proteína c-Fos no PVN e SON sobrecarga de NaCl 0,6 M (ig).....	55
RESULTADOS- Parte 2.....	56
1 Efeito da lesão do commNTS na pressão arterial e frequência cardíaca após sobrecarga de NaCl 0,6 M e possível participação da vasopressina.	56
2 Sódio, potássio e proteína plasmáticos em animais com lesão do NTS comissural (commNTS) 20 minutos após a sobrecarga de NaCl 0,6 M (ig).	60
3 Efeito da lesão do commNTS na expressão da proteína c-Fos no PVN e SON sobrecarga de NaCl 0,6 M (ig).....	61
4 Ingestão de água e excreção após a sobrecarga de NaCl 0,6 M em animais com lesão do commNTS.....	63
Resumo – Parte 2.....	67
DISCUSSÃO	68
REFERÊNCIAS*	78
Blanch, Graziela Torres	16

Ajustes cardiovasculares e do eletrolítico induzidos por soluções hipertônicas em ratos com lesão do núcleo do trato solitário comissural/ Graziela Torres Blanch. – Araraquara: [s.n.], 2010.	16
85 f. ; 30 cm.....	16

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1** - Representação esquemática do NTS.....21
- FIGURA 2** – Resultados prévios do nosso laboratório.....24
- FIGURA 3** – Fotomicrografia de seções coronais rostro-caudais (A a D) do núcleo do trato solitário (NTS) mostrando uma lesão eletrolítica representativa do NTS comissural (B ao D, setas). iNTS, NTS intermediário; XII (n. hipoglosso) e AP (área postrema). Escala de barra = 200 μ m.....38
- FIGURA 4** – Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos sham e com lesão do commNTS que receberam injeções intravenosas de salina ou antagonista de receptores V1 da vasopressina antes da gavagem de NaCl 2 M (2 ml). Setas indicam o momento da gavagem. Escala = 10 minutos.41
- FIGURA 5** – Alterações na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) em ratos sham e ratos com lesão do commNTS após administração intragástrica de NaCl 2 M em ratos pré-tratados com salina ou antagonista de receptores V1 de vasopressina (Manning Compound, 10 μ g/kg peso corporal, iv). Resultados estão expressos como média \pm EPM. N = número de animais. * diferente de 0 min; † diferente dos outros tratamentos, # diferente de sham + salina iv (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; P < 0,05.....42
- FIGURA 6 - A)** Fotomicrografia de seções coronais representativas de expressão de c-Fos nas porções magnocelular (mPVN) e parvocelular (pPVN) do núcleo paraventricular do hipotálamo (painel superior) e no núcleo supraoptico (painel inferior), (barra = 100 μ m);. **B)** Células imunopositivas ao c-Fos por seção nas porções magnocelular (mPVN) e parvocelular (pPVN) do núcleo paraventricular do hipotálamo e no núcleo supraoptico (SON) em animais do grupo sham e do grupo com lesão do commNTS após a sobrecarga de NaCl 0,15 M ou NaCl 2 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * diferente de NaCl 0,15 M; † diferente de sham + NaCl 2 M. p < 0,05 (ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls).45
- FIGURA 7** - Fotomicrografia de cortes coronais representativos para c-Fos

(verde) e vasopressina (AVP, vermelho) e dupla marcação (Fos+AVP, sobreposição em amarelo) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo supraoptico (SON). Barra de escala= 200 μ m.47

FIGURA 8 - Fotomicrografia de cortes coronais representativos para c-Fos (verde) e ocitocina (OT, vermelho) e dupla marcação (Fos+OT, sobreposição em amarelo) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo supraoptico (SON). Barra de escala= 200 μ m.48

FIGURA 9 - Concentração plasmática de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) em animais sham ou com lesão do commNTS, 20 minutos após a administração intragástrica com NaCl 2 M (2 ml). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. *diferente de NaCl 0,15 M; + diferente de sham + NaCl 2 M. $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls).50

FIGURA 10 - Quantidade de RNAm no PVN em animais intactos, 120 minutos após a administração intragástrica com NaCl 2 M (2 ml). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. *diferente de NaCl 0,15 M. (Student *t* test; $p < 0,05$).....51

FIGURA 11 - Alterações na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) em ratos sham e ratos com lesão do commNTS após administração intragástrica de NaCl 0,6 M. Resultados estão expressos como média \pm EPM. N = número de animais. * diferente de sham; + diferente de 0 min (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).....58

FIGURA 12 - Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos sham e com lesão do commNTS que receberam injeções intravenosas de salina ou antagonista de receptores V1 da vasopressina antes da gavagem de NaCl 0,6 M (2 ml). Setas indicam o momento da gavagem. Escala = 10 minutos59

FIGURA 13 - Alterações na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) em ratos sham e ratos com lesão do commNTS após administração intragástrica de NaCl 0,6 M em ratos pré-tratados com salina ou antagonista de receptores V1 de vasopressina (Manning Compound, 10 μ g/kg peso corporal, iv). Resultados estão expressos como média \pm EPM. N = número de animais. * diferente de sham; + diferente do tempo 0 – mesmo comentário do item anterior (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).....60

FIGURA 14 - A) Fotomicrografia de seções coronais representativas de expressão de c-Fos nas porções magnocelular (mPVN) e parvocelular (pPVN) do núcleo paraventricular do hipotálamo (painel superior) e no núcleo supraoptico (painel inferior), (barra = 100 μ m);. **B)** Células imunopositivas ao c-Fos por seção nas porções magnocelular (mPVN) e parvocelular (pPVN) do núcleo paraventricular do hipotálamo e no núcleo supraoptico (SON) em animais do grupo sham e do grupo com lesão do commNTS após a sobrecarga de NaCl 0,15 M ou NaCl 0,6 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * diferente de NaCl 0,15 M; + diferente de sham + NaCl 0,6 M. $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls).63

FIGURA 15 - Efeitos da gavagem intragástrica de NaCl 0,6 M em ratos com sham e com lesão do commNTS sobre a ingestão não cumulativa (A) e cumulativa (B) de água. Resultados estão expressos como média \pm EPM. N = número de animais. * diferente de NaCl 0,15 M; + diferente de sham (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman Keuls; $P < 0,05$).67

FIGURA 16 - A) Volume urinário e **B)** Excreção urinária de sódio 120 min após administração intragástrica de NaCl 0,15 ou NaCl 0,6 M (2 ml) em ratos sham ou com lesão do commNTS. Resultados estão expressos como média \pm EPM. N = número de animais.....68

FIGURA 17 - Presença de mecanismos inibitórios.....77

FIGURA 18 - Ausência de mecanismos inibitórios.....78

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Variações da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) em animais sham e com lesão do commNTS após fenilefrina (fenil), nitroprussiato de sódio (NPS) e cianeto de potássio (KCN).40
- Tabela 2** - Alterações na PAM (mmHg) induzidas pela vasopressina (12,5 ng/rato, iv) antes e 5 e 70 min após a administração de antagonista de receptores V1 de vasopressina (composto de Manning, 10 µg/kg, iv) em ratos com lesão commNTS ou ratos sham.40
- Tabela 3** - Valores de proteína sérica total (PT), sódio sérico (S_{Na}) e potássio sérico (S_k) 20 min após a sobrecarga de NaCl 2 M or NaCl 0,15 M ig (2 ml) em ratos com lesão do commNTS ou sham.....43
- Tabela 4** - Valores de proteína sérica total (PT), sódio sérico (S_{Na}) e potássio sérico (S_k) 20 min após a sobrecarga de NaCl 0,6 M or NaCl 0,15 M ig (2 ml) em ratos com lesão do commNTS ou sham.61
- Tabela 5** - Valores de peso corporal antes da lesão (pré-lesão) e após lesão fictícia ou lesão do commNTS.66

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANG II:** angiotensina II
- AP:** área postrema
- AV3V:** região anteroventral do terceiro ventrículo
- AVP:** arginina vasopressina
- DAB:** diaminobenzidina
- EPM:** erro padrão da média
- FC:** frequência cardíaca
- icv:** intracerebroventricular
- ig:** intragastricamente
- ip:** intraperitoneal
- iv:** intravenoso
- KCN:** cianeto de potássio
- MIF:** fator inibitório da migração de macrófagos
- MnPO:** núcleo preóptico mediano
- NGS:** soro normal de cabra
- NPBL:** núcleo parabraquial lateral
- NPS:** nitroprussiato de sódio
- NTS:** núcleo do trato solitário
- NTScom:** subnúcleo comissural do núcleo do trato solitário
- NTSi:** subnúcleo intermediário do núcleo do trato solitário
- OCVs:** órgãos circunventriculares
- OT:** ocitocina
- OVL:** órgão vasculoso da lâmina terminal
- PAM:** pressão arterial média
- PAP:** pressão arterial pulsátil
- pc:** peso corporal
- PVN:** núcleo paraventricular do hipotálamo
- PVNp:** porção parvocelular do PVN
- PVNm:** porção magnocelular do PVN
- RVL:** bulbo rostroventrolateral
- Sham:** lesão fictícia

sc: subcutâneo

SFO: órgão subfornicial

SNC: sistema nervoso central

SON: núcleo supraóptico

Blanch GT. Ajustes cardiovasculares e do equilíbrio hidroeletrólítico induzidos por soluções hipertônicas em ratos com lesão do núcleo do trato solitário comissural. [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Resumo

O sistema nervoso central (SNC) tem um papel fundamental na regulação de mecanismos que controlam a osmolaridade dos líquidos corporais. O núcleo do trato solitário (NTS) é o sítio primário das aferências cardiovasculares e de osmorreceptores periféricos e se projeta à áreas prosencefálicas envolvidas com a regulação cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico. Demonstramos anteriormente que animais com lesão da porção comissural do NTS (commNTS) tem maior ingestão de água, natriurese e resposta pressora frente a sobrecarga intragástrica (ig) de NaCl 2 M. Os mecanismos responsáveis por estas alterações ainda não foram determinados. Uma vez que o estímulo com NaCl 2 M ig (2 ml) ativa osmorreceptores centrais e periféricos, não sabemos até o momento os efeitos da lesão do commNTS sobre as respostas observadas após a estimulação específica de osmorreceptores periféricos, que pode ser feita com NaCl 0,6 M ig. (2 ml). Desta forma os nossos objetivos foram: a) estudar os mecanismos que medeiam o aumento da pressão arterial e da natriurese após a sobrecarga de NaCl 2 M em animais com lesão do commNTS; b) verificar as alterações na expressão da proteína c-Fos após NaCl 2 M ig em ratos com lesão fictícia (sham) ou lesão do commNTS; c) verificar as alterações na expressão gênica no PVN após NaCl 2 M ig, d) estudar os efeitos na pressão arterial, na ingestão de água e na excreção renal subseqüentes a administração de NaCl 0,6 M ig, bem como os mecanismos responsáveis pelas alterações, em ratos com lesão fictícia (sham) ou lesão do commNTS; e) verificar as alterações na expressão da proteína c-Fos após NaCl 0,6 M ig em ratos com lesão fictícia (sham) ou lesão do commNTS. Ratos Holtzman (280-320 g) foram utilizados. A lesão eletrolítica ou lesão fictícia (sham) do commNTS, e todos os experimentos foram realizados na fase crônica da lesão (14 a 21 dias. Para a lesão do commNTS, uma craniotomia parcial foi realizada e a superfície dorsal do bulbo foi exposta. A lesão eletrolítica foi realizada

por meio de duas correntes de 1 mA por 5 s, com intervalo de 30 s entre elas. Nos ratos sham, o eletrodo foi posicionado nas mesmas coordenadas, exceto que não foi passada corrente elétrica. Observamos que os ratos com lesão eletrolítica do commNTS a resposta pressora do quimiorreflexo, testado com KCN (iv), foi reduzida, enquanto que o barorreflexo manteve-se inalterado. Nos ratos com lesão do commNTS, a sobrecarga de NaCl 2 M promoveu aumento da pressão arterial, que foi dependente de vasopressina. A gavagem com NaCl 2 M também promoveu pronunciada expressão de c-Fos nas regiões magnocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (mPVN) e no núcleo supra-óptico (SON) e essa foi significativamente maior nos ratos com lesão do commNTS do que nos ratos sham. Ambos os grupos tiveram aumento da secreção de vasopressina e ocitocina após NaCl 2 M ig, embora ratos com lesão do commNTS a secreção de vasopressina foi maior. Após a sobrecarga de NaCl 0,6 M, que ativa osmorreceptores periféricos, observamos que os ratos com lesão do commNTS tiveram resposta pressora mediada por vasopressina, incremento da resposta dipsogênica, bem como um maior aumento na expressão de c-Fos no SON comparado com animais sham. Em conclusão, nossos resultados mostram que a lesão do commNTS facilita a ingestão de água e a hipertensão dependente de vasopressina após aumento sobrecarga de NaCl hipertônico, seja a solução hipertônica capaz de alterar a osmolaridade plasmática (ativação de osmorreceptores centrais e periféricos) ou apenas a osmolaridade da região hepato-portal (ativação de osmorreceptores periféricos). As alterações na natriurese em ratos lesados submetidos a gavagem com NaCl 2 M parece ser dependente do aumento na pressão arterial nestes animais. Esses resultados sugerem que o commNTS faz parte de uma circuitaria neural inibitória que controla a pressão arterial, secreção de vasopressina, ingestão de água e ativação de áreas prosencefálicas frente à hiperosmolaridade, que ativa os osmorreceptores centrais e/ou periféricos.

Palavras-chave: Homeostase; ingestão de líquidos; hipertensão.

Blanch GT. Cardiovascular and hydroelectrolytic balance adjustments induced by hypertonic solutions in rats with commissural nucleus of tract solitary lesions. [Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

Abstract

The central nervous system has an important role controlling the mechanisms involved in the regulation of body fluid osmolality. The nucleus of the solitary tract (NTS) is the primary site of cardiovascular and peripheral osmoreceptors afferents and projects to prosencephalic areas involved in hydroelectrolytic balance and cardiovascular regulation. We have demonstrated that commissural NTS (commNTS) lesioned rats had an increase in arterial pressure and a greater increase in water intake and natriuresis after 2 M NaCl intragastric (ig) load. The mechanisms involved in these responses are not known. Since 2 M NaCl ig (2 ml) activates central and peripheral osmoreceptors, it is not known the effects of the commNTS lesion on the responses induced only by the activation of the peripheral osmoreceptors, which can be done by 0.6 M NaCl (2 ml) ig. Thus, the aims of this study were: a) to study the mechanisms involved in the increase of the arterial pressure and natriuresis in commNTS lesioned rats after 2 M NaCl ig; b) to verify the changes in c-Fos expression after 2 M NaCl ig in sham and commNTS lesioned rats; c) to verify the changes in gene expression in PVN after 2 M NaCl ig in naïve rats; d) to study the effects on arterial pressure, water intake and renal excretion after 0.6 M NaCl, as well as, the mechanisms involved in these responses, in sham and in commNTS lesioned rats; e) to verify the changes in c-Fos expression after 0.6 M NaCl ig in sham and commNTS lesioned rats. Male Holtzman rats (280-320 g) were used. Electrolytic lesion of the commNTS and all experiments were performed in chronic period of lesion (14 to 21 days). For the lesion, a partial craniotomy of the occipital bone was performed, and the dorsal surface of the brainstem was exposed. The electrolytic lesion was performed using a cathodal current (1 mA during 5 seconds, for two times). Sham lesioned rats had the electrode placed along the same coordinates, except that no current was passed. We observed that the pressor response to chemoreflex, tested with KCN (iv), was

reduced in commNTS lesioned rats, while baroreflex remained intact. In the commNTS lesioned rats, 2 M NaCl ig induced a vasopressin dependent-pressor response for at least 60 min. After 2 M NaCl, we observed that the number of the c-Fos expressing cells in the magnocellular paraventricular nucleus (mPVN) and in the supra-optic nucleus of the hypothalamus were greater in the commNTS lesioned rats, indeed both groups had increase in vasopressin and oxytocin in plasma after 2 M NaCl load, but in commNTS lesioned animals the increase in vasopressin was bigger. After 0.6 M NaCl that activates only peripheral osmoreceptors, it was observed that commNTS lesioned rats presented an increase in arterial pressure dependent on vasopressin, a greater increase in water intake, and also a greater c-Fos expression in SON compared to sham. In conclusion, the present data demonstrated that the commNTS lesion facilitates the water intake and the hypertension dependent on vasopressin secretion after hypertonic NaCl overload, regardless the hypertonic solution is able to activate central and/or peripheral osmoreceptors. The changes in the natriuresis observed in lesioned rats after 2 M NaCl seems to be dependent on the increase in arterial pressure in these animals. These results suggest that the commNTS is part of an inhibitory circuitry that controls arterial pressure, vasopressin secretion and water intake and activation of prosencephalic areas after hyperosmotic stimuli, which activate central and/or peripheral osmoreceptors.

Keywords: Homeostasis; drinking; hypertension.

INTRODUÇÃO

A manutenção da composição e do volume do compartimento extracelular dentro de uma faixa de variação restrita é fundamental para que haja uma pressão sanguínea adequada para perfeita irrigação tecidual. Diariamente, perdemos água e/ou eletrólitos (principalmente o sódio), através do suor, respiração e, em sua grande maioria, pela excreção urinária. Portanto, é essencial que haja uma regulação dos mecanismos que controlam o balanço entre a ingestão e a excreção de água e eletrólitos, em especial o sódio que representa o principal fator osmótico do compartimento extracelular.

O sistema nervoso central (SNC) tem um papel fundamental na regulação de mecanismos homeostáticos que controlam a volemia e a osmolaridade dos líquidos corporais, uma vez que detecta essas variações por meio de sinais gerados por pelo menos dois conjuntos de receptores sensíveis ao estiramento, situados nas paredes dos grandes vasos e nas câmaras cardíacas: os barorreceptores arteriais e os receptores cardiopulmonares, ou por meio de hormônios circulantes, como a angiotensina II (ANG II), que atuam diretamente no SNC, bem como por meio da ativação de células especializadas, como os osmorreceptores centrais e periféricos⁵⁶.

Os barorreceptores arteriais localizam-se principalmente no arco da aorta e seio carotídeo e respondem primariamente à variações da pressão arterial. As informações geradas por estes receptores são conduzidas ao SNC através do X e IX pares de nervos cranianos (nervos vago e glossofaríngeo, respectivamente)¹⁸. Os receptores cardiopulmonares localizam-se nos átrios, ventrículos e nos vasos pulmonares, respondem primariamente ao enchimento das câmaras cardíacas e ao volume circulante. As aferências dos receptores cardiopulmonares trafegam em direção ao SNC, principalmente pelo nervo vago³². Já os osmorreceptores periféricos estão localizados na região da veia porta e na circulação hepática, e convertem a concentração de Na⁺ em atividade nervosa hepática aferente, cujos sinais são enviados ao SNC pelo nervo vago^{44,53}. Em comum, todos esses aferentes convergem para o núcleo do trato solitário (NTS), onde fazem sua primeira sinapse^{1,18,26,81}. Por outro lado, os osmorreceptores centrais estão situados principalmente nos órgãos circunventriculares da lâmina terminal, e sua estimulação

ativa áreas centrais do SNC, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo supra-óptico (SON)⁹. A secreção de vasopressina e ocitocina pelo SON e PVN e a ativação de áreas bulbares, incluindo o NTS, pelo PVN constituem mecanismos homeostáticos importantes para normalização da osmolaridade e volemia⁹.

O PVN é uma importante área do SNC envolvida na regulação cardiovascular^{4,9,109} e pode ser dividido anatomicamente em porção magnocelular e parvocelular, as quais podem ser também subdivididas em vários subnúcleos¹⁰⁵. As porções magnocelulares do PVN (mPVN) são constituídas por neurônios secretores de AVP e OT, que se projetam para a hipófise posterior, onde são liberados na circulação. Os neurônios da porção parvocelular do PVN (pPVN) enviam eferências para diferentes áreas do SNC envolvidas com regulação e manutenção da pressão arterial e atividade nervosa simpática, como o bulbo rostroventrolateral (RVL), NTS e a coluna intermédio lateral^{94,104-105}.

Enquanto que a participação de áreas anteriores do encéfalo para o controle das respostas homeostáticas frente a alterações do equilíbrio hidroeletrólítico parece consensual^{34,57,103}, mais recentemente tem-se também demonstrado a participação de áreas situadas no tronco encefálico como o núcleo parabraquial lateral (NPBL) e o núcleo do trato solitário (NTS)^{8,22,31,67,77,79}. Como citado anteriormente, as aferências cardiovasculares e os osmorreceptores periféricos fazem sua primeira sinapse no NTS. Este núcleo é constituído por grupos heterogêneos de neurônios, dispostos dorsalmente no bulbo, que se estendem no sentido rostro-caudal, desde a extremidade caudal no núcleo do nervo facial até a parte caudal da decussação piramidal^{18,107}. A parte rostral é formada por colunas bilaterais, que se unem na altura do óbex para formar uma única estrutura na linha média. No sentido rostro-caudal, considerando a proximidade com a área postrema (AP), o NTS pode ser dividido em três porções: NTS rostral, NTS intermediário e NTS comissural²⁶ conforme figura 1, modificada de Ter Horst¹⁰⁷:

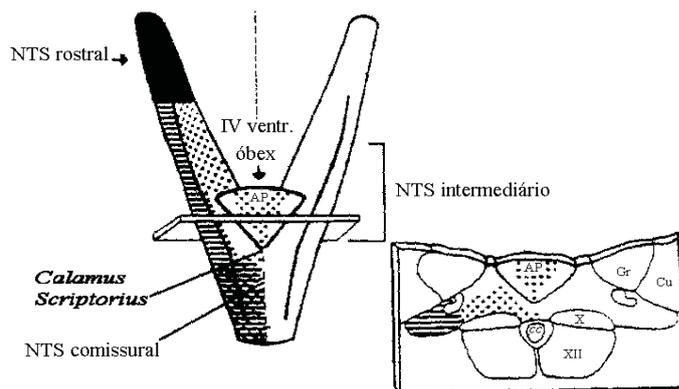


FIGURA 1 - Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTS intermediário (AP=área postrema; cc=canal central; Gr=núcleo gracile; Cu=núcleo cuneato; X=núcleo dorsal motor do nervo vago; XII=núcleo hipoglossal). [Modificado de Ter Horst & Streefland, 1994]

Além das aferências cardiovasculares e de osmorreceptores periféricos, o NTS também recebe projeções da AP que, como demonstrada na esquema acima, está situada dorsalmente ao NTS. A AP é um órgão circunventricular, e, portanto, livre de barreira hematoencefálica e rica em receptores de ANG II^{35,49}. As informações geradas pelos osmorreceptores periféricos também convergem para a AP^{15,59,80}. Conseqüentemente, alterações de hormônios circulantes, como a ANG II sanguínea ou de osmolaridade da região portal, podem ser percebidas pela AP e transmitidas ao NTS. A partir do NTS, as informações sobre a pressão arterial e composição e volume do líquido extracelular podem atingir diferentes áreas do SNC envolvidas com a regulação cardiovascular e com o controle do equilíbrio hidroeletrólítico, como por exemplo, a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V), PVN, SON, órgão subfornicial (OSF), o NPBL e os núcleos vasomotores do bulbo^{19,36,47,84,86,107,110}.

A participação dos subnúcleos intermediário (iNTS) e comissural do NTS (commNTS) na regulação cardiovascular têm sido bem descrita^{25,43,66}. Embora estes núcleos sejam adjacentes, eles têm uma função diferencial nos ajustes dos reflexos cardiovasculares. Enquanto que a lesão eletrolítica do commNTS promove uma redução ou mesmo bloqueio do quimiorreflexo, mas não do barorreflexo^{24,87}, a lesão eletrolítica do iNTS promove um bloqueio do barorreflexo⁹¹⁻⁹². Ademais, a lesão do commNTS não altera a pressão arterial basal^{8,24,87}, diferente da lesão do iNTS que promove hipertensão fulminante⁷³ caso os animais não sejam previamente tratados com bloqueador ganglionar e com antagonista de vasopressina⁹¹⁻⁹².

Além de seu papel no controle do quimiorreflexo, outros estudos reportam a participação do NTS na secreção de vasopressina^{30,63}. Foi verificado que a injeção no iNTS de muscimol, agonista gabaérgico, promovia aumento da pressão arterial que era em parte decorrente da secreção de vasopressina⁶³. Sato Et al.⁸⁷ demonstraram que a lesão eletrolítica do commNTS potencializava a resposta pressora da oclusão bilateral das carótidas comuns, em parte por aumentar a secreção de vasopressina nestes ratos. Portanto, esses dois trabalhos sugerem que o NTS, seja o intermediário ou comissural, podem estar inibindo a secreção de vasopressina, pois uma vez inativado/lesado ocorreu uma maior secreção de vasopressina. As projeções do NTS, incluindo o commNTS, para o PVN e SON podem constituir a base anatômica para estas respostas neuroendócrinas de inibição da secreção de vasopressina exercida pelo NTS^{29,84-85,90}.

Mais recentemente, foi demonstrado que o commNTS possui importante participação na regulação da ingestão de água⁸. Nesse estudo do nosso laboratório, demonstramos que a lesão eletrolítica do commNTS potencializa a ingestão de água induzida pela administração subcutânea de isoproterenol (30 µg/kg, sc), um agonista β-adrenérgico que induz sede por ativar o sistema renina-angiotensina e por promover hipotensão^{54,64}. É importante salientar que a lesão do commNTS não afeta a hipotensão induzida pelo isoproterenol, o que sugere que a potencialização da ingestão de água em animais com lesão não está relacionada com as alterações cardiovasculares promovidas pela injeção de isoproterenol⁸. Estudos mais recentes também demonstraram que o commNTS está envolvido com a regulação da ingestão de sódio induzida pela depleção de sódio⁷⁷. Esses autores sugerem que a maior ingestão de sódio nos animais com lesão do commNTS possa estar relacionada com uma inibição de mecanismos inibitórios gastrointestinais⁷⁷.

Experimentalmente, a osmolaridade plasmática pode ser aumentada de diversas maneiras, tais como privação hídrica, infusão de salina hipertônica, ou pela administração intragástrica (ig) de salina hipertônica, as quais produzem, de maneira geral, respostas neurohumorais imediatas que incluem ativação do sistema nervoso simpático, aumento da pressão arterial e liberação de vasopressina e ocitocina, sede e natriurese^{3,7,12,45,55,83,93,100,112,114}.

Os osmorreceptores centrais podem ser ativados por injeções centrais de salina hipertônica, ou por meio de qualquer manobra experimental que promova um aumento da osmolaridade plasmática⁴², o que levaria a ativação desses receptores

que estão nos órgãos circunventriculares, tais como o OSF e no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT)^{10,42,68}. Um dos protocolos capazes de promover aumento da osmolaridade plasmática é a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. Neste protocolo, a concentração de sódio e a osmolaridade aumentam 4%, mas o volume plasmático permanece inalterado⁸³. A ingestão de água após a sobrecarga de NaCl 2 M é consequência da ativação desses osmorreceptores centrais, localizados em áreas prosencefálicas^{11,68}. Estudos funcionais têm demonstrado que a lesão do OSF ou da região AV3V (o OVLT faz parte da região AV3V) reduzem a ingestão de água induzida por um aumento da osmolaridade plasmática^{39,72,97}. Além da ingestão de água, o aumento na osmolaridade plasmática pode também induzir natriurese. O mecanismo pelo qual o aumento da osmolaridade induz natriurese ainda não é bem compreendido, mas um dos mecanismos que certamente contribuem é a liberação de ocitocina (OT), já que este hormônio induz perda de sódio e é liberado quando há aumento da osmolaridade plasmática^{3,55,69}. Aumentos na pressão arterial^{37,82} e na atividade simpática^{2,109} são também observados quando há um aumento da osmolaridade plasmática. Esses aumentos podem ser, pelo menos em parte, devido a ação da vasopressina produzida e liberada pelo PVN e SON. Dados da literatura também demonstraram que há forte marcação de c-Fos, sugerindo ativação neuronal, em células do PVN e do SON quando há um aumento da osmolaridade plasmática seja devido à privação hídrica^{40,75} ou por infusão intravenosa de salina hipertônica^{49,50}. Mais recentemente, a participação de osmorreceptores hepáticos (periféricos), cujos aferentes cursam por meio do nervo vago^{44,53}, parecem também contribuir para a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de sódio hipertônico^{60-61,101}. Esses trabalhos demonstraram que a ingestão de água induzida por sódio hipertônico ig ocorre mesmo antes de haver algum aumento na osmolaridade plasmática^{61,101}, sugerindo que a hiperosmolaridade do conteúdo duodenal e/ou do sangue na região hepatoportal atua como um sinal rápido que estimula a ingestão de água. Uma participação das aferências dos osmorreceptores periféricos tem sido também envolvida no aumento da excreção renal de Na⁺ frente a uma hiperosmolaridade na região hepatoportal⁵³.

Kobashi et al.⁵⁹ já demonstraram que após a sobrecarga de salina hipertônica os neurônios do commNTS e iNTS apresentaram marcação para proteína c-Fos, indicando que após a sobrecarga de salina hipertônica há ativação desta região. Estudos do nosso laboratório⁷ demonstraram que em animais com lesão crônica do

commNTS há uma potencialização ingestão de água quando os animais são submetidos a um aumento da osmolaridade plasmática, causado por uma sobrecarga intragástrica (ig) de NaCl 2 M. Além de um aumento na ingestão de água, esses animais apresentam também aumento da pressão arterial média sem alteração na frequência cardíaca, além de apresentarem uma grande natriurese quando comparados a animais com lesão fictícia (sham), como demonstrado nas figuras abaixo, no entanto não se sabe quais mecanismos estão envolvidos nessas respostas.

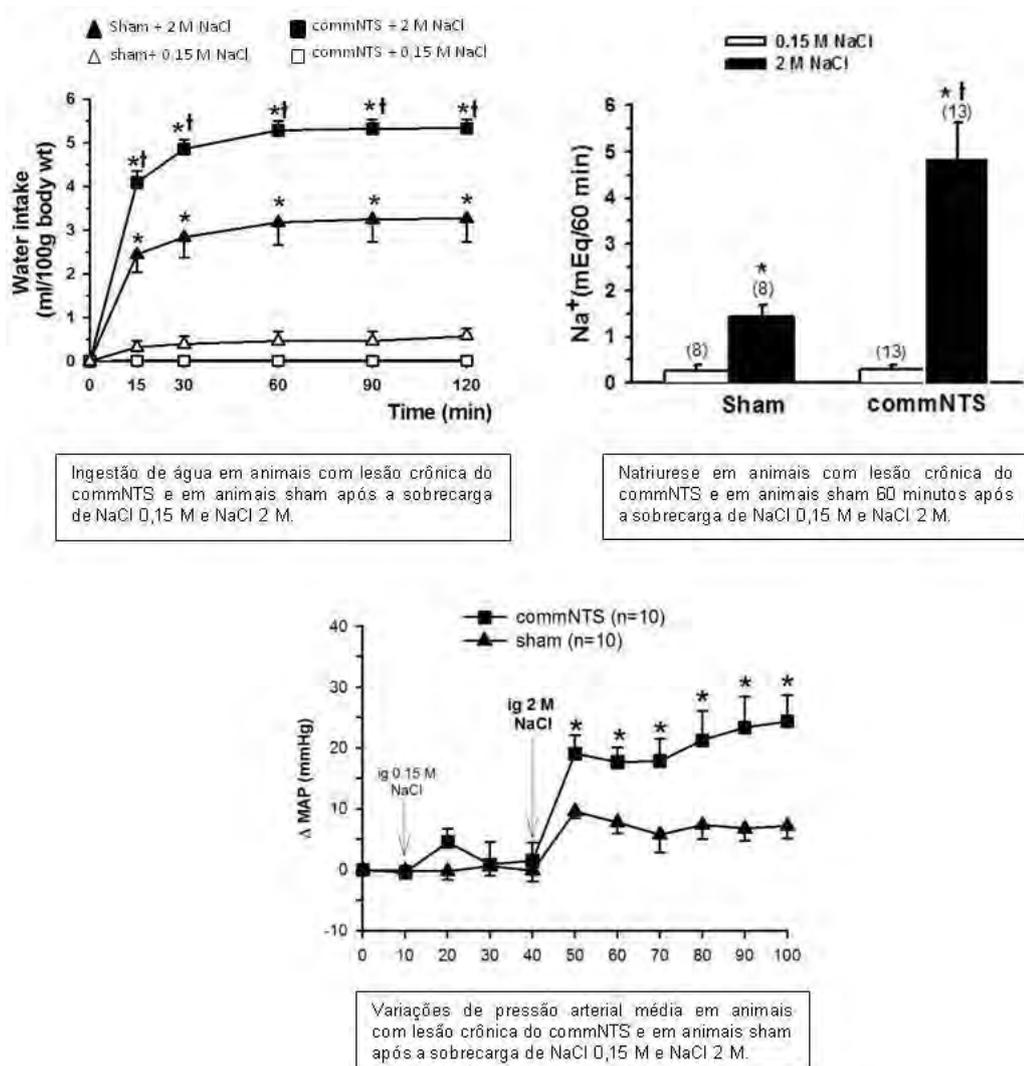


FIGURA 2 – Resultados prévios do nosso laboratório.

Dados da literatura tem demonstrado que, aumentos da osmolaridade plasmática na ordem de 6% (maior do que o aumento de 4% observado após a sobrecarga de NaCl 2 M)⁸³, causado por ingestão de solução de NaCl 2% por 6 dias (sem acesso a água), é capaz de elevar 3 vezes acima do normal os valores de

RNA_m para AVP no PVN¹¹⁵. Outros estudos demonstram que a privação hídrica de 3 dias, promove alterações nos valores de RNA_m para diversos genes, incluindo para a vasopressina e ocitocina, no PVN e no SON^{38,48}. Esses dados sugerem que as alterações no transcriptoma possam estar relacionadas com as mudanças crônicas da atividade do sistema hipotálamo-hipofisário durante aumentos na osmolaridade plasmática. As respostas à privação hídrica são mediadas em parte pela ativação de neurônios do PVN, os quais são ativados por osmorreceptores centrais situados em várias regiões do prosencéfalo, como o OSF e OVLT^{10,42,95,109}, no entanto não se sabe se podem ocorrer alterações no transcriptoma frente a aumentos agudos da osmolaridade plasmática, como é o caso da gavagem ig com NaCl 2 M.

Kraly et al.⁶¹ demonstraram que a administração por infusão intragástrica de determinadas concentrações de soluções hipertônicas de NaCl são capazes de promover o aumento da osmolaridade apenas na região da veia porta, mas não da osmolaridade plasmática como um todo, e ainda assim são capazes de promover ingestão de água. Uma das concentrações de NaCl utilizadas para se conseguir esse aumento da osmolaridade somente na região hepato-portal e hepato-intestinal e que é efetiva para promover uma discreta ingestão de água é a solução de NaCl 0,6 M administrada intragastricamente⁶¹. Além disso, a ingestão de água causada pela sobrecarga de NaCl 0,6 M, pode ser atenuada por injeções centrais de losartan (antagonista de receptores angiotensinérgicos AT1) e injeções subcutâneas de losartan ou PD123319 (antagonista de receptores angiotensinérgicos AT2)⁶². Trabalhos demonstraram também que a sobrecarga intragástrica de NaCl 0,6 M⁹⁸ ou NaCl 0,3 M¹³ é capaz de aumentar a expressão da proteína c-Fos no SON e PVN. No entanto não sabemos se o commNTS tem algum papel importante nas respostas de ingestão de água, regulação cardiovascular e de excreção urinária após a ativação dos osmorreceptores periféricos localizados na região da veia porta utilizando-se a sobrecarga ig de NaCl 0,6 M.

OBJETIVOS

Demonstramos anteriormente que animais com lesão da porção comissural do NTS (commNTS) tem maior ingestão de água, natriurese e resposta pressora frente a sobrecarga intragástrica (ig) de NaCl 2 M. Os mecanismos responsáveis por estas alterações ainda não foram determinados. Uma vez que o estímulo com NaCl 2 M ig ativa osmorreceptores centrais e periféricos, não sabemos até o momento os efeitos da lesão do commNTS sobre as respostas observadas após a estimulação específica de osmorreceptores periféricos que pode ser feita com NaCl 0,6 M ig. Desta forma os nossos objetivos foram:

a) estudar os mecanismos que medeiam o aumento da pressão arterial e da natriurese após a sobrecarga de NaCl 2 M em animais com lesão do commNTS;

b) verificar as alterações na expressão da proteína c-Fos no PVN e no SON após NaCl 2 M ig em ratos com lesão fictícia (sham) ou lesão do commNTS;

c) verificar as alterações na expressão gênica (MIF, AVP, AT1 e OT) no PVN após NaCl 2 M ig em ratos intactos (naïve),

d) estudar os efeitos na pressão arterial, na ingestão de água e na excreção renal subseqüentes a administração de NaCl 0,6 M ig, bem como os mecanismos responsáveis pelas alterações, em ratos com lesão fictícia (sham) ou lesão do commNTS;

e) verificar as alterações na expressão da proteína c-Fos após NaCl 0,6 M ig em ratos com lesão fictícia (sham) ou lesão do commNTS.

MATERIAL E MÉTODO

1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman, pesando entre 280 - 320 g, fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia e Farmácia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”-UNESP, câmpus de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável em uma sala com ciclo claro-escuro 12:12 horas (luzes acesas das 7:00 às 19:00 horas), com temperatura ($23 \pm 3^\circ \text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas; e com água de torneira e ração granulada *ad libitum*. Todos os experimentos estão de acordo com as normas do comitê de ética para experimentação animal da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP, campus de Araraquara (CEEA, protocolo 08/2007).

Nos experimentos feitos no laboratório do Dr. Colin Sumners, na Universidade da Flórida (UF), foram utilizados ratos adquiridos do laboratório Charles River (Wilmington, MA, USA), da linhagem Sprague-Dawley. Os animais foram mantidos em duplas, em caixas livres de patógenos específicos (SPF), em ciclo claro-escuro de 12:12 horas, com temperatura ($23 \pm 3^\circ \text{C}$) e umidade ($55 \pm 10\%$) controladas e com água e ração granulada *ad libitum*. Todos os experimentos foram de acordo com as normas do Comitê institucional para uso e cuidado animal (IACUC) da Universidade da Flórida (protocolo: 200810725).

2 Lesão do NTS comissural (commNTS)

Os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg de peso corporal, cloridrato de cetamina, União Química farmacêutica Nacional S/N, Embú-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal, União Química farmacêutica Nacional S/N, Embú-Guaçu, SP, Brasil) administrada intraperitonealmente, e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). A cabeça dos animais foi posicionada 11 mm abaixo da linha interaural. A musculatura da nuca foi cuidadosamente rebatida expondo o osso occipital e a membrana atlanto-occipital. Após a separação da dura-máter do osso occipital, este foi parcialmente removido utilizando-se um osteótomo. A membrana atlanto-occipital foi aberta e a dura-máter rebatida, expondo assim, o *calamus scriptorius*, que foi

então utilizado como ponto de referência para as coordenadas estereotáxicas, a saber: 0,4 mm, 0,7 mm e 1,0 mm caudal e 0,0 mm lateral ao *calamus scriptorius*; e 0,1 mm ventral à superfície dorsal do bulbo nos três pontos de lesão eletrolítica (2 x 1 mA por 5 s, com intervalo de 30 s entre elas). Nos ratos com lesão sham (lesão fictícia), o eletrodo foi posicionado nas mesmas coordenadas estereotáxicas, mas não houve passagem de corrente.

Após as lesões, a musculatura da nuca e a pele foram suturadas, e os animais receberam uma dose profilática de pentabiótico veterinário (benzilpenicilina 80000 IUs + streptomycin 33 mg, intramuscular, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brasil) e de anti-inflamatório cetoprofeno (ketoprofen 1%, 1 mg/kg de peso corporal, Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil). Os experimentos foram realizados entre 15 e 20 dias após as lesões eletrolíticas como descrito em estudo prévio⁸.

3 Estímulo osmótico

Foram utilizadas duas formas distintas de estímulo ósmotico: NaCl 0,6 M e NaCl 2 M. A administração intragástrica (ig) de NaCl 0,6 M (2 ml) é capaz de aumentar a osmolaridade da região hepatoportal e hepatointestinal, sem no entanto alterar os valores de osmolaridade totais¹³. Já a administração ig de NaCl 2 M (2 ml), produz elevação de 4% da osmolalidade plasmática e da concentração de sódio. Esse forte estímulo reduz a atividade da renina plasmática, mas não altera o volume plasmático, indicando que o volume do compartimento extracelular não é alterado por este procedimento⁸³. Para ambos os protocolos, como controle foi utilizada a sobrecarga de NaCl isotônico (0,15 M). A sobrecarga foi administrada em animais conscientes e com pequena contenção de movimentos.

4 Registro da pressão arterial (PA) e da frequência cardíaca (FC) em animais não anestesiados

No dia anterior ao experimento, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina + xilazina conforme descrito no item anterior para a cateterização da artéria e veia femorais, para o registro das variáveis cardiovasculares e para a injeção de drogas, respectivamente. No final da cateterização da artéria e veia femorais, os cateteres foram exteriorizados no dorso do animal, na região próxima a escápula, e suturadas na pele do animal. No dia

seguinte, o cateter para registro da pressão arterial foi conectada a um transdutor de pressão (Statham Gould, Cleveland, OH, USA) e acoplado a um amplificador (ETH-200, CB Sciences Inc, Dover, NH, USA) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments, Sydney, AUS). A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada e simultaneamente derivou-se a pressão arterial média (PAM) a partir do sinal de PAP, e a frequência cardíaca (FC) foi calculada como a frequência instantânea do sinal de PAP.

5 Medidas de ingestão de água

A quantidade de água ingerida foi quantificada por meio de buretas de vidro graduadas em 0,1 ml, adaptadas com um bico de metal. Os animais não tiveram acesso à ração durante os experimentos de ingestão.

6 Coleta de sangue e determinações bioquímicas

Em animias profundamente anestesiados com tiopental (tiopental sódico, 80 mg/kg, intraperitoneal, Cristália Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda, Campinas, Brasil), o sangue foi coletado por punção cardíaca em tubos pré-refrigerados a 4° C contendo anticoagulante e gel separador (K2 EDTA, 7.2 mg, VACUETTE, Greiner Bio-One Brasil, Americana, SP, Brasil). As amostras de sangue retiradas foram centrifugadas a 1500 rpm por dez minutos e foram analisadas as concentrações de Na⁺ no soro e de proteínas totais imediatamente após a centrifugação. As determinações de Na⁺ no soro foram feitas por potenciometria, utilizando-se eletrodos seletivos (NOVA 1, Nova Biomedical, Mississauga, Ontario, Canadá). A determinação das proteínas totais foi feita por refratometria (Refratômetro – Atago, Bellevue, WA, USA).

7 Dosagem de vasopressina e ocitocina

Os animais foram decapitados e o sangue troncular foi coletado em tubos plásticos refrigerados contendo heparina (50 µl). As amostras de sangue foram centrifugadas (1940g por 20 minutos a 4°C) e o plasma foi separado e mantido em freezer -20°C. Para a extração de vasopressina e ocitocina a partir do plasma foi usado éter de petróleo e acetona, e as determinações foram feitas através de radioimunoensaio específico e todas as amostras foram dosadas no mesmo ensaio.

8 Radioimunoensaio para vasopressina (AVP)

Para o radioimunoensaio da vasopressina foram utilizados: a) anti-corpo primário anti-AVP feito em coelho (IHC 8103, Bachem, Torrance, CA, USA); b) hormônio marcado, ^{125}I -[Arg 8]-vasopressina; e c) anti-corpo secundário, anti-coelho feito em cabra, desenvolvido no laboratório de neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia-FMRP (USP-RP).

9 Radioimunoensaio para ocitocina (OT)

Para o radioimunoensaio da ocitocina foram utilizados: a) anti-corpo primário anti-OT feito em coelho o gentilmente cedido por M. Morris (Wright State University, Dayton, Ohio, USA); b) hormônio marcado, ^{125}I -[OT] (IHC 8152, Bachem, Torrance, California, USA) e c) anti-corpo secundário anti-coelho feito em cabra, desenvolvido no laboratório de Neuroendocrinologia do Departamento de Fisiologia-FMRP/USP.

A marcação de ambos os peptídeos e sua prévia purificação por cromatografia de alta resolução foram realizadas no laboratório de Neuroendocrinologia do Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, Departamento de Fisiologia, FMRP-USP.

10 Real time RT-PCR para expressão gênica

O tecido cerebral, no caso o núcleo paraventricular do hipotálamo, foi extraído com a ajuda de um microscópio cirúrgico pela técnica de microdissecção ou “punch”, aonde o encéfalo foi colocado em uma matriz e dissecado. Utilizando-se como ponto de referência o quiasma óptico, a região que contém o PVN foi microdissecada e o material colhido foi então transferido para um tubo livre de RNase e homogenizado com 200 μl de solução tampão para a extração do RNA (β -mercaptanol + tampão RLT). O tecido foi então homogeneizado com auxílio de um micro motor e mantido a 4°C. As amostras foram posteriormente centrifugadas por 3 min a 12.000 rpm, e o RNAm foi extraído utilizando-se o RNase kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). As amostras de RNAm foram submetidas a reação de transcriptase reversa em tempo real para transformação de RNAm em cDNA (iScript, Bio-Rad, Hercules, CA, USA). As sequências de cDNA obtidas a partir da reação foram usadas para quantificação através de sondas comerciais específicas para determinados genes (MIF, AT1, AVP e OT) e sempre para o 18s (RNA constitutivo – gene repórter). As reações com 45 ciclos foram realizadas em um

aparelho ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA). A amplificação da sequência alvo foi detectada em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando existe formação de dupla fita na região codificada pelo par de iniciadores. Os dados foram normalizados pela quantidade de cDNA da proteína 18s.

11 Perfusão e fixação do tecido encefálico

Ao final dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com uma dose de tiopental (tiopental sódico, 80 mg/kg, intraperitoneal, Cristália Produtos Químicos farmacêuticos Ltda, Campinas, SP, Brasil). A seguir, o coração foi exposto cirurgicamente, e os animais foram submetidos à perfusão com solução de formalina 10% (20 ml). Em seguida, os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por pelo menos 72h. Os cortes histológicos (50 μ m) forem montados em lâminas gelatinizadas e corados pelo método de Nissl, usando o corante Giemsa, e analisados no microscópio óptico de luz (Nikon) para se localizar os pontos de lesão no commNTS.

No grupo de animais em que foi realizado procedimentos imunohistoquímicos os animais foram profundamente anestesiados com tiopental (tiopental sódico, 80 mg/kg, intraperitoneal, Cristália Produtos Químicos farmacêuticos Ltda, Campinas, SP, Brasil) e perfundidos com salina tamponada (PBS 0,1 M; pH = 7.4) seguido de uma solução de paraformaldeído (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 4% (PFA 4%) em PBS 0,1 M. Os cérebros foram removidos e estocados em 30% de sacarose em solução de PBS 0,1 M (pH = 7,4). Após o armazenamento à 4° C por não mais que 1 semana, os cérebros foram congelados e cortes coronais de 30 μ m do prosencéfalo foram seccionados em um criostato (Leica, CM1800, Bannockburn, IL, USA) e coletados em placas de cultura com 24 poços contendo PBS 0,1 M para serem submetidos ao procedimento de imunohistoquímica.

12 Imunohistoquímica para detecção de c-Fos e dupla marcação para c-Fos/vasopressina ou c-Fos/ocitocina

Um corte a cada 5 (cada 150 μ m) da região hipotalâmica foi processada para análise imunohistoquímica para detecção de c-Fos. Os cortes hipotalâmicos foram pré-incubados por 10 minutos em 3% de peróxido de hidrogênio em PBS 0,1 M (Sigma, St. Louis, MO, USA) seguido por lavagem com PBS 0,1 M (3 x 10 min). A

seguir os cortes foram incubados por 15 minutos em solução bloqueadora composta de 10% de soro normal de cabra (NGS; Sigma, St. Louis, MO, USA) e Triton-X 0,3% (Sigma, St. Louis, MO, USA) em PBS 0,1 M, seguido de lavagens em PBS (3 x 10 minutos). Os cortes foram então incubados em um anticorpo primário policlonal anti-c-Fos feito em coelho (1:20.000, Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA, USA) em PBS contendo 1% de NGS e Triton X-100 0,3% por 48 horas à 4°C. Após a incubação em anticorpo primário, as seções foram lavadas em PBS (3 x 10 minutos) antes de serem incubadas por uma hora em anticorpo secundário biotilado anti-coelho feito em cabra (1:500, em PBS contendo 1% NGS e Triton-X 0,3%; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) em temperatura ambiente. Após essa incubação os cortes foram lavados (PBS 0,1 M, 3 x 10 minutos) e novamente incubados por mais uma hora em Strept-avidin HRP (1:500, em PBS 0,1 M contendo 1% NGS e Triton-X 0,3%; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) em temperatura ambiente. Diaminobenzidina (DAB) foi utilizada para produzir a reação nuclear que promove a coloração castanha no núcleo. Os cortes foram então montados em lâminas gelatinizadas, desidratadas em álcool, limpas em xilol e cobertas com lamínulas.

As células positivas ao c-Fos foram contadas bilateralmente em seções contendo o PVN e SON do hipotálamo em uma a cada cinco seções (30 a cada 150 µm). O PVN foi dividido em porção magnocelular (mPVN) e parvocelular (pPVN). Os neurônios foram contados em microscópio de luz (Nikon) com uma magnificação de 20x.

Em outros dois conjuntos de seções do hipotálamo, após incubação com solução bloqueadora como descrito acima, foi realizada dupla marcação utilizando anticorpo primário policlonal anti-c-Fos feito em coelho (1:10.000, Ab-5, Calbiochem, San Diego, CA, USA) e anticorpo primário monoclonal anti-neurophysin II feito em camundongo (1:200; derivado da vasopressina; PS41) ou anticorpo primário monoclonal anti-neurophysin I feito em camundongo (derivado da ocitocina, PS38), ambos gentilmente cedidos pelo prof. H. Gainer (National Institutes of Neurological Diseases and Stroke, National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA),^{5,41,113}. Os cortes foram incubados por 48 horas em anticorpo primário (anti c-Fos 1:10.000, anti-vasopressina 1:500 ou anti-ocitocina 1:500) em PBS 0,1 M contendo 1% de NGS e 0,3% de Triton-X 100 por 48 horas à 4°C. Após a incubação no anticorpo primário, os cortes foram lavados em PBS 0,1% (3 x 10 minutos) para então serem

novamente incubados por mais 1 hora em anticorpo anti-coelho biotilado feito em cabra (1:500, em PBS contendo 1% NGS e Triton-X 0,3%; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA). Após essa incubação os cortes foram novamente lavados (3 x 10 minutos em PBS 0,1 M) e incubados por mais uma hora em Strept-avidin Alexa Fluor 488 conjugate e Alexa Fluor 594 anti-camundongo feito em cabra (ambos 1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Após serem lavados em PBS (0,1 M, 3 x 10 minutos), os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas e secos por 10-15 minutos e então cobertas com *antifade fluorescent mounting solution* (VectorShield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), para diminuir a perda da fluorescência. As seções (cada 150 μm) foram visualizadas e em microscópio de fluorescência usando um microscópio Leica DM IRB (com C-Plan optics; Leica, Wetzlar, Germany) utilizando o filtro apropriado, em seções semelhantes, representativas dos diferentes grupos.

13 Substâncias utilizadas:

- NaCl 0,15 M;
- NaCl 0,6 M;
- NaCl 2 M;
- fenilefrina: 2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (agonista adrenérgico $\alpha 1$);
- nitroprussiato de sódio (NPS): 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (vasodilatador, doador de NO);
- cianeto de potássio (KCN): 40 $\mu\text{g}/\text{rato}$ (bloqueador da cadeia respiratória celular – indutor de hipóxia);
- $\rightarrow[\beta\text{-Mercapto-}\beta,\beta\text{-Cyclopentamethylenepropionyl}^1,\text{O-Me-Tyr}^2,\text{Arg}^8]\text{-}$
Vasopressin: 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, composto de Manning (antagonista de receptores V1 – Sigma, St. Louis, MO, USA)
- $\rightarrow[\text{Arg}^8]\text{-}$ Vasopressin: 12,5 ng/rato (arginina vasopressina; Sigma, St. Louis, MO, USA)

14 Análise Estatística

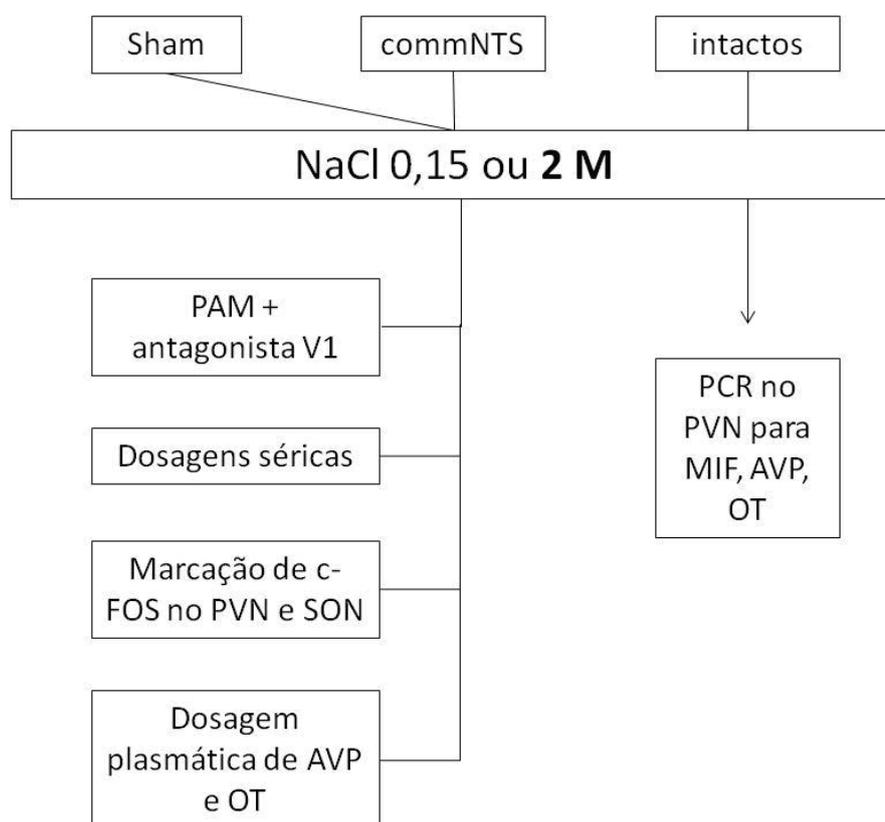
Os dados foram expressos como média \pm EPM e analisados pelo teste *t* de Student ou pela análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) associadas ao Student-Newman-Keuls, conforme o mais apropriado, assumindo-se como significante $p < 0,05$.

Parte 1:

Lesão do commNTS e sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M

Sabendo que animais com lesão no commNTS tem potencialização na ingestão de água e natriurese, e facilitação na reposta pressora após a sobrecarga com NaCl 2 M, nesta primeira parte investigamos os possíveis mecanismos que estão envolvidos nessas respostas.

Grupos experimentais



PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS – Parte 1

1 Participação da vasopressina na resposta pressora em animais com lesão do commNTS após administração intragástrica (ig) de NaCl 2 M.

Resultados prévios (descritos na Introdução) demonstraram que animais com lesão do commNTS tem um significativo aumento na PAM após NaCl 2 M (2 ml, ig), ao contrário de animais sham, aonde a sobrecarga não altera significativamente os níveis de pressão arterial. Testamos a participação da vasopressina (AVP) nas respostas cardiovasculares induzidas por NaCl 2 M ig em animais com lesão crônica. Inicialmente, ratos sham (lesão fictícia) ou com lesão do commNTS foram conectados a um sistema de registro e a PAM e FC foram registradas em ratos acordados. Aproximadamente 20 min após o início dos registros cardiovasculares, o barorreflexo foi testado com administração intravenosa (iv) de uma dose pressora de fenilefrina (2,5 µg/kg de peso corporal) e a uma dose hipotensora de nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de peso corporal) e o quimiorreflexo foi testado com uma injeção iv de cianeto de potássio (KCN, 40 µg/0,1 ml/rato). O intervalo entre essas injeções foi de 5 min. Nos mesmos animais, aproximadamente 20 min após término dos testes de baro e quimiorreflexo, foi injetado composto de Manning (10µg/kg, iv) ou salina (NaCl 0,15 M; 0,2 ml/rato), e após 10 min foi realizada gavagem de NaCl 2 M (2 ml). As alterações na PAM e na FC foram registradas por mais 60 min após a gavagem. O efeito pressor da vasopressina (12,5 ng/rato, iv – [Arg⁸]-Vasopressin, Sigma, St. Louis, MO, USA) foi testado antes e 5 e 70 min (final dos experimentos) após a administração do composto de Manning para verificar a eficácia do bloqueio dos receptores V1 de AVP durante o período experimental.

2 Efeito da lesão do commNTS sobre parâmetros sanguíneos após sobrecarga de NaCl 2 M.

Em alguns animais do grupo anterior, 3-4 dias após os experimentos de bloqueio de receptores vasopressinérgicos e medidas de pressão arterial, aproximadamente às 17 horas, a ração foi retirada das gaiolas para que no momento do experimento os animais estivessem com o estômago vazio (jejum de 16 h). No período da manhã do dia seguinte, foi realizada a sobrecarga ig de NaCl 0,15 M ou NaCl 2 M (2 ml, ig). Após 15 minutos os animais foram profundamente anestesiados com tiopental (tiopental sódico, 80 mg/kg, intraperitoneal, Cristália Produtos Químicos farmacêuticos Ltda, Campinas, SP, Brasil). Foi então realizada punção cardíaca para retirada de sangue, para posterior análise dos valores séricos de Na⁺, K⁺ e quantidade total de proteínas.

3 Efeito da lesão do commNTS na expressão da proteína c-Fos no PVN e SON após a sobrecarga de NaCl 2 M (ig).

Em um grupo experimental, foi testado os efeitos da gavagem ig de NaCl 0,15 M ou NaCl 2 M (2 ml) na expressão da proteína c-Fos na regiões parvocelular e magnocelular do PVN (pPVN e mPVN, respectivamente) e no SON em ratos com lesão do commNTS ou ratos sham.

Durante sete dias consecutivos os animais receberam, no primeiro dia, uma sobrecarga de NaCl 2 M e nos seis dias subsequentes uma sobrecarga de NaCl 0,15 M. Este procedimento foi feito para minimizar qualquer possibilidade de expressão da proteína c-Fos relacionada ao estresse do procedimento. No dia do experimento, água e ração foram removidas das gaiolas, e todos os ratos (sham, n = 3-4/grupo e commNTS, n = 3-4/grupo) receberam gavagem ig de 2 ml de NaCl 0,15 M ou 2 M. Duas horas após a gavagem, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental (tiopental sódico, 80 mg/kg, intraperitoneal, Cristália Produtos Químicos farmacêuticos Ltda, Campinas, SP, Brasil). Os procedimentos de perfusão, imunohistoquímica para detecção de c-Fos e de contagem celular, bem como de visualização da dupla marcação (c-Fos/AVP ou c-Fos/OT) foram realizados conforme descrito na seção dos Métodos.

4) Efeito da sobrecarga de NaCl 2 M na secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) em animais sham e com lesão do commNTS após sobrecarga de NaCl 2 M (ig).

Em um grupo de animais sham ou com lesão do commNTS, o sangue troncular foi coletado em tubos plásticos contendo heparina (50 µl) 20 minutos após a sobrecarga de NaCl 0,15 M ou NaCl 2 M. As amostras de sangue foram centrifugadas (1940g por 20 minutos a 4°C) e o plasma foi separado e mantido em freezer -20°C. Para a determinação de AVP e OT plasmáticas, as amostras foram extraídas de 1 ml de plasma com acetona e éter de petróleo. Os valores plasmáticos de AVP e OT foram medidos por meio de radioimunoensaio conforme descrito anteriormente (Ruginsk et al, 2007; Godino et al 2010). A sensibilidade do ensaio e o coeficiente de variação intra e entre ensaios foram respectivamente 0.7 pg/ml, 7.6% and 12% para AVP, e 0.9 pg/ml, 6.8% and 12.6% para OT.

5) Efeito da sobrecarga de NaCl 2 M (ig) sobre a expressão gênica no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN).

Em um grupo de animais intactos (sham) foi realizada a gavagem de NaCl 0,15 M ou NaCl 2 M (2 ml) e após 2 horas os animais foram anestesiados em uma cuba contendo isoflurano e decapitados. O encéfalo foi rapidamente removido e o PVN foi dissecado e foi feita a extração de RNA e conversão em cDNA conforme descrito nos Métodos. O cDNA foi processado com as sondas de interesse, a saber: fator inibitório de migração de macrófagos (MIF), receptores de angiotensina do tipo 1 (AT1), vasopressina (AVP), ocitocina (OT) e 18s (gene repórter).

RESULTADOS – Parte 1

1 Análise histológica da lesão do commNTS.

As lesões do commNTS foram restritas ao commNTS (Figura 3), deixando intacto o NTS intermediário, o núcleo hipoglosso (n. XII), e a area postrema (AP) conforme demonstrado em estudos anteriores^{8,24,87}.

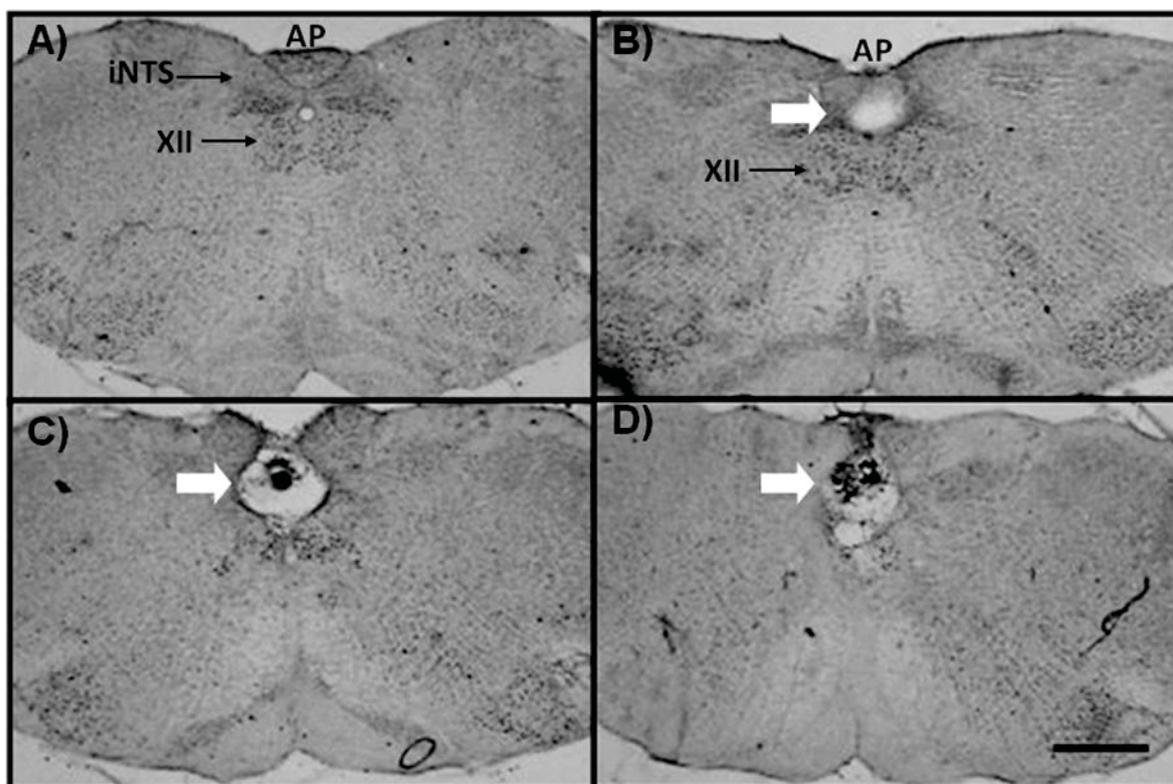


FIGURA 3 - Fotomicrografia de seções coronais rostro-caudais (A a D) do núcleo do trato solitário (NTS) mostrando uma lesão eletrolítica representativa do NTS comissural (B ao D, setas). iNTS, NTS intermediário; XII (n. hipoglosso) e AP (área postrema). Escala de barra = 200 μ m.

2 Participação da vasopressina na resposta pressora em animais com lesão do commNTS após sobrecarga de NaCl 2 M (ig).

Ratos com lesão do commNTS (N = 18) não tiveram alteradas a PAM e FC basais (112 ± 3 mmHg e 332 ± 10 bpm, respectivamente) comparado com os ratos sham (N=19; 115 ± 2 mmHg vs. 341 ± 6 bpm). As lesões do commNTS não produziram alterações na bradicardia ou na taquicardia reflexa induzidas respectivamente pela fenilefrina e nitroprussiato de sódio (Tabela 1). Entretanto, a resposta pressora do quimiorreflexo induzida pela administração de KCN iv foi reduzida, enquanto que a resposta bradicárdica não foi alterada (Tabela 1).

Como demonstrado anteriormente, animais com lesão do commNTS tem um resposta pressora após a sobrecarga de NaCl 2 M que não é observada em animais sham. Essa resposta pressora induzida por NaCl 2 M ig em ratos lesados foi completamente abolida pela administração prévia (10 min antes de NaCl 2 M ig) do antagonista de receptores V1 da vasopressina (commNTS + ant-V1 iv: 4 ± 3 vs. commNTS+salina iv: 23 ± 3 mmHg/60 min após gavagem), $F(3,288)=51,932$; $p < 0.05$], (Figuras 4 e 5). A eficácia do bloqueio dos receptores V1 durante todo o procedimento experimental pode ser verificado na Tabela 2.

Tabela 1 - Variações da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) em animais sham e com lesão do commNTS após fenilefrina (fenil), nitroprussiato de sódio (NPS) e cianeto de potássio (KCN)

	Sham (N=19)		commNTS (N=18)	
	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)
fenilefrina	61 \pm 2	-121 \pm 15	62 \pm 2	-101 \pm 14
NPS	-41 \pm 2	104 \pm 4	-43 \pm 2	100 \pm 4
KCN	64 \pm 3	-202 \pm 14	52 \pm 3*	- 182 \pm 14

Os resultados estão expressos como média \pm EPM.

*diferente de sham (Student *t* test; $p < 0.05$).

Tabela 2 - Alterações na PAM (mmHg) induzidas pela vasopressina (12,5 ng/rato, iv) antes e 5 e 70 min após a administração de antagonista de receptores V1 de vasopressina (composto de Manning, 10 μ g/kg, iv) em ratos com lesão commNTS ou ratos sham

Grupo	N	AVP basal	AVP 5 min	AVP 70 min
		PAM (mmHg)	PAM (mmHg)	PAM (mmHg)
Sham	19	28 \pm 5	-3 \pm 2 *	0 \pm 1*
commNTS	18	33 \pm 4	-4 \pm 2*	2 \pm 1*

Valores são expressos como média \pm EPM. N = número de animais

* diferente de AVP basal (Student *t* test; $p < 0.05$).

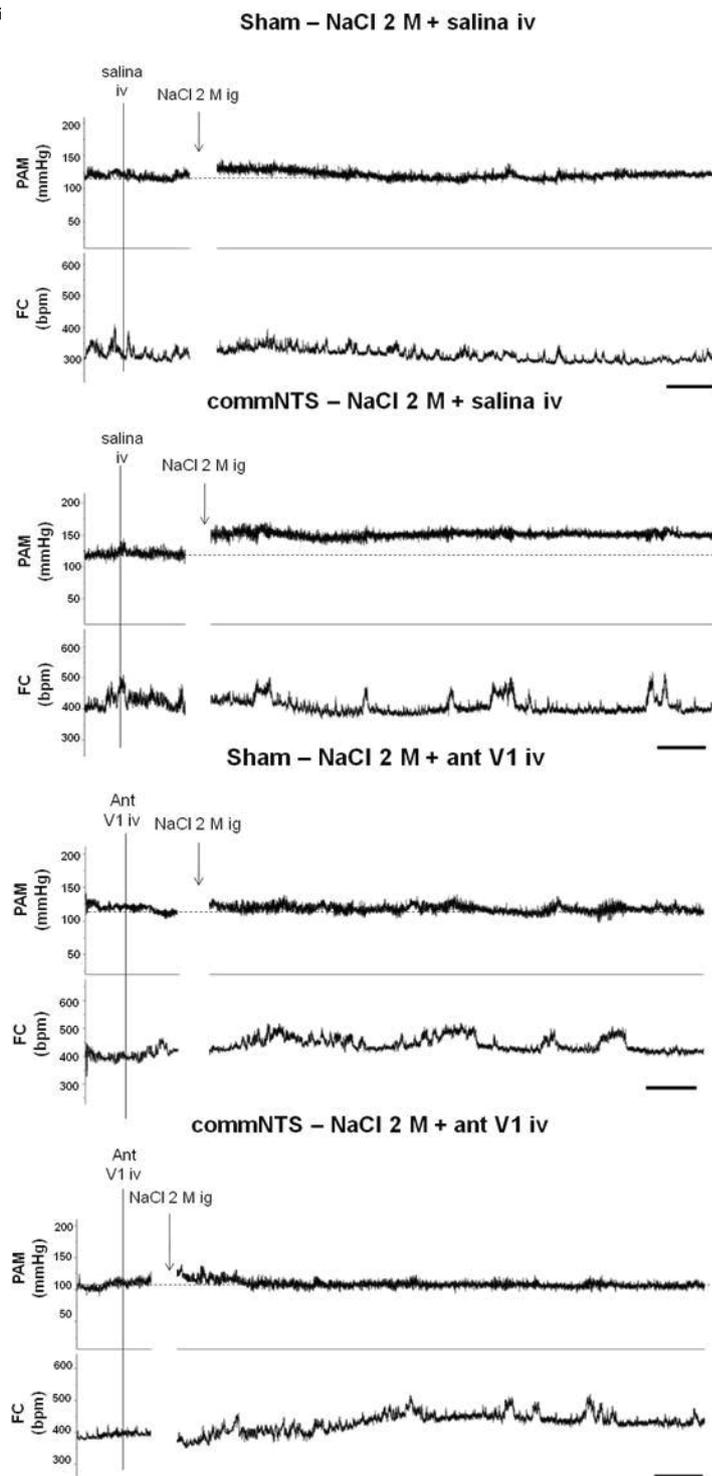


FIGURA 4 – Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos sham e com lesão do commNTS que receberam injeções intravenosas de salina ou antagonista de receptores V1 da vasopressina antes da gavagem de NaCl 2 M (2 ml). Setas indicam o momento da gavagem. Escala = 10 minutos.

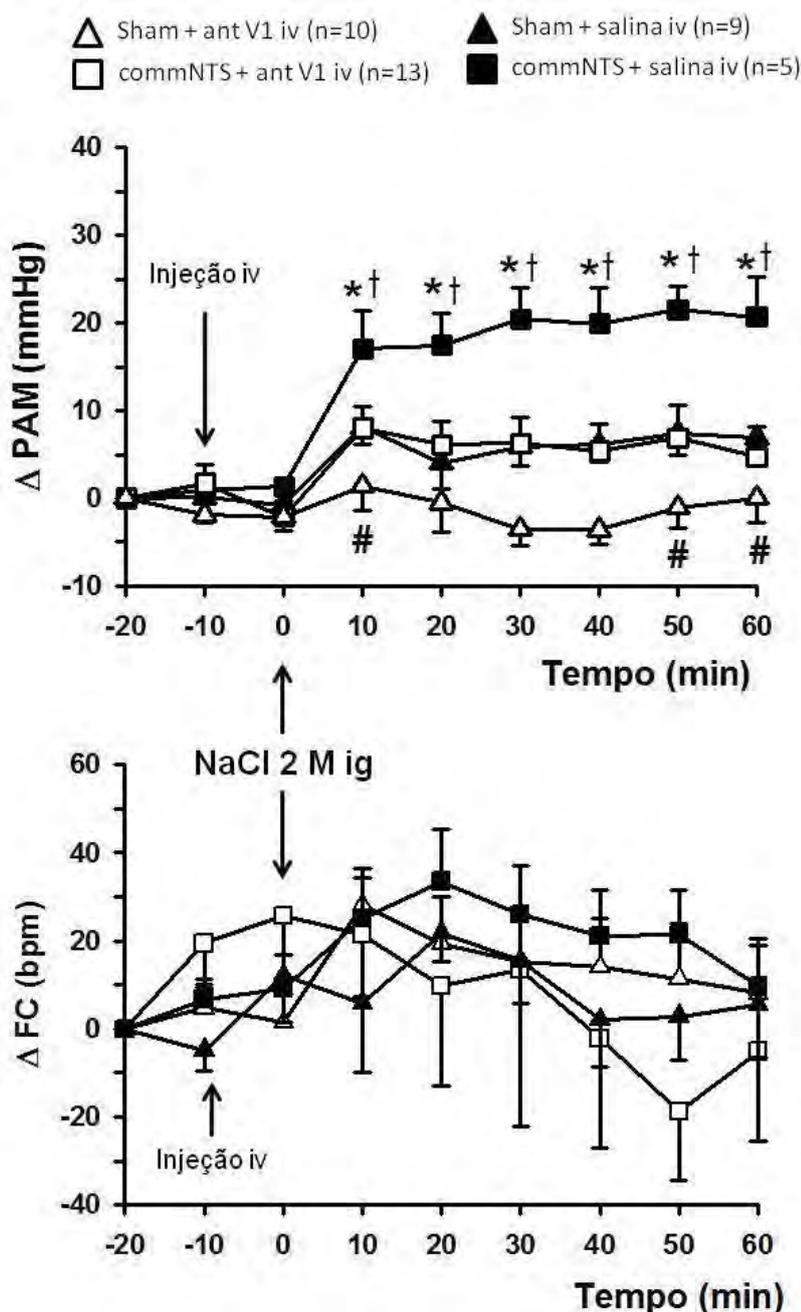


FIGURA 5: Alterações na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) em ratos sham e ratos com lesão do commNTS após administração intragástrica de NaCl 2 M em ratos pré-tratados com salina ou antagonista de receptores V1 de vasopressina (Manning Compound, 10 µg/kg peso corporal, iv). Resultados estão expressos como média ± EPM. N = número de animais. * diferente de 0 min; † diferente dos outros tratamentos, # diferente de sham + salina iv (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; P < 0,05).

3 Sódio, potássio e proteína plasmáticos em animais com lesão do commNTS após a sobrecarga de NaCl 2 M (ig).

Na tabela 3, podemos observar que 20 minutos após a sobrecarga de NaCl 2 M ambos os grupos (sham e commNTS) apresentaram um aumento de igual magnitude do sódio sérico [$F(3,16) = 13,573$; $p > 0.05$], sem alterações nos valores séricos de potássio [$F(3,16) = 1,170$; $p > 0.05$], ou de proteínas no soro [$F(5,30) = 2,176$; $p > 0.05$].

Tabela 3 - Valores de proteína sérica total (PT), sódio sérico (S_{Na}) e potássio sérico (S_k) 20 min após a sobrecarga de NaCl 2 M or NaCl 0,15 M ig (2 ml) em ratos com lesão do commNTS ou sham

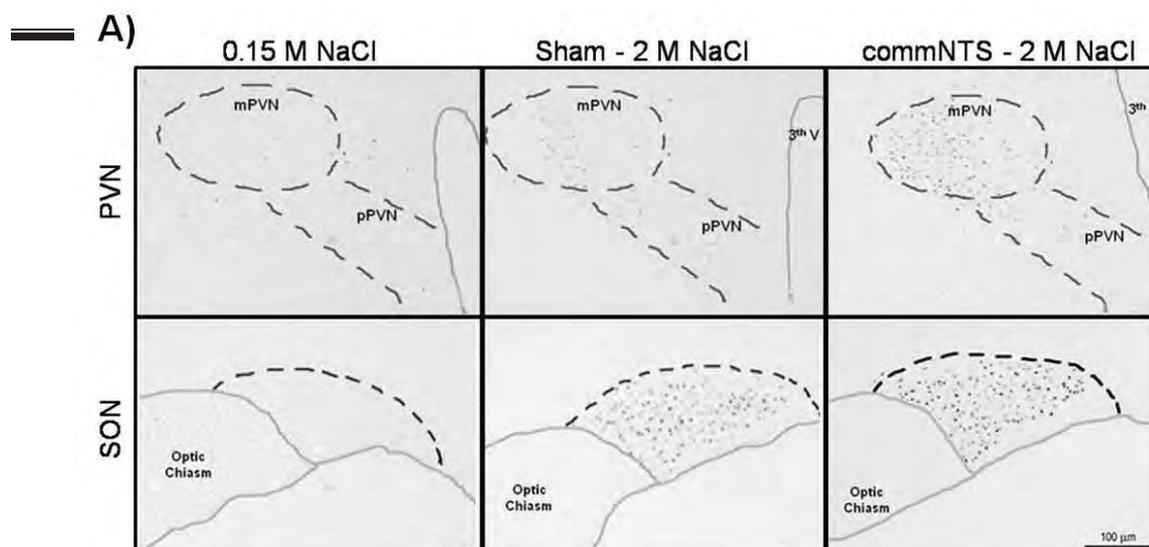
Grupo	N	Tratamento	PT (g/%)	S_{Na} (mEq/l)	S_k (mEq/l)
Sham	6	NaCl 0,15 M	6,1 ± 0,2	140 ± 1,2	6,1 ± 0,1
Sham	6	NaCl 2 M	6,3 ± 0,1	146 ± 0,7 *	6,3 ± 0,1
commNTS	7	NaCl 0,15 M	6 ± 0,1	141 ± 0,6	6 ± 0,1
commNTS	7	NaCl 2 M	6,3 ± 0,1	147 ± 0,7 *	6,3 ± 0,1

Valores são expressos como média ± EPM. N = número de animais.

*diferente de NaCl 0,15 M; $p < 0,05$ (ANOVA de duas de vias associado ao Student-Newman-Keuls).

4 Expressão da proteína c-Fos e dupla marcação para vasopressina e ocitocina no PVN e SON em animais com lesão do commNTS após sobrecarga de NaCl 2 M (ig).

NaCl 2 M ig induziu expressão de c-Fos na porção magnocelular do PVN em ratos sham e em ratos com lesão do commNTS (Figura 6A e 6B). Contudo este aumento foi maior nos ratos com lesão do commNTS comparado aos ratos sham (139 ± 22 vs. sham: 70 ± 13 células positivas/seção – a cada 150 μ m bilateralmente) [$F(3,9)=27,275$; $p < 0.05$], (Figura 6A e 6B). Na região parvocelular do PVN, NaCl 2 M também aumentou a expressão da proteína c-Fos em ratos sham e em ratos com lesão do commNTS [$F(3,9)=27,889$; $p < 0.05$], entretanto o aumento no número de células imunopositivas ao c-Fos foi semelhante entre os grupos (Figuras 8A e 8B). No SON, gavagem de NaCl 2 M também induziu expressão de c-Fos em ratos sham e em ratos com lesão do commNTS, e de maneira semelhante à porção magnocelular do PVN, nos ratos com lesão do commNTS o aumento no número de células imunopositivas ao c-Fos após NaCl 2 M ig foi maior do que o observado nos ratos sham (270 ± 11 vs. sham: 191 ± 12 células positivas/seção), [$F(3,9)=307,638$; $p < 0.05$], (Figuras 4A e 4B). Nas Figuras 7 e 8 podemos observar dupla marcação (amarelo) das células imunopositivas ao c-Fos (verde) que também apresentaram imunorreatividade a vasopressina ou a ocitocina (ambas em vermelho, respectivamente Figura 7 e Figura 8), em ratos sham e ratos com lesão do commNTS.



B)

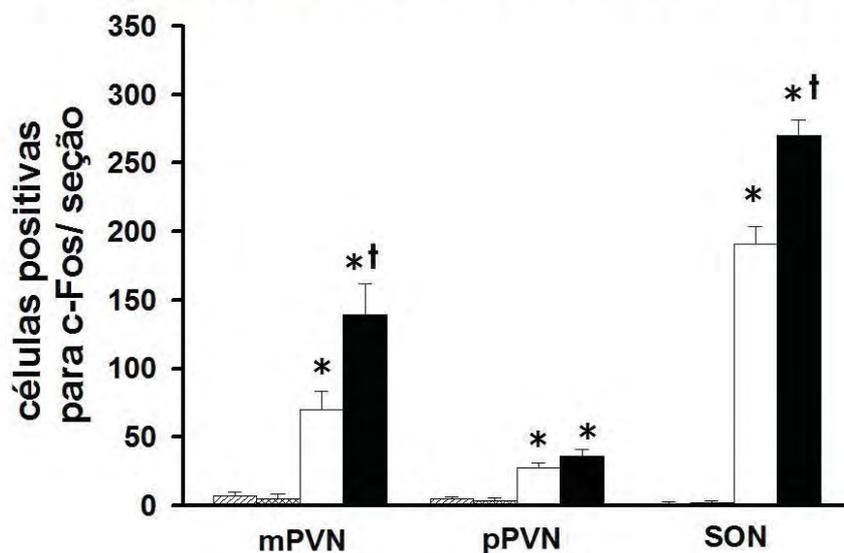


FIGURA 6 - A) Fotomicrografia de seções coronais representativas de expressão de c-Fos nas porções magnocelular (mPVN) e parvocelular (pPVN) do núcleo paraventricular do hipotálamo (painel superior) e no núcleo supraoptico (painel inferior), (barra = 100 µm);. **B)** Células imunopositivas ao c-Fos por seção nas porções magnocelular (mPVN) e parvocelular (pPVN) do núcleo paraventricular do hipotálamo e no núcleo supraoptico (SON) em animais do grupo sham e do grupo com lesão do commNTS após a sobrecarga de NaCl 0,15 M ou NaCl 2 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * diferente de NaCl 0,15 M; † diferente de sham + NaCl 2 M. $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls).

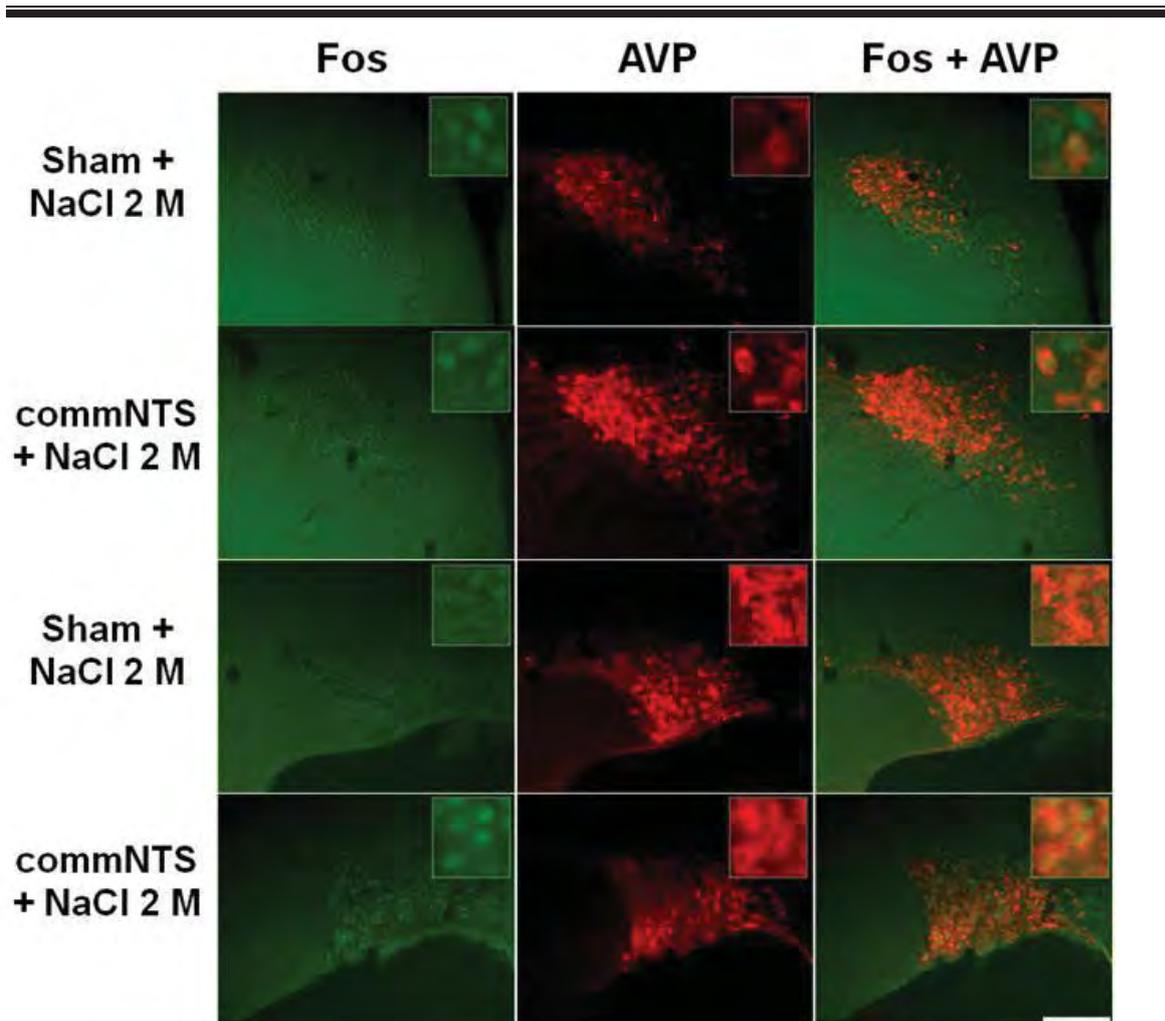


FIGURA 7 - Fotomicrografia de cortes coronais representativos para c-Fos (verde) e vasopressina (AVP, vermelho) e dupla marcação (Fos+AVP, sobreposição em amarelo) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo supraoptico (SON). Barra de escala= 200 μ m.

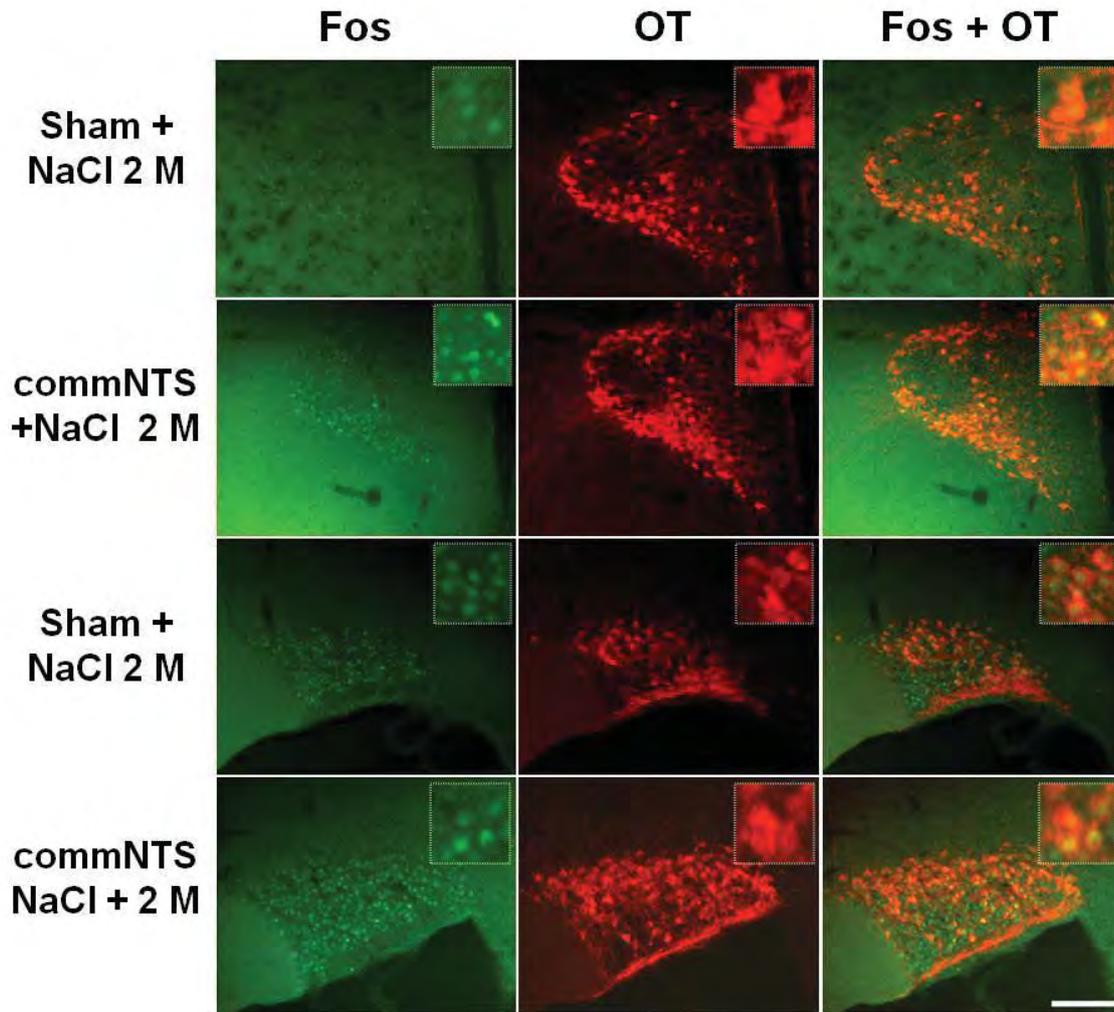


FIGURA 8 - Fotomicrografia de cortes coronais representativos para c-Fos (verde) e ocitocina (OT, vermelho) e dupla marcação (Fos+OT, sobreposição em amarelo) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo supraoptico (SON). Barra de escala= 200 μ m.

5 Efeito da sobrecarga de NaCl 2 M na secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) em animais sham e com lesão do commNTS após sobrecarga de NaCl 2 M (ig).

A sobrecarga de NaCl 0,15 M não altera os valores basais de vasopressina e ocitocina circulantes em animais sham ou com lesão do commNTS. A sobrecarga de NaCl 2 M promoveu em animais lesados um maior aumento nos valores plasmáticos de AVP quando comparados a animais sham (21 ± 8 vs. sham: $6,6 \pm 1,3$ pg/ml) [$F(3,27) = 4,131$; $p < 0.05$] (figura 9). Por outro lado, a gavagem com NaCl 2 M induziu um aumento semelhante nos valores plasmáticos de OT em animais lesados e sham (commNTS: 27 ± 9 vs. sham 21 ± 7 pg/ml) [$F(3,30) = 5,927$; $p < 0.05$] (figura 9).

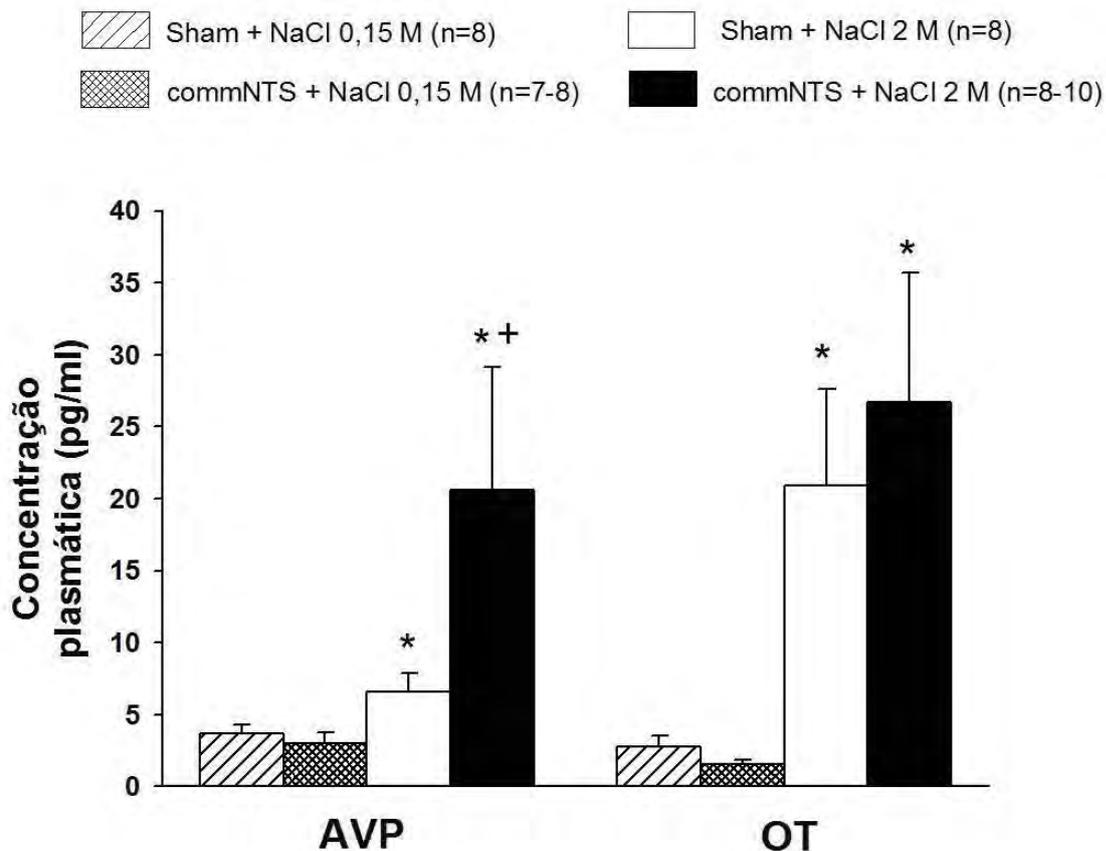


FIGURA 9 - Concentração plasmática de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) em animais sham ou com lesão do commNTS, 20 minutos após a administração intragástrica com NaCl 2 M (2 ml). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. *diferente de NaCl 0,15 M; + diferente de sham + NaCl 2 M. $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls).

6 Expressão gênica no PVN após sobrecarga de NaCl 2 M (ig) em animais intactos.

Em ratos intactos, foi observado um aumento nos valores de RNAm para AVP ($0,6 \pm 0,1$ vs. NaCl 0.15 M: $0,21 \pm 0,07$ unidades arbitrárias; ua), OT ($0,51 \pm 0,12$ vs. NaCl 0.15 M: $0,16 \pm 0,03$ ua), MIF ($0,82 \pm 0,05$ vs. NaCl 0,15 M: $0,58 \pm 0,07$ ua) e AT1R ($0,74 \pm 0,08$ vs. NaCl 0.15 M: $0,32 \pm 0,05$ ua) (figura 10).

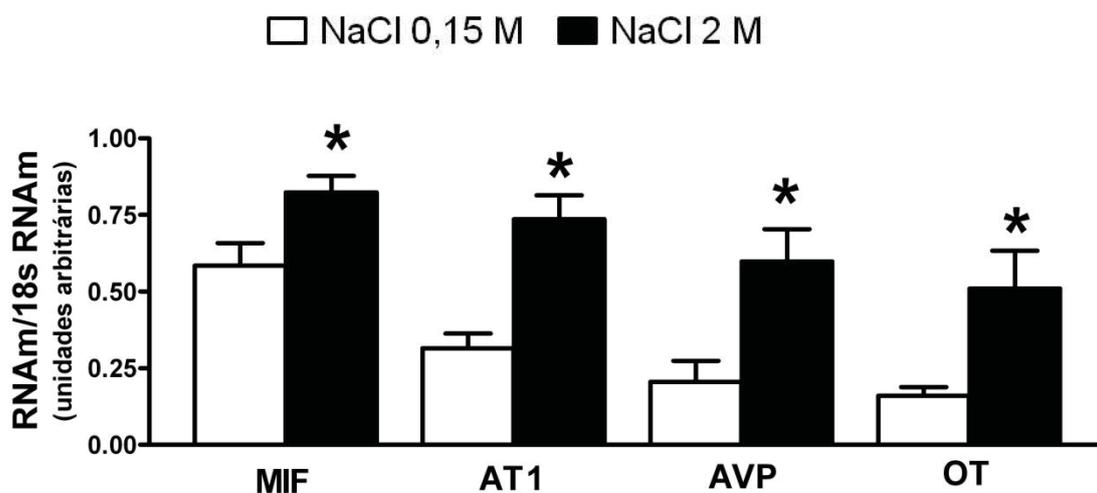


FIGURA 10 - Quantidade de RNAm no PVN em animais intactos, 120 minutos após a administração intragástrica com NaCl 2 M (2 ml). Os resultados foram expressos como média \pm EPM. *diferente de NaCl 0,15 M. (Student *t* test; $p < 0.05$).

Resumo – Parte 1

Nesta primeira parte observamos que a sobrecarga ig de NaCl 2 M promove:

1) Aumento da PAM dependente de vasopressina, maior expressão de c-Fos em neurônios vasopressinérgicos do mPVN e SON e valores plasmáticos mais elevados de vasopressina em ratos com lesão do commNTS;

2) Aumento semelhante na secreção de OT em ratos sham e em ratos com lesão commNTS;

3) Aumento semelhante nos valores séricos de Na⁺ em ratos sham e com lesão do commNTS,

4) Não promoveu alteração nos valores séricos de K⁺ e de proteínas totais;

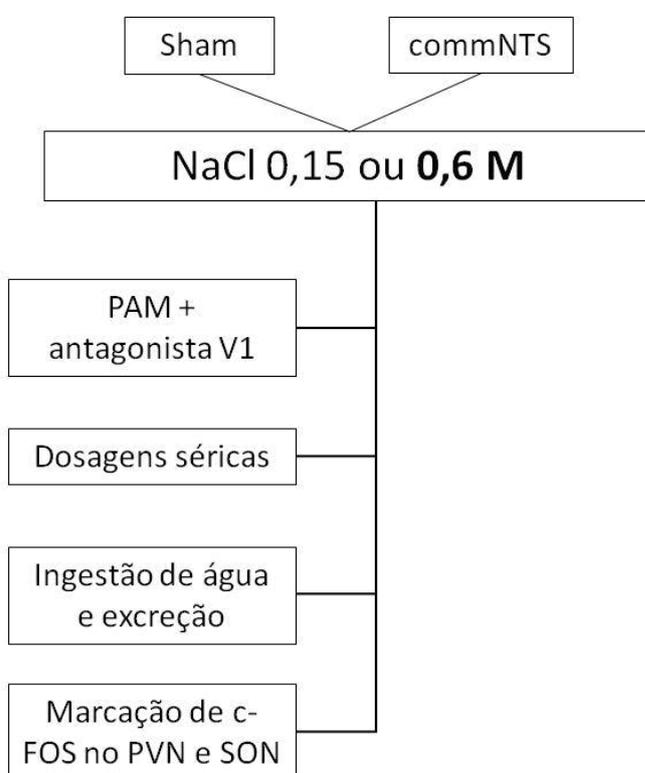
5) Em animais intactos, aumento da expressão gênica de MIF, AT1, AVP e OT no PVN 2 horas após a sobrecarga de NaCl 2M.

Parte 2:

Lesão do commNTS e sobrecarga intragástrica de NaCl 0,6 M

Sabe-se que commNTS participa de várias respostas frente a sobrecarga de NaCl 2 M, que promove aumento da osmolaridade plasmática, que ativa osmorreceptores centrais e periféricos. Diferente da sobrecarga de NaCl 2 M, a sobrecarga com NaCl 0,6 M promove pequena ingestão de água apenas pela ativação de osmorreceptores periféricos⁶¹. Assim nesta segunda parte nós investigamos as respostas de ingestão de água, excreção, pressão arterial e expressão de c-Fos em animais com lesão do commNTS e animais sham que receberam sobrecarga de NaCl 0,6 M.

Grupos experimentais



PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS – Parte 2

1 Efeito da lesão do commNTS na pressão arterial e frequência cardíaca após sobrecarga de NaCl 0,6 M e a possível participação da vasopressina.

Ratos sham ou com lesão crônica do commNTS foram conectados a um sistema de registro e a PAM e FC foram registradas em ratos acordados. Aproximadamente 20 min após o início dos registros cardiovasculares, NaCl 0,15 M (2 ml) e após 60 minutos receberam uma sobrecarga ig de NaCl 0,6 M (2 ml) e a PAM e FC foram registradas por mais 60 min.

Em outro grupo de ratos sham ou ratos com lesão crônica do commNTS, foi testada a participação da AVP nas respostas cardiovasculares induzidas por NaCl 0,6 M ig. Neste protocolo, aproximadamente 20 min após o início do registro da PAM e FC, foi injetado composto de Manning (10 µg/kg, iv) ou salina (NaCl 0,15 M; 0,2 ml/rato), e após 10 min foi realizada gavagem de NaCl 0,6 M (2 ml). As alterações na PAM e na FC foram registradas por mais 60 min após a gavagem. O efeito pressor da vasopressina (12,5 ng/rato, iv – [Arg⁸]-Vasopressin, Sigma, St. Louis, MO, USA) foi testado antes e 5 e 70 min (final dos experimentos) após a administração do composto de Manning para verificar a eficácia do bloqueio dos receptores V1 de AVP durante o período experimental.

2 Efeito da lesão do commNTS sobre parâmetros sanguíneos após sobrecarga de NaCl 0,6 M.

Nos mesmo animais do grupo anterior, 3-4 dias após os experimentos de bloqueio de receptores vasopressinérgicos e medidas de pressão arterial, aproximadamente às 17 horas, a ração foi retirada das gaiolas para que no momento do experimento os animais estivessem com o estômago vazio (jejum de 16 h). No período da manhã do dia seguinte, foi realizada a sobrecarga ig de NaCl 0,15 M ou NaCl 0,6 M (2 ml, ig). Após 15 minutos os animais foram profundamente anestesiados com tiopental (tiopental sódico, 80 mg/kg, intraperitoneal, Cristália Produtos Químicos farmacêuticos Ltda, Campinas, SP, Brasil). Foi então realizada

punção cardíaca para retirada de sangue, para posterior análise dos valores séricos de Na⁺, K⁺ e quantidade total de proteínas.

3 Efeito da lesão do commNTS na ingestão de água e excreção urinária após sobrecarga de NaCl 0,6 M (ig).

No dia do experimento de ingestão, água e ração foram retiradas das gaiolas, os animais receberam sobrecarga de NaCl 0,6 M ou NaCl 0,15 M e imediatamente após a sobrecarga os animais tiveram acesso a água em buretas graduadas (divisões de 0,1 ml) adaptadas com bicos de metal. A ingestão de água foi registrada aos 15, 30, 60, 90 e 120 min. A quantidade de água ingerida foi corrigida em ml/100 g de peso corporal, uma vez que ratos com lesão do commNTS perdem peso^{8,70}.

Em outro grupo de animais sham e com lesão crônica do commNTS foram realizados experimentos para verificar as alterações nos parâmetros de excreção urinária (diurese e natriurese). Esses animais foram colocados durante 4 dias em gaiolas metabólicas, uma hora por dia, para que o novo ambiente não interferisse no experimento. No dia do experimento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e receberam sobrecarga de NaCl 0,15 M ou NaCl 0,6 M sem acesso à água ou a ração, e a coleta de urina foi feita por 120 min. Após o término do experimento os animais retornaram a gaiola de origem com livre acesso a água e a comida.

4 Efeito da lesão do commNTS na expressão da proteína c-Fos no PVN e SON sobrecarga de NaCl 0,6 M (ig).

Os efeitos da gavagem de NaCl 0,15 ou 0,6 M (2 ml) na expressão da proteína c-Fos na regiões parvocelular e magnocelular do PVN (pPVN e mPVN, respectivamente) e no SON foi testada também em ratos com lesão do commNTS ou em ratos sham. Durante sete dias consecutivos os animais receberam, no primeiro dia, uma sobrecarga de NaCl 0,6 M (2 ml) e nos seis dias subsequentes uma sobrecarga de NaCl 0,15 M (2 ml). Este procedimento foi feito para minimizar qualquer possibilidade de expressão da proteína c-Fos relacionada ao estresse do procedimento. No dia do experimento, água e ração foram removidas das gaiolas, e todos os ratos (sham, n = 3 - 4/grupo e commNTS, n = 3 - 4/grupo) receberam gavagem ig de 2 ml de NaCl 0,15 M ou de NaCl 0,6 M. Duas horas após a gavagem, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg, intraperitoneal, Cristália Produtos Químicos farmacêuticos Ltda, Campinas, SP, Brasil) O procedimento de perfusão, imunohistoquímica para detecção de c-Fos e de contagem celular, bem como de visualização da dupla marcação (c-Fos/AVP ou c-Fos/OT) foram realizados conforme descrito na seção dos Métodos.

RESULTADOS- Parte 2

1 Efeito da lesão do commNTS na pressão arterial e frequência cardíaca após sobrecarga de NaCl 0,6 M e possível participação da vasopressina.

Como já demonstrado anteriormente, a lesão do commNTS não alterou os níveis basais da PAM (LF: 107 ± 3 vs. commNTS: 110 ± 5 mmHg) ou da FC (LF: 346 ± 10 vs commNTS: 364 ± 12 bpm). A sobrecarga ig com NaCl 0,15 M, como esperado, não alterou os valores de PAM (Δ sham: $-6 \pm 1,4$ vs. commNTS: -8 ± 4 mmHg) ou de FC (Δ sham: -12 ± 10 vs commNTS: -6 ± 20 bpm) em ambos os grupos (figura 11). Em contrapartida, a sobrecarga de NaCl 0,6 M promoveu resposta pressora em animais com lesão do commNTS (11 ± 3 vs. sham: -3 ± 2 mmHg) durante os 30 primeiros minutos que se seguiram a gavagem [$F(3,154) = 14,964$; $p < 0.05$]. Não houve alteração significativa em relação aos valores de FC (commNTS: 5 ± 10 vs. sham: 8 ± 17 bpm), [$F(3,154) = 0,986$] (figura 11).

Nas figuras 12 e 13 podemos observar que a resposta pressora observada em ratos com lesão do commNTS induzida pela sobrecarga ig de NaCl 0,6 M (11 ± 3 mmHg/10 min) foi completamente abolida quando os ratos lesados foram pré-tratados com composto de Manning (-4 ± 3 mmHg), [$F(3,144) = 10,195$; $p < 0.05$]. Em ratos sham, não foi observado quaisquer alterações na PAM após NaCl 0,6 M ig, tanto em ratos pré-tratados com salina iv ou em ratos pré-tratados com antagonista de vasopressina (Figuras 12 e 13). Também não foram observadas alterações significativas na FC após sobrecarga com NaCl 0,6 M em qualquer um dos tratamentos [$F(3,144) = 1,065$, $p > 0,05$].

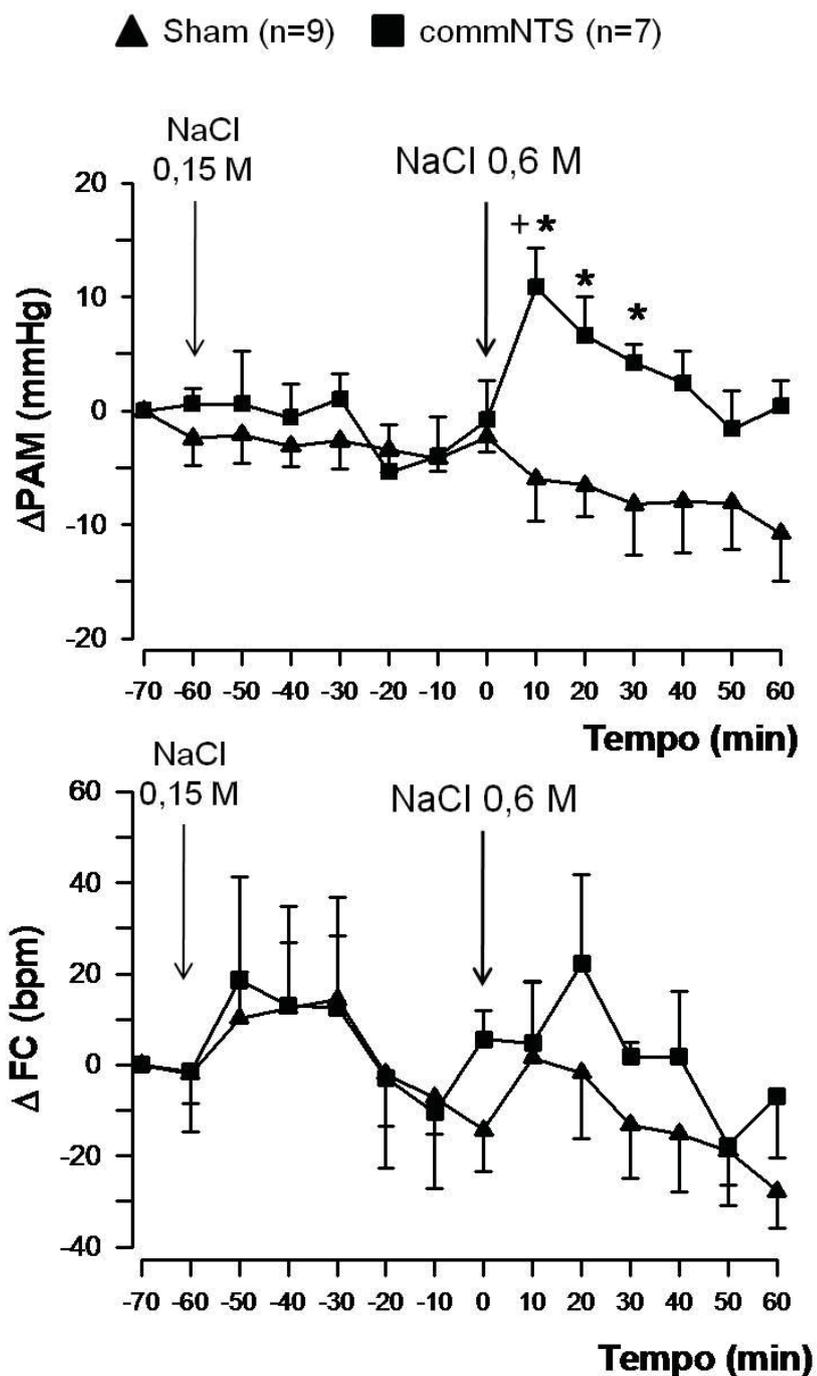


FIGURA 11 - Alterações na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) em ratos sham e ratos com lesão do commNTS após administração intragástrica de NaCl 0,6 M. Resultados estão expressos como média \pm EPM. N = número de animais. * diferente de sham; + diferente de 0 min (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

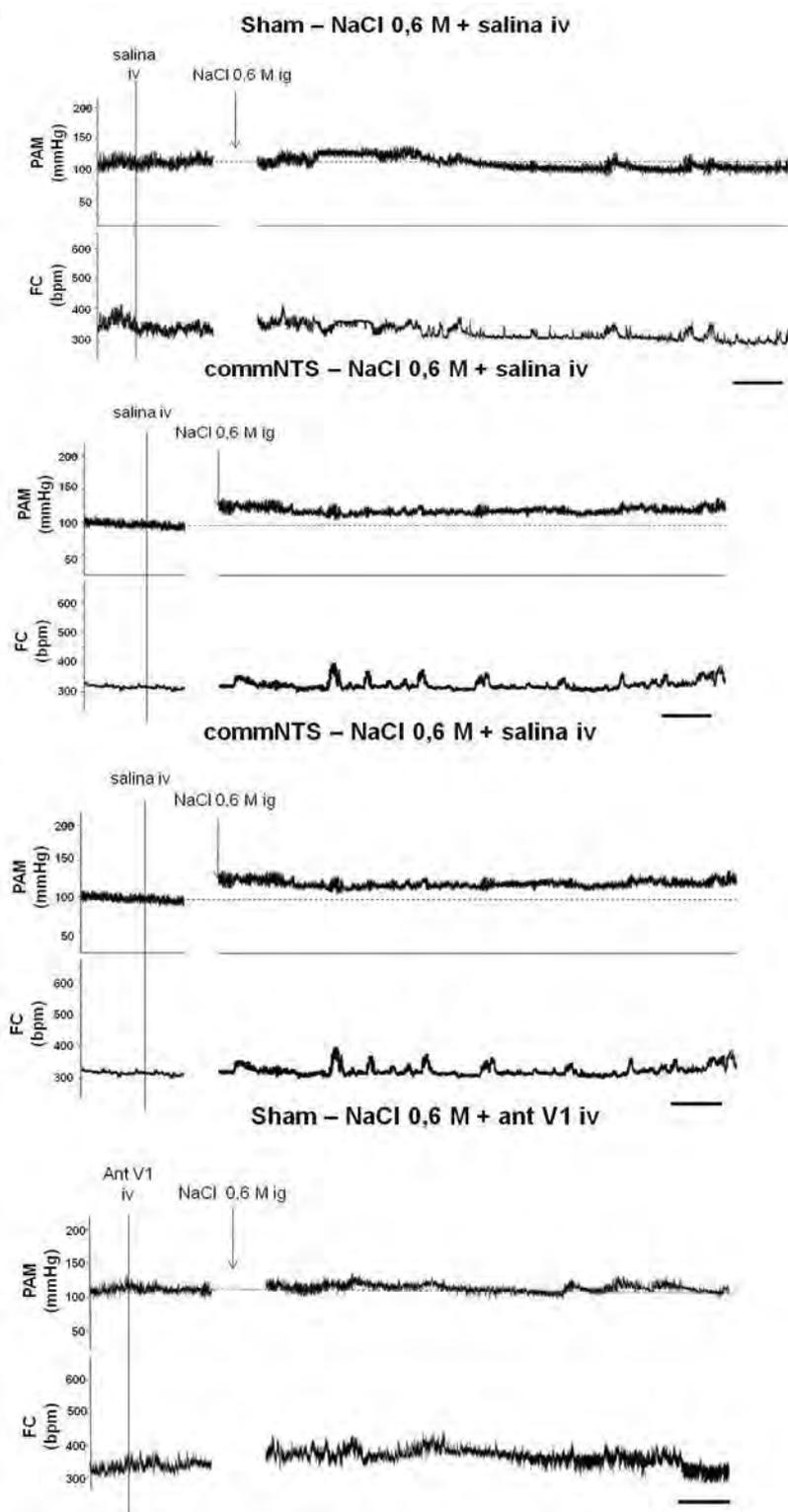


FIGURA 12 - Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos sham e com lesão do commNTS que receberam injeções intravenosas de salina ou antagonista de receptores V1 da vasopressina antes da gavagem de NaCl 0,6 M (2 ml). Setas indicam o momento da gavagem. Escala = 10 minutos.

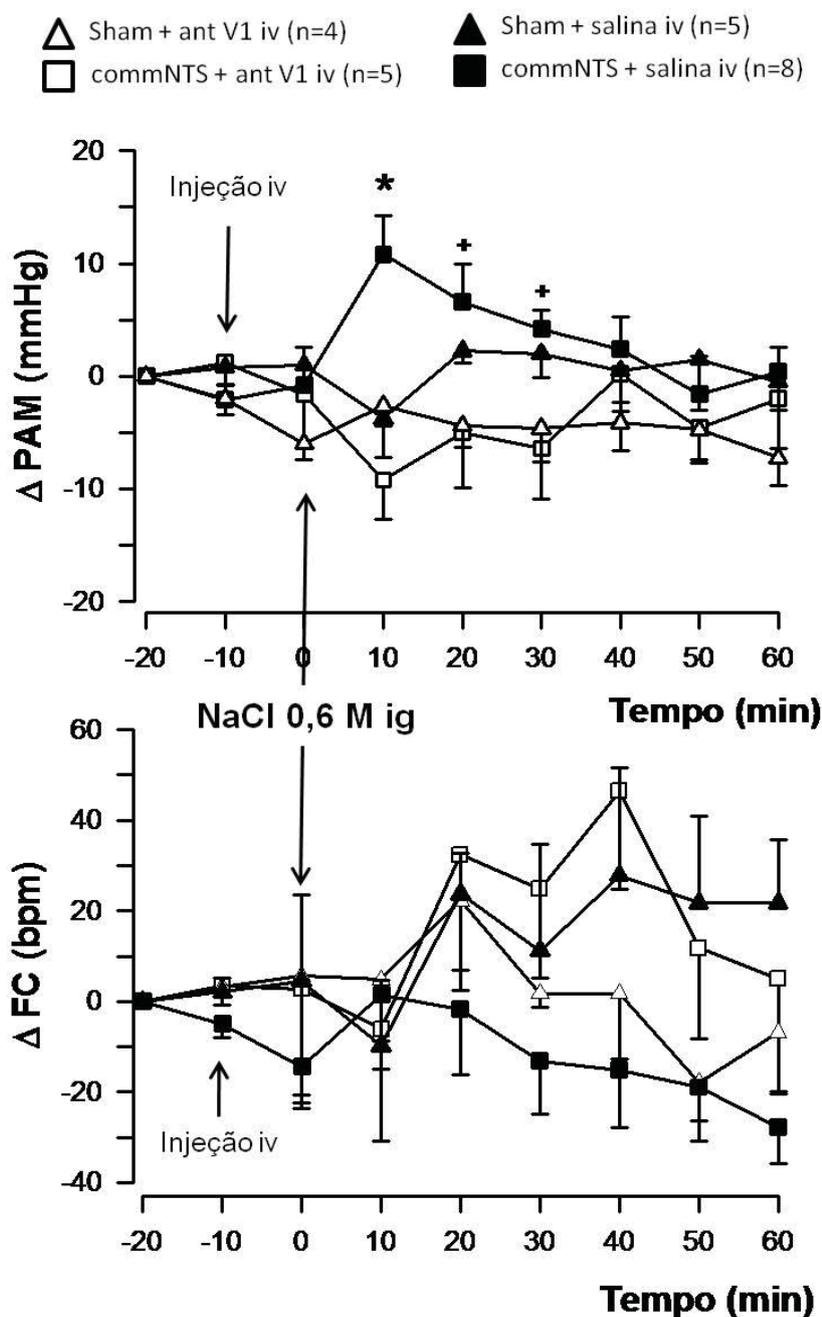


FIGURA 13 - Alterações na pressão arterial média (PAM) e na frequência cardíaca (FC) em ratos sham e ratos com lesão do commNTS após administração intragástrica de NaCl 0,6 M em ratos pré-tratados com salina ou antagonista de receptores V1 de vasopressina (Manning Compound, 10 μ g/kg peso corporal, iv). Resultados estão expressos como média \pm EPM. N = número de animais. * diferente de sham; + diferente do tempo 0 – mesmo comentário do item anterior (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $P < 0,05$).

2 Sódio, potássio e proteína plasmáticos em animais com lesão do NTS comissural (commNTS) 20 minutos após a sobrecarga de NaCl 0,6 M (ig).

Vinte minutos após a sobrecarga de NaCl 0,6 M não houve alteração das concentrações plasmáticas de sódio [$F(3,23) = 1,113; p > 0.05$], potássio [$F(3,23) = 0,693; p > 0.05$], bem como de proteínas totais [$F(3,23) = 1,619; p > 0.05$] (tabela 4).

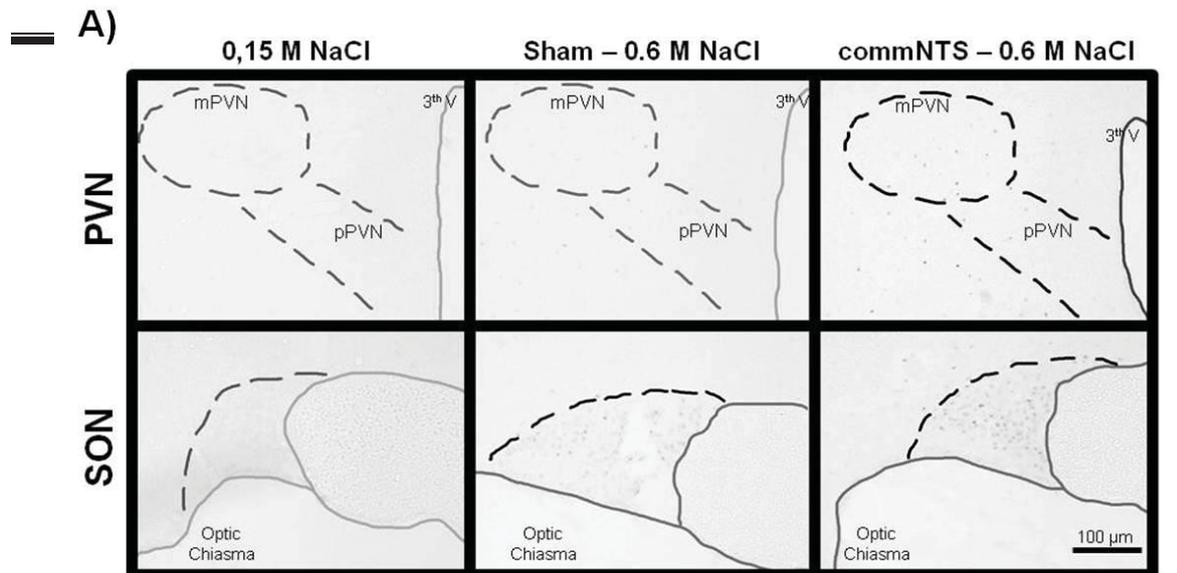
Tabela 4 - Valores de proteína sérica total (PT), sódio sérico (S_{Na}) e potássio sérico (S_k) 20 min após a sobrecarga de NaCl 0,6 M or NaCl 0,15 M ig (2 ml) em ratos com lesão do commNTS ou sham

Grupo	N	Tratamento	PT (g/%)	S_{Na} (mEq/l)	S_k (mEq/l)
Sham	9	NaCl 0,15 M	6,1 ± 0,2	140 ± 1,2	6,1 ± 0,1
Sham	9	NaCl 0,6 M	5,8 ± 0,1	142 ± 0,9	5,8 ± 0,1
commNTS	10	NaCl 0,15 M	6 ± 0,1	141 ± 0,6	6 ± 0,1
commNTS	10	NaCl 0,6 M	6,1 ± 0,1	144 ± 0,3	6,1 ± 0,1

Valores são expressos como média ± EPM. N = número de animais.

3 Efeito da lesão do commNTS na expressão da proteína c-Fos no PVN e SON sobrecarga de NaCl 0,6 M (ig).

A sobrecarga de NaCl 0,6 M não promoveu aumento significativo da expressão de c-Fos no PVN, seja na porção magnocelular [$F(3,12) = 0,449$; $p < 0.05$] ou na porção parvocelular [$F(3,12) = 0,341$; $p < 0.05$], (figura 14 A e B). No SON NaCl 0,6 M ig promoveu um aumento significativo na expressão de c-Fos em ambos os grupos, embora o aumento tenha sido significativamente maior em ratos lesados (sham: 18 ± 2 vs. commNTS: 27 ± 3 células positivas/seção,) [$F(3,12) = 42,215$; $p < 0.05$] (figura 14 A e B).



B) Sham+ NaCl 0,15 M (n=3) Sham+ NaCl 0,6 M (n=4)
 commNTS + NaCl 0,15 M (n=3) commNTS + NaCl 0,6 M (n=4)

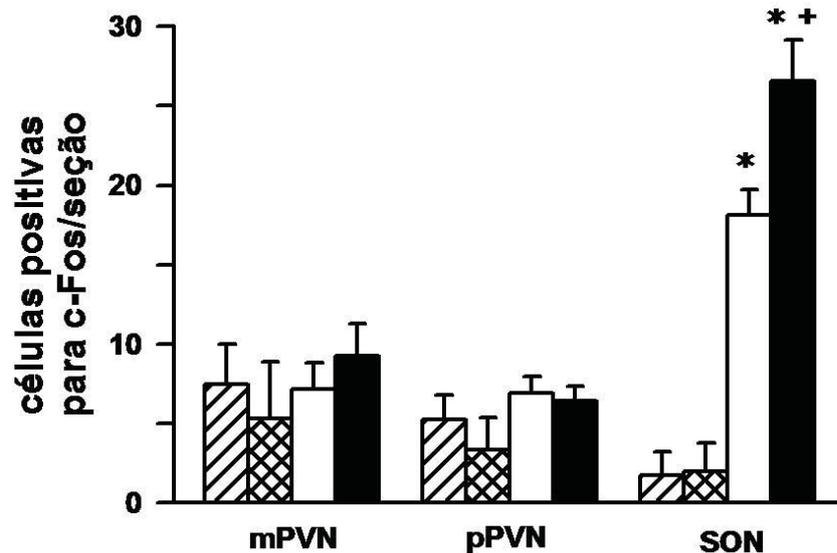


FIGURA 14 - A) Fotomicrografia de seções coronais representativas de expressão de c-Fos nas porções magnocelular (mPVN) e parvocelular (pPVN) do núcleo paraventricular do hipotálamo (painel superior) e no núcleo supraoptico (SON, painel inferior), (barra = 100 µm); **B)** Células imunopositivas ao c-Fos por seção nas porções magnocelular (mPVN) e parvocelular (pPVN) do núcleo paraventricular do hipotálamo e no núcleo supraoptico (SON) em animais do grupo sham e do grupo com lesão do commNTS após a sobrecarga de NaCl 0,15 M ou NaCl 0,6 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM. * diferente de NaCl 0,15 M; + diferente de sham + NaCl 0,6 M. $p < 0,05$ (ANOVA de duas vias associado ao Student-Newman-Keuls).

4 Ingestão de água e excreção após a sobrecarga de NaCl 0,6 M em animais com lesão do commNTS.

Os pesos corporais pré-lesão não foram diferentes entre os grupos, porém quatro dias após lesões, o peso corporal dos ratos com lesão do commNTS foi reduzido, enquanto que o peso corporal dos ratos com lesão fictícia sham estava semelhante ao basal (Tabela 5). Na fase crônica da lesão, 14 dias após cirurgia, os ratos com lesão do commNTS ganharam peso comparado ao seu valor basal, embora o ganho de peso corporal tenha sido sempre menor do que o observado nos ratos com lesão fictícia [$F(5,83)=31,430, p<0.05$], (tabela 5).

A sobrecarga de NaCl 0,6 M induziu pequena ingestão de água em ratos com lesão do commNTS e em ratos sham, porém a ingestão de água em ratos lesados apenas nos 15 primeiros minutos do experimento ($0,78 \pm 0,01$ ml vs sham: $0,42 \pm 0,02$ ml/100 g de peso corporal) [$F(3,180) = 11,462; p < 0.05$] (figura 15 A). Na figura 13 B, que demonstra a ingestão cumulativa, podemos observar que a maior ingestão cumulativa de água em animais com lesão do commNTS não é alcançada pelos animais sham (figura 15 B).

Em relação a excreção urinária, não houve diferenças significativas na diurese após a sobrecarga de NaCl 0,15 M (sham: $0,3 \pm 0,1$ vs. commNTS $0,3 \pm 0,1$ ml/100 g de peso corporal/120 min) (figura 16) e após a sobrecarga de NaCl 0,6 M (sham: $0,38 \pm 0,1$ vs. commNTS $0,3 \pm 0,1$ ml/100 g de peso corporal/120 min) [$F(3,33)=0,789, p>0.05$]. A natriurese (figura 16) também não foi alterada em animais sham e com lesão do commNTS após a sobrecarga de NaCl 0,15 M ou NaCl 0,6 M (NaCl 0,15 M – sham: 74 ± 34 vs. commNTS: 51 ± 15 ; NaCl 0,6 M – sham: 28 ± 5 vs commNTS 77 ± 15 μ Eq/100 g de peso corporal/120 min) [$F(3,31)=1,068, p>0.05$].

Tabela 5 - Valores de peso corporal antes da lesão (pré-lesão) e após lesão fictícia ou lesão do commNTS

Grupo	N	Pre-lesão	4 dias	14 dias
Sham	16	296 ± 4	304 ± 2	351 ± 3*
commNTS	12	305 ± 5	286 ± 3**	335 ± 4**

Os resultados estão expressos como média ± EPM. N = número de animais.

* $p < 0,05$ comparado com pré-lesão; t $p < 0.05$ comparado com sham (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls).

△ Sham + NaCl 0,15 M ig (n=4) ▲ Sham + NaCl 0,6 M ig (n=16)
 □ commNTS + NaCl 0,15 M ig (n=5) ■ commNTS + NaCl 0,6 M ig (n=12)

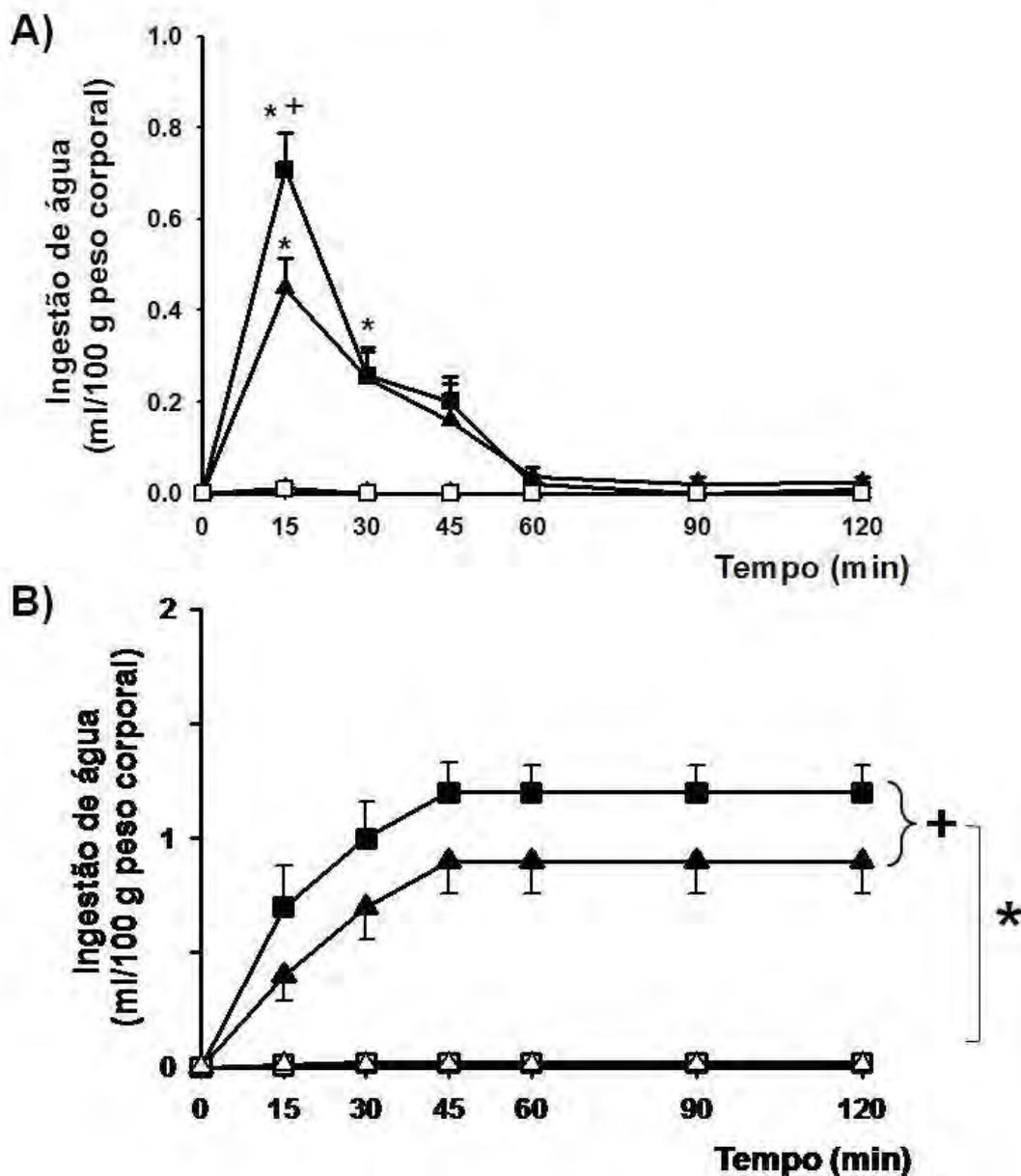


FIGURA 15 - Efeitos da gavagem intragrástrica de NaCl 0,6 M em ratos com sham e com lesão do commNTS sobre a ingestão não cumulativa (A) e cumulativa (B) de água. Resultados estão expressos como média \pm EPM. N = número de animais. * diferente de NaCl 0,15 M; + diferente de sham (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman Keuls; $P < 0,05$).

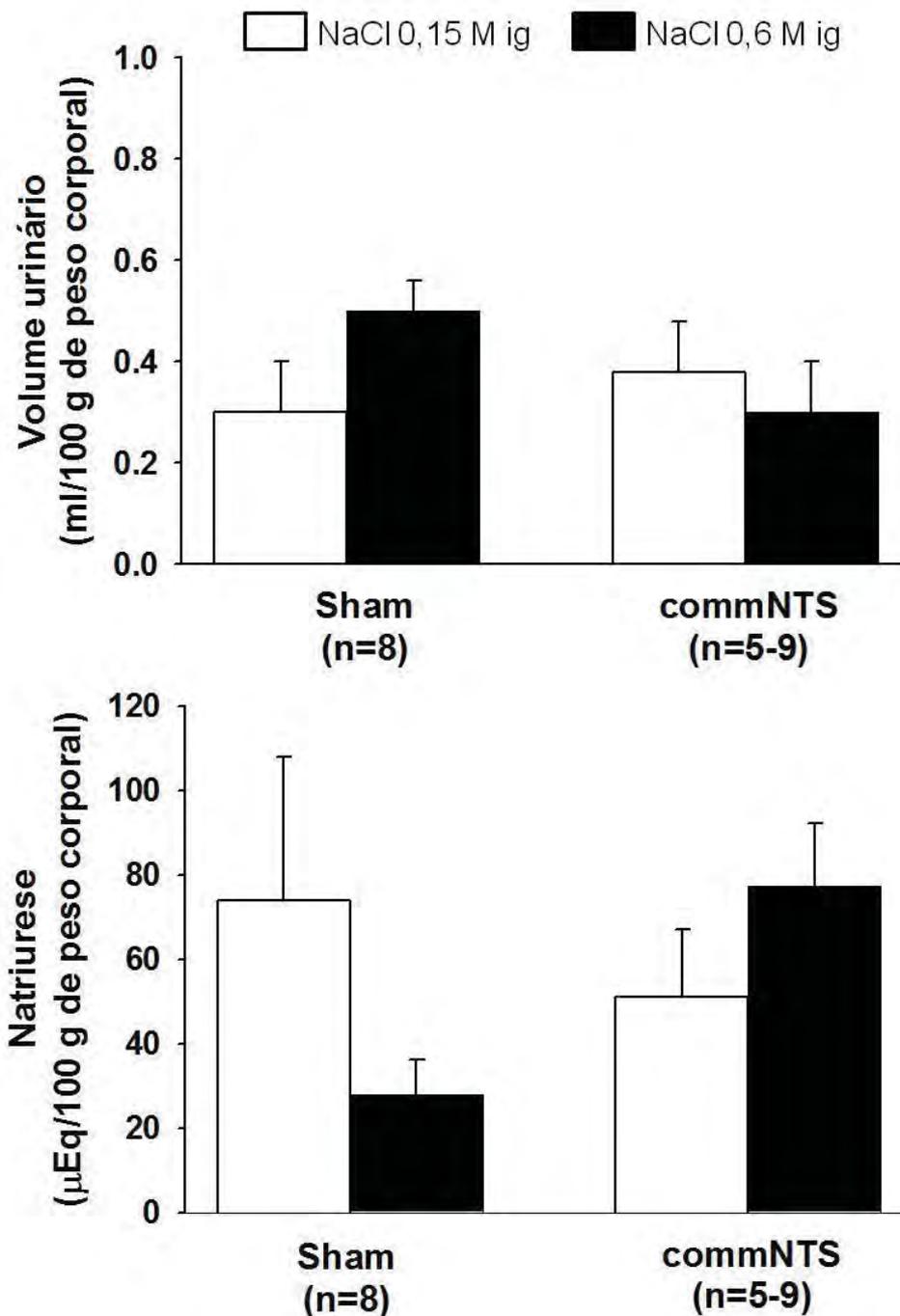


FIGURA 16 - Volume urinário e excreção urinária de sódio 120 min após administração intragástrica de NaCl 0,15 M ou NaCl 0,6 M (2 ml) em ratos sham ou com lesão do commNTS. Resultados estão expressos como média \pm EPM. N = número de animais. (ANOVA de uma via associada ao Student-Newman Keuls; $P > 0,05$).

Resumo – Parte 2

Nesta segunda parte observamos que a sobrecarga ig de NaCl 0,6 M promove:

- 1) Aumento da PAM dependente de vasopressina, maior expressão de c-Fos em neurônios do SON em ratos com lesão do commNTS;
- 2) Não promoveu alteração nos valores séricos de Na⁺, K⁺ e de proteínas totais;
- 3) Potencialização da ingestão de água sem alterar a diurese e e
- 4) Natriurese.

DISCUSSÃO

Estudos prévios já haviam demonstrado que animais com lesão do commNTS frente a sobrecarga de NaCl 2 M, tem maior ingestão de água, natriurese e resposta pressora, quando comparados a animais sham. No presente estudo pudemos observar que em animais com lesão eletrolítica do commNTS a resposta pressora frente a sobrecarga de NaCl 2 M é mediada parcialmente pela vasopressina, uma vez que a prévia administração de antagonista de vasopressina atenua a resposta pressora. Ademais, o aumento no número de neurônios positivos ao c-Fos após NaCl 2 M no mPVN e no SON foi maior nos ratos com lesão do commNTS, sendo que esses neurônios apresentavam dupla marcação para vasopressina ou ocitocina. Além disso após a sobrecarga, ambos os grupos (sham e commNTS) apresentaram aumento de vasopressina e ocitocina circulante, mas em animais com lesão houve um maior aumento na secreção de vasopressina. Em animais intactos pudemos observar que a sobrecarga de NaCl 2 M promove um aumento na quantidade do RNAm no PVN para MIF, AT1, AVP e OT. Tanto animais com lesão do commNTS quanto animais sham tiveram aumentos semelhantes na concentração de sódio sérico e animais com lesão tiveram um maior retardo no esvaziamento gástrico após a sobrecarga. A lesão do commNTS observada em nossos estudos foi semelhante àquela apresentada em estudos prévios^{8,24,70}, onde já foi descrito que animais com lesão do commNTS não tem alterações no barorreflexo, mas tem prejuízo na resposta pressora frente a estimulação do quimiorreflexo por KCN⁸⁸.

Quando a estimulação de osmorreceptores se dá somente na região da veia porta, com a sobrecarga de NaCl 0,6 M, conforme demonstrado por Kraly et al.⁶¹, observamos que animais com lesão do commNTS tiveram um aumento na pressão arterial média, nos primeiros 10 minutos que se seguem a sobrecarga, e que assim como acontece quando animais são submetidos a sobrecarga de NaCl 2 M, essa resposta pressora foi mediada pela liberação de vasopressina, pois quando é feita a prévia administração do antagonista de receptores V1, a resposta pressora é completamente abolida. Animais com lesão do commNTS também apresentam maior marcação para c-Fos no SON, comparado com ratos sham. Ademais, animais com lesão tiveram uma pequena, mas significativa, potencialização na ingestão de

água sem alterações significativas na natriurese quando comparados com ratos sham. Não foram observadas diferenças entre os valores séricos de sódio, potássio e proteínas, 20 minutos após a sobrecarga.

Dados prévios já haviam demonstrado que a sobrecarga ig de NaCl 2 M não produzia aumentos significantes na pressão arterial em ratos sham, apenas animais com lesão do commNTS tiveram um aumento significativo da pressão arterial, que permanece elevada durante os 60 minutos de registro. Neste estudo observamos também que animais com lesão do commNTS apresentaram um aumento na pressão arterial também frente a sobrecarga de NaCl 0,6 M, estímulo esse que ativa somente osmorreceptores periféricos, uma vez que não é capaz de aumentar a osmolaridade plasmática⁶¹. O aumento da pressão arterial após solução hipertônica de NaCl (2 ou 0,6 M) nos ratos com lesão do commNTS não pode ser atribuída a qualquer disfunção do barorreflexo, uma vez que, como demonstrado no presente estudo e em estudos prévios^{24,42,89} este está funcionando de maneira adequada. No presente trabalho, demonstramos que o aumento de pressão arterial que é observado após a sobrecarga de NaCl 0,6 ou 2 M é mediado pela secreção de vasopressina, uma vez que a prévia administração do antagonista V1 é capaz de abolir a resposta pressora. Já é bem descrito na literatura que um aumento na osmolaridade plasmática, como o que ocorre após a sobrecarga de NaCl 2 M, é capaz de promover maior liberação de vasopressina^{6,27,111}, podendo assim contribuir com eventuais mudanças na pressão arterial. Além disso há trabalhos descrevendo que a hiperosmolaridade associada a uma hipovolemia é capaz de promover liberação de vasopressina⁹⁶, no entanto, em nossos experimentos com a sobrecarga de NaCl 2 M, assim como já descrito anteriormente⁸³ não foi observada alterações na concentração de proteína plasmática, que é um indicador de que não houve alteração na volemia. Desta forma, em nosso estudo a maior secreção de vasopressina é decorrente da hiperosmolaridade plasmática. A sobrecarga de NaCl 0,6 M é capaz de promover apenas um aumento da osmolaridade na região hepato-portal e hepato-intestinal. No entanto, já foi descrito na literatura que estímulos hiperosmolares quando infundidos diretamente dentro do estômago, mimetizando uma ingestão moderada de sódio, ainda que não modifiquem a osmolaridade total (osmolaridade plasmática), são capazes de aumentar a secreção de vasopressina^{13,17,102}. Os sinais gerados para secreção de vasopressina, seja por ativação dos osmorreceptores centrais ou periféricos, são inibidos pelo commNTS,

uma vez que em animais com lesão eletrolítica do commNTS a resposta pressora observada foi dependente de vasopressina.

Já está descrito na literatura a correlação entre a expressão da proteína c-Fos frente a estímulos osmóticos com a ativação de núcleos do SNC^{13,28,52}. Em nossos estudos, corroborando com os dados de pressão arterial associado ao antagonista de vasopressina, observamos um incremento no número de células marcadas para c-Fos no mPVN e no SON em ratos com lesão do commNTS após a sobrecarga de NaCl 2 M e um aumento apenas no SON em animais que receberam a sobrecarga de NaCl 0,6 M. No caso da sobrecarga de NaCl 2 M, grande parte desses neurônios foram também marcados para a vasopressina e ocitocina, tanto em animais sham quanto em animais com lesão do commNTS. Embora, ratos sham também tenham apresentado uma marcação para c-Fos no mPVN e no SON em células vasopressinérgicas após NaCl 2 M ig, esses animais não apresentaram um aumento significativo da pressão arterial. O aumento da expressão de c-Fos após uma sobrecarga de NaCl já havia sido demonstrada na literatura^{13,76}, no entanto o fato de animais com lesão do commNTS terem uma potencialização dessa marcação é um dado novo apresentado no presente estudo. Morita *et al.*⁷⁶ demonstraram também que a estimulação elétrica de aferentes hepáticos, assim como a infusão intraportal de solução de sódio hipertônica promove aumento da expressão de c-Fos em áreas do prosencéfalo e do tronco encefálico, e que a desnervação hepática é capaz de prevenir essas alterações. Os dados de Morita *et al.*⁷⁶ demonstram que o aumento da osmolaridade somente na região hepato-portal é um sinal capaz de promover ativação, ainda que não tão intensa como quando há aumentos na osmolaridade plasmática, de áreas do SNC. Outros estudos mostraram que a infusão de NaCl intragastricamente é capaz de promover a expressão de c-Fos em áreas como área postrema (AP), NTS, NPBL, SON e PVN, áreas sabidamente correlacionadas com equilíbrio hidroeletrólítico e manutenção de pressão arterial¹³.

Além dos dados apresentados com a maior expressão da proteína c-Fos no PVNm e/ou SON em ratos com lesão do commNTS após estimulação osmótica, a dosagem dos valores de vasopressina após a sobrecarga de NaCl 2 M, nos mostra que nesses animais há um maior aumento nos valores plasmáticos de vasopressina. Desta maneira, corroborando os dados funcionais e de expressão da proteína c-Fos em regiões encefálicas que sintetizam vasopressina, demonstrando

que o aumento de pressão observado em animais com lesão do commNTS após a sobrecarga se deva realmente a maior liberação de vasopressina. Embora em ratos sham os valores plasmáticos de vasopressina após NaCl 2 M ig seja maior que em ratos sham submetidos a gavagem com NaCl 0,15 M, é possível que a quantidade liberada não seja suficiente para promover aumentos de pressão. O mesmo pode se inferir para a sobrecarga de NaCl 0,6 M, já que o aumento de pressão observado em animais com lesão do commNTS é totalmente bloqueado pela prévia administração de antagonista de receptores de vasopressina. Estes dados nos leva a sugerir que o commNTS é uma área inibitória para a secreção de vasopressina induzido por estímulos osmóticos que ativam os osmorreceptores periféricos e/ou centrais.

O papel do commNTS como região inibitória para a secreção de vasopressina já foi demonstrado previamente⁸⁷. Esses autores demonstraram que ratos com lesão do commNTS apresentaram um maior aumento de pressão arterial após a oclusão bilateral das carótidas, que sabe-se ser dependente da secreção de vasopressina²⁰. Nossos dados sugerem que a lesão do commNTS bloqueia apenas a via inibitória para a secreção de vasopressina, mas não a via inibitória bulbar para a atividade simpática (dependente de iNTS), uma vez que os testes de baro (fenil e nitro) mostraram que a via bulbar dos barorreceptores está intacta. Então, embora os sinais dos barorreceptores cheguem ao NTS e possam acionar normalmente o circuito bulbar envolvido na regulação cardiovascular, esses sinais não conseguem ascender pelo menos em sua totalidade para outras áreas centrais e assim chegar ao hipotálamo para inibir a secreção de vasopressina.

Estudos anatômicos demonstraram que o NTS se projeta ao NPBL^{47,110}, que é uma importante área do SNC envolvida nas vias inibitórias que controlam a ingestão de água e apetite ao sódio^{21,71,78}. Ambos, NTS, incluindo o commNTS e o NPBL, se projetam à áreas prosencefálicas envolvidas no controle da ingestão de água e sódio, como a região AV3V e o OSF^{47,74,84-85,106}. Nossos dados anteriormente obtidos⁷ mostram que o commNTS é uma área importante para o controle inibitório da ingestão de água durante aumentos da osmolaridade plasmática. No presente estudo demonstramos que o commNTS também participa inibindo a ingestão de água induzida por aumentos da osmolaridade que são capazes de afetar apenas a região hepatoportal e hepatointestinal. No entanto não está claro se o efeito inibitório na ingestão de água exercida commNTS se dá

diretamente pelas suas projeções ao prosencéfalo e/ou indiretamente também por meio de suas conexões com o NPBL.

A ingestão de água induzida por NaCl 0,6 M ig, que ativa apenas os osmorreceptores periféricos, é reduzida pela vagotomia subdifragmática bilateral^{61,99}. Os osmorreceptores periféricos fazem sua primeira sinapse no NTS (comissural e intermediário) e na área postrema, e seus aferentes trafegam para o SNC através do nervo vago^{1,58}. Desta forma, seria de se esperar que a lesão do commNTS inibisse a ingestão de água frente a esse estímulo. É conhecido que lesões do NTS intermediário (iNTS) não alteram a ingestão de água induzida pela infusão intravenosa de NaCl 0,5 M¹⁰¹. Por outro lado, os dados do presente estudo mostram que a lesão do commNTS aumentam a ingestão de água induzida pela gavagem com NaCl 2 M ou de NaCl 0,6 M. Com isso, parece que o commNTS faz parte de uma via inibitória e não excitatória que controla a ingestão de água. É possível que o commNTS receba informação relacionada ao aumento da osmolaridade na região hepato-portal e então, envia sinais inibitórios para contraregular a ingestão de água. De fato, o commNTS é estimulado quando as aferências da região hepato-portal são estimuladas por soluções hipertônicas que estimulam os osmorreceptores periféricos^{1,76}.

No caso da sobrecarga de NaCl 2 M ig como há um aumento da osmolaridade plasmática⁸³, podemos supor que esse aumento ative os osmorreceptores centrais, que estão localizados em áreas como o SFO e a região AV3V^{9,68}, estimulando a secreção de vasopressina e induzindo ingestão de água. Essas áreas recebem projeções do commNTS e NTS intermediário, bem como se projetam ao PVN, o qual também tem conexões com o NTS^{19,84,90,107,110}. Sendo assim, após um estímulo osmótico na região da veia porta, bem como após aumentos da osmolaridade plasmática, que ativa osmorreceptores centrais e periféricos, o commNTS é ativado e com isso, promove a inibição de áreas centrais relacionadas com a secreção de vasopressina e ingestão de água. No presente estudo verificamos que a concentração de sódio sérico 20 min após a gavagem de NaCl 0,6 M não foi diferente entre os grupos, indicando que não há ativação de osmorreceptores centrais. Este resultado reforça a idéia que a ingestão de água induzida por sobrecarga de NaCl 0,6 M em ratos com lesão do commNTS são decorrentes da remoção de uma via inibitória, e não secundária a alterações diferenciais na osmolaridade plasmática e no volume circulante entre ratos lesados

e ratos sham. É importante notar que em animais que receberam a sobrecarga de NaCl 0,6 M a água foi oferecida imediatamente após a sobrecarga, e o pico da ingestão de água ocorre 15 min após o início do registro. Aproximadamente neste mesmo período (10-15 min), nos ratos com lesão do commNTS, há o maior aumento na pressão arterial. Assim sendo, podemos descartar que nos ratos sham que receberam gavagem com NaCl 0,6 M a menor ingestão de água seja decorrente de um possível maior aumento da pressão arterial, uma vez que aumentos da PAM podem inibir a ingestão de água¹⁰⁸. Na verdade, um possível aumento de pressão arterial, poderia até exercer uma inibição sobre a ingestão de água³³.

Animais com ou sem lesão do commNTS apresentaram natriurese após gavagem com NaCl 2 M⁸³ entretanto a natriurese observada nos ratos com lesão do commNTS é maior⁷. Sabe-se que a ocitocina tem importante papel em causar natriurese frente a aumentos da osmolaridade plasmática^{3,55}. É provavelmente a maior liberação desse hormônio em animais sham e commNTS submetidos a gavagem com NaCl 2 M que promoveu natriurese quando se compara com a sobrecarga de salina isotônica, uma vez que encontramos um aumento similar da ocitocina plasmática em ambos os grupos após a sobrecarga de NaCl 2 M. Também observamos uma intensa dupla marcação para os neurônios positivos ao c-Fos e a ocitocina no mPVN e no SON. Já após a sobrecarga de NaCl 0,6 M não foram observadas diferenças na natriurese entre os grupos sham e com lesão do commNTS. Assim sendo, podemos sugerir que após a sobrecarga de NaCl 2 M a natriurese observada em ambos os grupos se deva em parte a liberação de ocitocina, e em animais com lesão do commNTS, a maior natriurese se deva ao aumento de pressão (natriurese de pressão)⁴⁶, uma vez que após a sobrecarga de NaCl 2 M observou-se um aumento de 20-25 mmHg durante o período experimental, e nos ratos lesados com sobrecarga de NaCl 0,6 M o aumento de pressão arterial foi menos intenso (\cong 11 mmHg) e mais rápido (\cong 10 min). É possível que a secreção de ocitocina após NaCl 0,6 M (se houver) não seja grande o suficiente para promover natriurese; de fato nos ratos em que foi feita a gavagem com NaCl 0,6 M (sham ou lesados) não houve ativação do PVNm e a ativação do SON foi menos intensa do que após a gavagem com NaCl 2 M.

Embora o aumento da osmolaridade plasmática com NaCl 2 M tenha ocasionado um aumento da secreção de vasopressina em ratos sham e com lesão do commNTS, observamos um aumento na diurese após ao NaCl 2 M ig⁷. Esse aumento se deve ao fato de que numa situação de aumento de osmolaridade plasmática é essencial a excreção de sódio, ainda que se tenha que perder água³. Como a diurese observada é semelhante em animais sham e com lesão do commNTS após a gavagem de NaCl 0,6 (presente estudo) ou 2 M⁷, então a maior ingestão de água observada nos ratos com lesão do commNTS não pode ser secundária a uma maior diurese nestes animais.

Corroborando com os dados de dosagem de vasopressina e ocitocina, em animais intactos observamos um aumento do RNAm 2 horas após a sobrecarga de NaCl 2 M para os genes da vasopressina e ocitocina no PVN, o que demonstra que além de aumento na secreção desses hormônios, há alterações gênicas o que nos sugere uma alteração a longo prazo para correção da osmolaridade e não somente uma ativação rápida e fugaz para liberação desses hormônios. Diversos estudos tem correlacionado alterações crônicas da osmolaridade com alterações gênicas^{38,48,115}, no entanto não há estudos que demonstram alterações que aconteçam 2 horas após o estímulo osmótico agudo (NaCl 2 M), que eleva a osmolaridade em 4%⁸³. A participação de vias angiotensinégicas nas respostas de hiperosmolaridade plasmática ou mesmo apenas da região hepato-portal tem sido descritas^{16,60}. É possível que o aumento nos níveis de RNAm do receptor AT1 no PVN após gavagem com NaCl 2 M medeie parte das respostas observadas. Seria interessante estudar em ratos lesados se o aumento no RNAm dos receptores AT1 é ainda maior. Poderíamos também pensar em estudar os efeitos do bloqueio dos receptores AT1 da angiotensina no prosencéfalo sobre as respostas observadas em ratos sham e com lesão do commNTS. Foi também observado um aumento na expressão do RNAm para a interleucina MIF. Esta interleucina tem efeitos na regulação cardiovascular e também no equilíbrio hidroeletrólítico em mecanismos dependentes da ativação angiotensinérgica central, agindo como um contra-regulador das ações da ANG II⁶⁵. Dados recentes²³ mostraram que a hiperosmolaridade é também capaz de aumentar os valores de RNAm para MIF no PVN. Este efeito é explicado pelos autores devido ao efeito inibitório do MIF sobre as ações da ANG II, já que na situação de hiperosmolaridade o aumento da atividade simpática é causado em parte, por ativação de vias angiotensinérgicas centrais¹⁰⁹. Desta maneira é possível que o

aumento do RNAm para o MIF seja decorrente de um aumento local no PVN dos valores de ANG II.

Os diagramas abaixo resumem os mecanismos que podem estar envolvidos com as respostas observadas em ratos com lesão do commNTS submetidos à gavagem com NaCl 2 M ou NaCl 0,6 M. Na figura 17 temos uma situação em que os neurônios do commNTS estão intactos. Nessas situações os estímulos osmóticos ativam osmorreceptores, centrais e/ou periféricos. A ativação dos osmorreceptores centrais ativaria as vias de sede, bem como a ativação do PVN e SON. Devido as suas projeções, a ativação do PVN pela hiperosmolaridade poderia também ativar o commNTS⁹⁰, que por sua vez ativaria o circuito inibitório para o controle da sede. Podemos pensar também que a ativação dos osmorreceptores periféricos pela hiperosmolaridade, por outro lado, poderia ter um efeito inibitório e não excitatório sobre a sede, como descrito em estudos prévios⁶⁰. A ativação dos neurônios do commNTS pela hiperosmolaridade pelos mecanismos descritos acima, teriam efeito inibitório sobre a sede por meio de suas projeções diretas ou indiretas (via NPBL, por exemplo) ao prosencéfalo. A ativação do PVN e SON pela ativação de osmorreceptores centrais e/ou periféricos promoveria também aumento da secreção de vasopressina^{49,51}, muito embora a participação dos osmorreceptores periféricos na regulação da secreção de vasopressina ainda não está bem determinado^{13,15,102}. Apesar de haver secreção de vasopressina induzida pela hiperosmolaridade, a PAM não se elevaria talvez porque a concentração de vasopressina liberada nesta situação não seja suficiente para induzir aumentos na PAM. O aumento de pressão arterial gerado, seria tamponado pela ação dos barorreceptores, no circuito bulbar, e a ativação dessas aferências poderia, via NTS projetando-se ao PVN inibir a secreção de vasopressina. Desta forma, embora haja respostas de sede e secreção de vasopressina induzidos pelo aumento da osmolaridade plasmática, os mecanismos excitatórios são contrabalanceados por mecanismos inibitórios, desta forma não há aumento de PAM. Neste esquema, a inibição exercida pelo commNTS pode ser por meio da ativação de um interneurônio inibitório nas regiões prosencefálicas, ou pelo fato desta via ser ela própria inibitória. Temos também que considerar que a AP pode também constituir uma aferência importante para sinalizar ao commNTScom sobre alterações na osmolaridade plasmática, uma vez que ocorre ativação desta área por ativação de osmorreceptores periféricos¹⁴. A

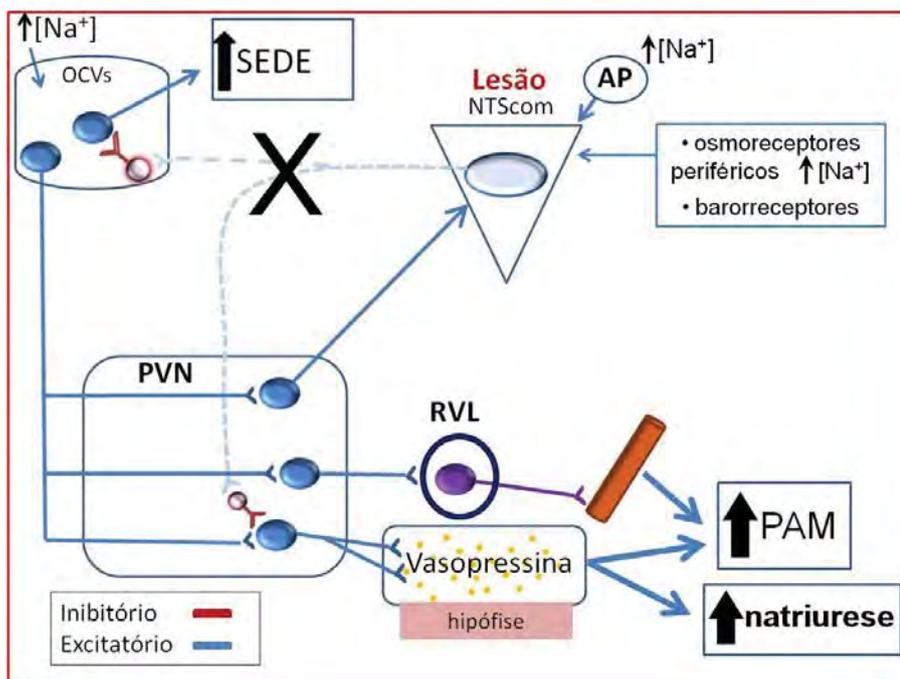


FIGURA 18 - ausência de mecanismos inibitórios.

Em conclusão, nossos resultados mostram que a lesão do commNTS facilita a ingestão de água e a hipertensão dependente de vasopressina após aumento sobrecarga de NaCl hipertônico, seja a solução hipertônica capaz de alterar a osmolaridade plasmática (ativação de osmorreceptores centrais e periféricos) ou apenas a osmolaridade da região hepato-portal (ativação de osmorreceptores periféricos). As alterações na natriurese em ratos lesados submetidos a gavagem com NaCl 2 M parece ser dependente do aumento na pressão arterial nestes animais. Esses resultados sugerem que o commNTS faz parte de uma circuitaria neural inibitória que controla a pressão arterial, secreção de vasopressina, ingestão de água e ativação de áreas centrais frente à hiperosmolaridade, que ativa os osmorreceptores centrais e/ou periféricos.

REFERÊNCIAS*

- 1 Adachi A. Projection of the hepatic vagal nerve in the medulla oblongata. *J Auton Nerv Syst.* 1984; 10: 287-93.
- 2 Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D, Paton JF. A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J Physiol.* 2006; 576: 569-83.
- 3 Antunes-Rodrigues J, Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev.* 2004; 84: 169-208.
- 4 Badoer E. Cardiovascular role of paraventricular neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *News Physiol Sci.* 1996; 11: 43-7.
- 5 Ben-Barak Y, Russell JT, Whitnall MH, Ozato K, Gainer H. Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system. I. Production and characterization of monoclonal antibodies. *J Neurosci.* 1985; 5: 81-97.
- 6 Bisset GW, Chowdrey HS. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol.* 1988; 73: 811-72.
- 7 Blanch GT, Colombari E, De Luca Jr LA, Menani JV, Colombari DSA. Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract enhance water intake and natriuresis induced by hypertonic saline. *Neurosc Abs.* 2004.
- 8 Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Colombari E, Menani JV, Colombari DS. Lesions of the commissural subnucleus of the nucleus of the solitary tract increase isoproterenol-induced water intake. *Braz J Med Biol Res.* 2007; 40: 1121-7.
- 9 Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9: 519-31.
- 10 Bourque CW, Oliet SH. Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59: 601-19.
- 11 Bourque CW, Oliet SH, Richard D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol.* 1994; 15: 231-74.
- 12 Burnier M, Biollaz J, Brunner DB, Brunner HR. Blood pressure maintenance in awake dehydrated rats: renin, vasopressin, and sympathetic activity. *Am J Physiol.* 1983; 245: H203-9.
- 13 Carlson SH, Beitz A, Osborn JW. Intragastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *Am J Physiol.* 1997; 272: R750-8.

* De acordo como estilo Vancouver. Disponível no site: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

-
- 14 Carlson SH, Collister JP, Osborn JW. The area postrema modulates hypothalamic Fos responses to intragastric hypertonic saline in conscious rats. *Am J Physiol.* 1998; 275: R1921-7.
 - 15 Carlson SH, Osborn JW. Splanchnic and vagal denervation attenuate central Fos but not AVP responses to intragastric salt in rats. *Am J Physiol.* 1998; 274: R1243-52.
 - 16 Chen QH, Toney GM. AT(1)-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2001; 281: R1844-53.
 - 17 Choi-Kwon S, McCarty R, Baertschi AJ. Splanchnic control of vasopressin secretion in conscious rats. *Am J Physiol.* 1990; 259: E19-26.
 - 18 Ciriello J, Hochstenbach SL, Roder S. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferents fibers in the rat. In: Barraco IRA, editor. *Nucleus of the Solitary Tract.* Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994. p. 35-50.
 - 19 Ciriello J, Rosas-Arellano MP, Solano-Flores LP. Direct projections to subfornical organ from catecholaminergic neurons in the caudal nucleus of the solitary tract. *Brain Res.* 1996; 726: 227-32.
 - 20 Clark BJ, Silva MR, Jr. An afferent pathway for the selective release of vasopressin in response to carotid occlusion and haemorrhage in the cat. *J Physiol.* 1967; 191: 529-42.
 - 21 Colombari DS, Menani JV, Johnson AK. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. *Am J Physiol.* 1996; 271: R1470-6.
 - 22 Colombari DS, Pedrino GR, Freiria-Oliveira AH, Korim WS, Maurino IC, Cravo SL. Lesions of medullary catecholaminergic neurons increase salt intake in rats. *Brain Res Bull.* 2008; 76: 572-8.
 - 23 Colombari E, Colombari DS, Li H, Shi P, Dong Y, Jiang N, et al. Macrophage migration inhibitory factor in the paraventricular nucleus plays a major role in the sympathoexcitatory response to salt. *Hypertension.* 2010; 56: 956-63.
 - 24 Colombari E, Menani JV, Talman WT. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. *Am J Physiol.* 1996; 270: R1220-5.
 - 25 Colombari E, Sato MA, Cravo SL, Bergamaschi CT, Campos RR, Jr., Lopes OU. Role of the medulla oblongata in hypertension. *Hypertension.* 2001; 38: 549-54.
 - 26 Cottle MA. Degeneration studies of the primary afferents of IXth and Xth cranial nerves in the cat. *J Comp Neurol.* 1964; 122: 329-45.
 - 27 Crofton JT, Share L. Osmotic control of vasopressin in male and female rats. *Am J Physiol.* 1989; 257: R738-43.

-
- 28 Dampney RA, Horiuchi J. Functional organisation of central cardiovascular pathways: studies using c-fos gene expression. *Prog Neurobiol.* 2003; 71: 359-84.
 - 29 Day TA, Sibbald JR. Solitary nucleus excitation of supraoptic vasopressin cells via adrenergic afferents. *Am J Physiol.* 1988; 254: R711-6.
 - 30 Day TA, Sibbald JR. A1 cell group mediates solitary nucleus excitation of supraoptic vasopressin cells. *Am J Physiol.* 1989; 257: R1020-6.
 - 31 De Luca L, Jr., Barbosa SP, Menani JV. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. *Neuroscience.* 2003; 121: 1055-61.
 - 32 Donald DE, Shepherd JT. Reflexes from the heart and lungs: physiological curiosities or important regulatory mechanisms. *Circ Res.* 1978; 12: 449-69.
 - 33 Evered MD. Investigating the role of angiotensin II in thirst: interactions between arterial pressure and the control of drinking. *Can J Physiol Pharmacol.* 1991; 70: 791-7.
 - 34 Fitzsimons JT. Thirst. *Physiol Rev.* 1972; 52: 468-561.
 - 35 Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev.* 1998; 78: 585-686.
 - 36 Fulwiler CE, Saper BC. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res Rev.* 1984; 7: 229-59.
 - 37 Garcia-Estar J, Carbonell LF, Garcia-Salom M, Salazar FJ, Quesada T. Hemodynamic effects of hypertonic saline in the conscious rat. *Life Sci.* 1989; 44: 1343-50.
 - 38 Ghorbel MT, Sharman G, Hindmarch C, Becker KG, Barrett T, Murphy D. Microarray screening of suppression subtractive hybridization-PCR cDNA libraries identifies novel RNAs regulated by dehydration in the rat supraoptic nucleus. *Physiol Genomics.* 2006; 24: 163-72.
 - 39 Goncalves PC, Alves MB, Silveira JE, Saad WA, Camargo LA, Renzi A, et al. Effect of AV3V lesion on the cardiovascular, fluid, and electrolytic changes induced by activation of the lateral preoptic area. *Physiol Behav.* 1992; 52: 173-7.
 - 40 Gottlieb HB, Ji LL, Jones H, Penny ML, Fleming T, Cunningham JT. Differential effects of water and saline intake on water deprivation-induced c-Fos staining in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006; 290: R1251-61.
 - 41 Gouraud SS, Heesom K, Yao ST, Qiu J, Paton JF, Murphy D. Dehydration-induced proteome changes in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology.* 2007; 148: 3041-52.

-
- 42 Grossman SP. Cellular dehydration thirst. In: Grossman SP, editor. *Thirst and Sodium Appetite*. San Diego: Academic Press; 1990. p. 25-42.
 - 43 Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006; 7: 335-46.
 - 44 Haberich FJ. Osmoreception in the portal circulation. *Fed Proc*. 1968; 27: 1137-41.
 - 45 Hatzinikolaou P, Gavras H, Brunner HR, Gavras I. Role of vasopressin, catecholamines and plasma volume in hypertonic saline-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 1981; 240: H827-31.
 - 46 Heller J, Novakova A. Proximal tubular reabsorption during renal vasodilation and increased arterial blood pressure in saline loaded rats. *Pflugers Arch*. 1969; 309: 250-65.
 - 47 Herbert H, Moga MM, Saper CB. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J Comp Neurol*. 1990; 293: 540-80.
 - 48 Hindmarch C, Yao S, Beighton G, Paton JFR, Murphy D. A comprehensive description of the transcriptome of the hypothalamoneurohypophyseal system in euhydrated and dehydrated rats. *PNAS*. 2006; 103: 1609-14.
 - 49 Ho JM, Zierath DK, Savos AV, Femiano DJ, Bassett JE, McKinley MJ, et al. 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*. 2007; 292: R1690-8.
 - 50 Hochstenbach SL, Ciriello J. Plasma hypernatremia induces c-fos activity in medullary catecholaminergic neurons. *Brain Res*. 1995; 674: 46-54.
 - 51 Hochstenbach SL, Ciriello J. Effects of lesions of forebrain circumventricular organs on c-fos expression in the central nervous system to plasma hypernatremia. *Brain Res*. 1996; 713: 17-28.
 - 52 Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front Neuroendocrinol*. 1993; 14: 173-213.
 - 53 Hosomi H, Morita H. Hepatorenal and hepatointestinal reflexes in sodium homeostasis. *News Physiol Sci*. 1996; 11: 103-7.
 - 54 Hosutt JA, Rowland N, Stricker EM. Hypotension and thirst in rats after isoproterenol treatment. *Physiol Behav*. 1978; 21: 593-8.
 - 55 Huang W, Lee SL, Sjoquist M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. *Am J Physiol*. 1995; 268: R634-40.
 - 56 Johnson AK, Edwards GL. Neuroendocrinology of thirst: afferent signalling and mechanisms of central integration. In: Ganten D, Pfaff D, editors. *Current*

-
- topics in neuroendocrinology. Berlin-Heidelberg: Spriger-Verlag; 1990. p. 149-90.
- 57 Johnson AK, Thunhorst RL. Sensory mechanism in the behavioral control of body fluid balance: thirst and sodium appetite. *Prog Psychobiol Physiol Psychol.* 1995; 16: 145-76.
 - 58 Kobashi M, Adachi A. Convergence of hepatic osmoreceptive inputs on sodium-responsive units within the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol.* 1985; 54: 212-9.
 - 59 Kobashi M, Ichikawa H, Sugimoto T, Adachi A. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. *Neurosci Lett.* 1993; 158: 47-50.
 - 60 Kraly FS, Gibbs J, Smith GP. Disordered drinking after abdominal vagotomy in rats. *Nature.* 1975; 258: 226-8.
 - 61 Kraly FS, Kim YM, Dunham LM, Tribuzio RA. Drinking after intragastric NaCl without increase in systemic plasma osmolality in rats. *Am J Physiol.* 1995; 269: R1085-92.
 - 62 Kraly FS, Tribuzio RA, Kim YM, Keefe ME, Braun CJ, Newman BH. Angiotensin AT1 and AT2 receptors contribute to drinking elicited by eating in rats. *Physiol Behav.* 1995; 58: 1099-109.
 - 63 Landulpho CDAP, Dias ACR, Colombari E. Cardiovascular mechanisms activated by microinjection of baclofen into NTS of conscious rat. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 284: H987-93.
 - 64 Leenen FHH, McDonald Jr RHJ. Effect of isoproterenol on blood pressure, plasma renin activity, and water intake in rats. *European J Pharmacol.* 1974; 26: 129-35.
 - 65 Li H, Gao Y, Freire CD, Raizada MK, Toney GM, Sumners C. Macrophage migration inhibitory factor in the PVN attenuates the central pressor and dipsogenic actions of angiotensin II. *FASEB J.* 2006; 20: 1748-50.
 - 66 Machado BH. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius of awake rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 940: 179-96.
 - 67 Margatho LO, Giusti-Paiva A, Menani JV, Elias LK, Vivas L, Antunes-Rodrigues J. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus in renal and hormonal responses to isotonic blood volume expansion. *AJP - Reg Int Comp Physiol.* 2007; 292, R1190-7.
 - 68 McKinley MJ. Osmoreceptors for thirst. In: Ramsay DM, Booth DA, editors. *Thirst: physiology and psychological aspects.* London: Springer-Verlag; 1991. p. 77-92.
 - 69 McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci.* 2004; 19: 1-6.

-
- 70 Menani JV, Colombari E, Talman WT, Johnson AK. Commissural nucleus of the solitary tract lesions reduce food intake and body weight gain in rats. *Brain Res.* 1996; 740: 102-8.
 - 71 Menani JV, Johnson AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1995; 269: R1044-9.
 - 72 Menani JV, Saad WA, Camargo LAA, Renzi A, De Luca Jr LA, Colombari E. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. *Neurosci Lett.* 1990; 113: 339-44.
 - 73 Miura M, Reis DJ. The role of the solitary and paramedian reticular nuclei in mediating cardiovascular reflex responses from carotid baro- and chemoreceptors. *J Physiol.* 1972; 223: 525-48.
 - 74 Moga MM, Herbert H, Hurley KM, Yasui Y, Gray TS, Saper CB. Organization of cortical, basal forebrain, and hypothalamic afferents to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol.* 1990; 295: 624-61.
 - 75 Morien A, Garrard L, Rowland NE. Expression of Fos immunoreactivity in rat brain during dehydration: effect of duration and timing of water deprivation. *Brain Res.* 1999; 816: 1-7.
 - 76 Morita H, Yamashita Y, Nishida Y, Tokuda M, Hatase O, Hosomi H. Fos induction in rat brain neurons after stimulation of the hepatoporal Na-sensitive mechanism. *Am J Physiol.* 1997; 272: R913-23.
 - 77 Ogihara CA, Schoorlemmer GH, Colombari E, Sato MA. Changes in sodium appetite evoked by lesions of the commissural nucleus of the tractus solitarius. *Braz J Med Biol Res.* 2009; 42: 561-6.
 - 78 Ohman LE, Johnson AK. Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. *Am J Physiol.* 1986; 251: R504-9.
 - 79 Oliveira LB, De Luca Jr LA, Menani JV. Moxonidine and central [alpha]2 adrenergic receptors in sodium intake. *Brain Res.* 2003; 993: 177-82.
 - 80 Osborn JW, Collister JP, Carlson SH. Angiotensin and osmoreceptor inputs to the area postrema: role in long-term control of fluid homeostasis and arterial pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2000; 27: 443-9.
 - 81 Palkovits M, Zaborsky L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarius: afferent and efferent neuronal connections in relation to baroreceptor reflex arc. In: De Jong W, Provoost AP, Shapiro AP, editors. *Hypertension and Brain Mechanisms.* Amsterdam: Elsevier; 1977. p. 9-34.
 - 82 Pedrino GR, Nakagawa Sera CT, Cravo SL, Colombari DS. Anteroventral third ventricle lesions impair cardiovascular responses to intravenous hypertonic saline infusion. *Auton Neurosci.* 2005; 117: 9-16.

-
- 83 Pereira DT, Vendramini RC, David RB, Nozaki PN, Menani JV, De LL, Jr. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. *Physiol Behav.* 2002; 76: 501-5.
 - 84 Ricardo JA, Koh ET. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res.* 1978; 153: 1-26.
 - 85 Saper CB, Reis DJ, Joh T. Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *Neurosci Lett.* 1983; 42: 285-91.
 - 86 Saper CB, Levisohn D. Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. *Brain Res.* 1983; 288: 21-31.
 - 87 Sato MA, Menani JV, Lopes OU, Colombari E. Enhanced pressor response to carotid occlusion in commNTS-lesioned rats: possible efferent mechanisms. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 278: R1258-66.
 - 88 Sato MA, Menani JV, Lopes OU, Colombari E. Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 2001; 38: 560-4.
 - 89 Sato MA, Schoorlemmer GH, Menani JV, Lopes OU, Colombari E. Recovery of high blood pressure after chronic lesions of the commissural NTS in SHR. *Hypertension.* 2003; 42: 713-8.
 - 90 Sawchenko PE, Swanson LW. Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *J Comp Neurol.* 1982; 205: 260-72.
 - 91 Schreihof AM, Anderson BK, Schiltz JC, Xu L, Sved AF, Stricker EM. Thirst and salt appetite elicited by hypovolemia in rats with chronic lesions of the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol.* 1999; 276: R251-8.
 - 92 Schreihof AM, Stricker EM, Sved AF. Nucleus of the solitary tract lesions enhance drinking, but not vasopressin release, induced by angiotensin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279: R239-47.
 - 93 Scrogin KE, McKeogh DF, Brooks VL. Is osmolality a long-term regulator of renal sympathetic nerve activity in conscious water-deprived rats? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282: R560-8.
 - 94 Shafton AD, Ryan A, Badoer E. Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat. *Brain Res.* 1998; 801: 239-43.
 - 95 Shi P, Martinez MA, Calderon AS, Chen Q, Cunningham JT, Toney GM. Intra-carotid hyperosmotic stimulation increases Fos staining in forebrain organum vasculosum laminae terminalis neurones that project to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Physiol.* 2008; 586: 5231-45.

-
- 96 Smith CA, Curtis KS, Smith JC, Stricker EM. Presystemic influences on thirst, salt appetite, and vasopressin secretion in the hypovolemic rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007; 292: R2089-99.
 - 97 Starbuck EM, Fitts DA. Effects of SFO lesion or captopril on drinking induced by intragastric hypertonic saline. *Brain Res.* 1998; 795: 37-43.
 - 98 Starbuck EM, Fitts DA. Subfornical organ disconnection and Fos-like immunoreactivity in hypothalamic nuclei after intragastric hypertonic saline. *Brain Res.* 2002; 951: 202-8.
 - 99 Starbuck EM, Wilson WL, Fitts DA. Fos-like immunoreactivity and thirst following hyperosmotic loading in rats with subdiaphragmatic vagotomy. *Brain Res.* 2002; 931: 159-67.
 - 100 Stocker SD, Hunwick KJ, Toney GM. Hypothalamic paraventricular nucleus differentially supports lumbar and renal sympathetic outflow in water-deprived rats. *J Physiol.* 2005; 563: 249-63.
 - 101 Stricker EM, Callahan JB, Huang W, Sved AF. Early osmoregulatory stimulation of neurohypophyseal hormone secretion and thirst after gastric NaCl loads. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282: R1710-R1717.
 - 102 Stricker EM, Hoffmann ML. Presystemic signals in the control of thirst, salt appetite, and vasopressin secretion. *Physiol Behav.* 2007; 91: 404-12.
 - 103 Stricker EM, Sved AF. Thirst. *Nutrition.* 2000; 16: 821-6.
 - 104 Swanson LW, Sawchenko PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology.* 1980; 31: 410-7.
 - 105 Swanson LW, Sawchenko PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu Rev Neurosci.* 1983; 6: 269-324.
 - 106 Tanaka J, Hayashi Y, Nomura S, Miyakubo H, Okumura T, Sakamaki K. Angiotensinergic and noradrenergic mechanisms in the hypothalamic paraventricular nucleus participate in the drinking response induced by activation of the subfornical organ in rats. *Behav Brain Res.* 2001; 118: 117-22.
 - 107 Ter Horst GJ, Streefland DC. Ascending projections of the solitary tract nucleus. In: Barraco IRA, editor. *Nucleus of the solitary tract.* Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994. p. 93-104.
 - 108 Thunhorst RL, Johnson AK. Effects of arterial pressure on drinking and urinary responses to intracerebroventricular angiotensin II. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1993; 264: R211-7.
 - 109 Toney GM, Chen QH, Cato MJ, Stocker SD. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand.* 2003; 177: 43-55.

-
- 110 van der Kooy D, Koda LY. Organization of the projections of a circumventricular organ: the area postrema in the rat. *J Comp Neurol.* 1983; 219: 328-38.
 - 111 Wade CE, Bie P, Keil LC, Ramsay DJ. Effect of hypertonic intracarotid infusions on plasma vasopressin concentration. *Am J Physiol.* 1982; 243: E522-6.
 - 112 Weiss ML, Claassen DE, Hirai T, Kenney MJ. Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion. *J Auton Nerv Syst.* 1996; 57: 109-15.
 - 113 Whitnall MH, Key S, Ben-Barak Y, Ozato K, Gainer H. Neurophysin in the hypothalamo-neurohypophysial system. II. Immunocytochemical studies of the ontogeny of oxytocinergic and vasopressinergic neurons. *J Neurosci.* 1985; 5: 98-109.
 - 114 Woods RL, Johnston CI. Contribution of vasopressin to the maintenance of blood pressure during dehydration. *Am J Physiol.* 1983; 245: F615-21.
 - 115 Zingg HH, Lefebvre D, Almazan G. Regulation of vasopressin gene expression in rat hypothalamic neurons. Response to osmotic stimulation. *J Biol Chem.* 1986; 261: 12956-9.

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

Araraquara , 12 de agosto de 2010

GRAZIELA TORRES BLANCH