

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE
MESQUITA FILHO – UNESP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E PATOLOGIA

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

PARTICIPAÇÃO DO GRUPAMENTO
CATECOLAMINÉRGICO A2 DO NÚCLEO DO TRATO
SOLITÁRIO COMISSURAL NOS AJUSTES
CARDIOVASCULARES E DO EQUILÍBRIO
HIDROELETROLÍTICO INDUZIDOS POR ALTERAÇÕES DA
OSMOLARIDADE OU VOLUME PLASMÁTICO

Andre Henrique Freiria-Oliveira

ARARAQUARA

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE
MESQUITA FILHO – UNESP

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA E PATOLOGIA

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

PARTICIPAÇÃO DO GRUPAMENTO CATECOLAMINÉRGICO A2 DO
NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO COMISSURAL NOS AJUSTES
CARDIOVASCULARES E DO EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO
INDUZIDOS POR ALTERAÇÕES DA OSMOLARIDADE OU VOLUME
PLASMÁTICO

Andre Henrique Freiria-Oliveira

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – área de 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. Debora S. A. Colombari

ARARAQUARA

2010

ANDRE HENRIQUE FREIRIA-OLIVEIRA

**PARTICIPAÇÃO DO GRUPAMENTO CATECOLAMINÉRGICO A2 DO
NÚCLEO DO TRATO SOLITÁRIO COMISSURAL NOS AJUSTES
CARDIOVASCULARES E DO EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO
INDUZIDOS POR ALTERAÇÕES DA OSMOLARIDADE OU VOLUME
PLASMÁTICO**

COMISSÃO JULGADORA

TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR

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

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

3º examinador: Prof. Dr. Jose Antunes-Rodrigues (USP – Ribeirão
Preto)

4º examinador: Prof. Dr. Marco Antonio Peliky Fontes (UFMG)

5º examinador: Prof. Dra. Juliana Irani Fratucci De Gobbi (UNESP –
Botucatu)

Araraquara, 13 de agosto de 2010.

DADOS CURRICULARES

ANDRE HENRIQUE FREIRIA-OLIVEIRA

NASCIMENTO	05/12/1979
FILIAÇÃO	Oswaldo de Oliveira Filho Vania Freiria de Oliveira
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, 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) e David Murphy (Universidade de Bristol) pela amizade e principalmente por permitir a realização de parte dos experimentos.
- À minha mulher, Graziela, que está ao meu lado em todos os momentos, bons e ruins, não deixando-me esmorecer.
- Aos meus pais que sempre me apoiaram nessa jornada acadêmica. Pelos conselhos e apoios nos momentos que mais precisei deles. Muito obrigado por vocês estarem presentes em minha vida.
- Também aos meus irmãos 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 os outros professores do Programa Interinstitucional de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas UFSCar/UNESP.
- E claro, aos ratos, seres indispensáveis para o progresso da ciência, que devem sempre ser respeitados e tratados com a devida importância.
- A todos que contribuíram meus sinceros agradecimentos.

EPÍGRAFE

Siga o seu coração, mas leve sempre seu cérebro consigo.

(Autor desconhecido)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	8
LISTA DE TABELAS	12
LISTA DE ABREVIATURAS	13
RESUMO	15
ABSTRACT	17
INTRODUÇÃO	19
AJUSTES À ESTÍMULOS OSMÓTICOS	22
AJUSTES À HEMORRAGIA	24
NTS/NEURÔNIOS A2 E EQUILÍBRIO HIDROELETROLÍTICO	25
NTS/NEURÔNIOS A2 E REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR	27
OBJETIVOS	30
MATERIAL E MÉTODO	31
1 ANIMAIS	31
2 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA	31
3 INJEÇÕES DE DROGAS	32
4 MEDIDAS DE INGESTÃO DE ÁGUA	32
5 DOSAGEM URINÁRIA	32
6 LESÃO DO GRUPAMENTO CATECOLAMINÉRGICO A2 DO NTScom	32
7 IMPLANTE DE CÂNULAS NO VENTRÍCULO LATERAL (VL)	33
8 MICROINJEÇÃO NO VL	34
9 HISTOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA	34
10 CONTAGEM CELULAR	37
11 ANÁLISE DO RNAm por técnica de RT-PCR	37
12 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS	38
13 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
PARTE I:	39
ESTÍMULO OSMÓTICO E LESÃO DO GRUPAMENTO A2 DO NTScom	39
PROCOLOS EXPERIMENTAIS PARTE I	40
1 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom nos ajustes cardiovasculares induzidos pela gavagem de NaCl 2 M: participação da vasopressina .	40
2 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom na expressão da proteína c-FOS nos neurônios do PVN e SONinduzida pela gavagem de NaCl 2 M.	41
3 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom na ingestão de água e excreção urinária induzida por gavagem intragástrica de NaCl 2 M.	41

4	Alteração na expressão gênica no NTS após gavagem com NaCl 2 M.	42
	RESULTADOS PARTE I	43
1	Quantificação de neurônios catecolaminérgicos no bulbo em ratos com lesão A2	43
2	Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom nos ajustes cardiovasculares induzidos pela gavagem de NaCl 2 M: participação da vasopressina	45
3	Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom na expressão da proteína c-FOS induzida pela gavagem de NaCl 2 M.	50
4	Alterações da expressão gênica no NTS após a gavagem de NaCl 2 M	55
5	Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom na ingestão de água e excreção urinária induzida por gavagem intragástrica de NaCl 2 M.	56
6	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PARTE I:	59
	PARTE II:	60
	HEMORRAGIA E LESÃO DO GRUPAMENTO A2 DO NTScom	60
	PROCOLOS EXPERIMENTAIS PARTE II	61
1	Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupo A2 nos ajustes cardiovasculares induzidos por hemorragia: participação da vasopressina e da angiotensina II periférica.	61
2	Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupo A2 nos ajustes cardiovasculares induzidos por hemorragia: participação da angiotensina II central	61
	RESULTADOS PARTE II	62
1	Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupo A2 nos ajustes cardiovasculares induzidos por hemorragia: participação da vasopressina e da angiotensina II periférica	62
2	Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupo A2 nos ajustes cardiovasculares induzidos por hemorragia: participação da angiotensina II central	68
3	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PARTE II:	73
	DISCUSSÃO	74
	CONCLUSÃO	85
	REFERÊNCIAS*	86

LISTA DE FIGURAS

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 hipoglosso). 20

FIGURA 2 – Neurônios do grupamento catecolaminérgico C1, A1 e A2 (marrom) situados no RVL, CVL e NTS comissural, respectivamente, reativos à tirosina hidroxilase. 22

FIGURA 3 – Número (média \pm EPM) de células positivas para TH em seções de 40 μ m de espessura da região dorsal e ventral do bulbo. Microinjeções de anti-D β H-saporina (lesão A2) ou anti-IgG-saporina (LF) no NTScom. *diferente de LF (One Way ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Número de animais entre parênteses. 43

FIGURA 4 – Fotomicrografia de três níveis do bulbo (640 μ m caudal, óbex e 640 μ m rostral ao óbex) mostrando células imunoreativas à tirosina hidroxilase (TH) no NTScom (area A2; A e B), CVL (area A1; C e D) e RVL (area C1; E e F) de ratos que receberam microinjeção de anti-D β H-saporina (Lesão A2) ou anti-IgG-saporina (LF) no NTScom. Escala = 200 μ m. 44

FIGURA 5 – Alterações na (A) pressão arterial média (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão A2 e lesão fictícia (LF) após gavagem intragástrica de NaCl 0,15 M NaCl e NaCl 2 M (2 ml, setas).* diferente de LF; # diferente do basal (-10 minutos); (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais está indicado entre parênteses. 46

FIGURA 6 – Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos lesão fictícia e lesão A2 que receberam injeções intravenosas de salina (NaCl 0,15 M; 1 ml/kg) ou antagonista de receptores V1 da vasopressina (composto de Manning, 10 μ g/kg peso corporal)

antes da gavagem de NaCl 2 M (2 ml). Setas indicam o momento da gavagem. Escala = 10 minutos.

48

FIGURA 7 – Alterações na (A) pressão arterial média (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão A2 e lesão fictícia (LF) pré-tratados com antagonista de receptores V1 da vasopressina (composto de Manning, 10 µg/kg peso corporal, iv) ou salina (NaCl 0,15 M; 1 ml/kg, iv) após NaCl 2 M intragástrico (2 ml; seta). * diferente do basal (-10 minutos); † diferente dos grupos LF; # diferente de lesão A2 + antagonista V1 (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Os resultados estão representados como média ± EPM. O número de animais está indicado entre parênteses.

49

FIGURA 8 – Fotomicrografia mostrando imunoreatividade para c-FOS em ratos com LF (A, C, E e G) e Lesão A2 (B, D, F e H) após gavagem intragástrica com NaCl 0,15 M (A, B, E e F) ou NaCl 2 M (C, D, G e H). 3^o V: terceiro ventrículo; PVNm: PVN magnocelular; PVNp: PVN parvocelular. Escala = 200 µm.

51

FIGURA 9 – Número de células imunoreativas para c-FOS por seção de 150 µm no núcleo supraóptico (SON), porção magnocelular (PVNm) e parvocelular (PVNp) do núcleo paraventricular do hipotálamo em ratos com lesão A2 e lesão fictícia (LF) após gavagem intragástrica de NaCl 0,15 M ou NaCl 2 M (2 ml). * diferente de NaCl 0,15 M, # diferente de LF + NaCl 2 M (ANOVA de uma via associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média ± EPM. O número de animais está indicado entre parênteses.

52

FIGURA 10 – Fotomicrografia de cortes coronais representativos para c-FOS (verde) e vasopressina (AVP, vermelho) e dupla marcação (FOS+AVP) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo supraóptico (SON) de ratos com lesão A2 e ratos com lesão fictícia (LF). Escala= 200 µm

53

FIGURA 11 – Fotomicrografia de cortes coronais representativos para c-FOS (verde) e ocitocina (OT, vermelho) e dupla marcação (FOS+OT) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo supraóptico (SON) de ratos com lesão A2 e ratos com lesão fictícia (LF). Escala= 200 µm.

54

FIGURA 12 – Alterações na expressão gênica no NTS após NaCl 2 M. Todos os resultados foram corrigidos pela expressão gênica da proteína 18s de

cada animal. * diferente de NaCl 0,15 M (ANOVA de uma via associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais está entre parênteses. 55

FIGURA 13 – Efeitos da gavagem intragástrica de NaCl 2 M em ratos com Lesão A2 ou LF sobre a ingestão não cumulativa (A) e cumulativa (B) de água. Os resultados são expressos como média \pm EPM. # diferente de LF, * diferente de NaCl 0,15 M (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Número de animais está indicado entre parênteses. 57

FIGURA 14 – Efeitos da gavagem intragástrica de NaCl 2 M em ratos com lesão A2 ou lesão fictícia (LF) sobre (A) diurese (B) natriurese and (C) caliurese antes (-60 a 0 min) e durante a ingestão de água (0 a 120 min). Os resultados são expressos como média \pm EPM.* diferente de NaCl 0,15 M (ANOVA de uma via associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Número de animais está indicado entre parênteses. 58

FIGURA 15 – Traçado representativo mostrando pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em animais com lesão fictícia (LF) ou lesão dos neurônios A2 por um período de 20 minutos onde foi avaliado a labilidade da pressão arterial causada pela lesão fictícia ou e lesão A2 do NTScom. 63

FIGURA 16 – Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos lesão fictícia e lesão A2 que receberam injeções intravenosas de salina (NaCl 0,15 M; 1 ml/kg), antagonista de receptores V1 da vasopressina (10 μ g/kg) ou losartan (10 mg/kg) antes da hemorragia (4 x 2 ml/300 g peso corporal). Setas indicam o momento das retiradas de sangue. Escala = 10 minutos. 65

FIGURA 17 – Alterações na (A) pressão arterial media (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão A2 e lesão fictícia (LF) pré-tratados com losartan (antagonista de receptores de angiotensina AT1; 10 mg/kg peso corporal), composto de Manning (antagonista V1, 10 μ g/kg peso corporal) ou NaCl 0,15 M (1 ml/kg) iv após hemorragia (4 retiradas de sangue de 2 ml/300 g peso corporal; seta indica 4ª retirada de sangue). * diferente lesão A2 + salina e lesão A2 + ant V1 vs. lesão A2 + losartan e todos os grupos LF, # diferente do basal (-10 minutos); † diferente lesão A2 + salina vs. lesão A2 + losartan e LF + losartan (Two Way ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Os

resultados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais está indicado entre parênteses.

66

FIGURA 18 – Fotomicrografia de um animal representativo do grupo que recebeu microinjeção no ventrículo lateral (VL). Trajeto da cânula guia em direção ao VL (seta). Comissura anterior, ca. Escala = 2 mm.

69

FIGURA 19 – Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos lesão fictícia e lesão A2 que receberam injeções intracerebroventricular de salina (NaCl 0,15 M; 1 μ l) ou losartan (100 μ g/ μ l) antes da hemorragia (4 x 2 ml/300 g peso corporal). Setas indicam o momento das retiradas de sangue. Escala = 10 minutos.

70

FIGURA 20 – Alterações na (A) pressão arterial média (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão A2 e LF pré-tratados intracerebroventricularmente com losartan (100 μ g/ μ l) ou salina (1 μ l) após hemorragia (4 retiradas de sangue de 2 ml/300 g peso corporal; seta indica 4ª retirada de sangue).. * diferente lesão A2 + salina vs. outros grupos, # diferente do basal (-10 minutos); † diferente lesão A2 vs. LF (Two Way ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais está indicado entre parênteses.

71

FIGURA 21 – Presença de mecanismos inibitórios.

79

FIGURA 22 – Ausência de mecanismos inibitórios.

80

FIGURA 23 – Presença de mecanismos inibitórios.

83

FIGURA 24 – Ausência de mecanismos inibitórios.

84

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores basais e variação (Δ) na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) após fenilefrina (2,5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal; iv), nitroprussiato de sódio (NPS, 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal; iv), cianeto de potássio (KCN, 40 $\mu\text{g}/\text{rato}$) e fenilbiguanida (4 $\mu\text{g}/\text{rato}$) em ratos LF e lesão A2. 45

Tabela 2 – Alterações da pressão arterial média após injeção intravenosa de vasopressina (AVP – 12,5 ng/rato) antes e após 5 e 75 minutos após o antagonista V1 da vasopressina (Manning compound, V1 ant – 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) em ratos LF e lesão A2. 47

Tabela 3 – Pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e labilidade da PAM em animais LF e com lesão A2. 62

Tabela 4 – Variações (Δ) na pressão arterial média (PAM) após injeções de angiotensina II (ANG II, 50 ng/rato, iv) antes, 5 e 105 minutos após NaCl 0,15 M (1 ml/kg, iv) ou losartan (10 mg/kg peso corporal, iv). 67

Tabela 5 – Variações (Δ) na pressão arterial média (PAM) após injeções de vasopressina (AVP, 12,5 ng/rato; iv) antes, 5 e 105 minutos após NaCl 0,15 M (1 ml/kg, iv) ou antagonista V1 da vasopressina (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso corporal, iv). 67

Tabela 6 – Alterações (Δ) na pressão arterial média (PAM) após a microinjeção de ANG II (50 ng/1 μl) intracerebroventricularmente em animais com lesão fictícia (LF) ou lesão A2 pré tratados com salina ou losartan (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) no ventrículo lateral (VL). A microinjeção de ANG II foi feita no final dos experimentos (105 min após losartan ou salina no VL). 72

LISTA DE ABREVIATURAS

- A1: neurônios catecolaminérgicos do grupo A1, localizados no CVL
- A2: neurônios catecolaminérgicos do grupo A2, localizados no NTS
- ANG II: angiotensina II
- AP: área postrema
- AV3V: região anteroventral do terceiro ventrículo
- AVP: arginina vasopressina
- C1: neurônios catecolaminérgicos do grupo C1, localizados no RVL
- CVL: bulbo caudoventrolateral
- DAB: diaminobenzidina
- DNAB: feixe noradrenérgico dorsal
- D β H: dopamina- β -hidroxilase
- EPM: erro padrão da média
- FC: frequência cardíaca
- icv: intracerebroventricular
- ig: intragastricamente
- ip: intraperitoneal
- iv: intravenoso
- KCN: cianeto de potássio
- LF: lesão fictícia
- 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

PVNm: porção magnocelular do PVN

PVNp: porção parvocelular do PVN

RVL: bulbo rostroventrolateral

sc: subcutâneo

SFO: órgão subfornical

SNC: sistema nervoso central

SON: núcleo supra-óptico

TH: tirosina hidroxilase

VL: ventrículo lateral

VNAB: feixe noradrenérgico ventral

Freiria-Oliveira, A H. Participação do grupamento catecolaminérgico A2 do núcleo do trato solitário comissural nos ajustes cardiovasculares e do equilíbrio hidroeletrólítico induzidos por alterações da osmolaridade ou volume plasmático. [Tese – Doutorado]. Araraquara: Faculdade de Odontologia da UNESP; 2010.

RESUMO

É de extrema importância para o funcionamento do organismo a manutenção da osmolaridade e volume dos líquidos corporais. O sistema nervoso central (SNC) tem um papel fundamental para esta manutenção. 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. Desta forma, o NTS pode fazer a ligação entre as aferências viscerais e o SNC e participar dos ajustes necessários a regulação da osmolaridade e da volemia. A maior porção dos neurônios do grupamento catecolaminérgicos A2 do bulbo está localizada na porção comissural no NTS (NTScom). Assim, os objetivos deste estudo foram: a) estudar os efeitos na pressão arterial, na ingestão de água e na excreção renal subsequentes a administração de NaCl 2 M, estímulo osmótico agudo, em ratos com lesão seletiva dos neurônios A2 do NTScom; b) estudar os efeitos na expressão da proteína c-FOS subsequente a administração de NaCl 2 M, em ratos com lesão seletiva dos neurônios A2 do NTScom, c) estudar alterações na expressão de RNAm no NTS após a administração de NaCl 2 M, d) estudar os efeitos na pressão arterial subsequentes a hemorragia hipotensiva, em ratos com lesão seletiva dos neurônios A2 do NTScom. Ratos Holtzman (280-320 g) ou ratos Sprague-Dawley (230-280 g) foram utilizados neste estudo. Para a lesão seletiva dos neurônios A2 do NTScom ou lesão fictícia (LF), os animais foram submetidos a uma craniotomia parcial e a superfície dorsal do bulbo foi exposta. A lesão seletiva dos neurônios noradredérgicos foi realizada por meio da injeção no NTScom da toxina anti-dopamina- β -hidroxilase-saporina. Nos ratos LF foi injetado anti-IgG-saporina. Em ratos com lesão do grupamento A2 do commNTS observamos que as respostas reflexas do barorreflexo bem como as respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo estavam intactas, assim como o reflexo cardiopulmonar, ativado com fenilbiguanida. Nos ratos com lesão A2 mas não nos ratos LF, a sobrecarga de NaCl 2 M ig, que promove aumento da osmolaridade sem alterar o volume plasmático, promoveu aumento da pressão

arterial, que foi dependente de vasopressina, e perdurou por pelo menos 60 min. Observamos também nos ratos com lesão A2 um incremento na resposta dipsogênica, enquanto que a excreção renal foi semelhante entre os ratos com lesão A2 e ratos LF. Após a gavagem com NaCl 2 M observamos que a expressão de c-Fos na região magnocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVNm) foi significativamente maior nos ratos com lesão A2 comparados com os ratos com lesão fictícia, sendo que parte desses neurônios eram vasopressinérgicos ou ocitocinérgicos. Em ratos intactos, observamos que a gavagem de NaCl 2 M foi capaz de aumentar a expressão do RNAm no NTS para o fator inibitório da migração de macrófagos, D β H e vesícula transportadora de glutamato indicando que a gavagem hipertônica é capaz de promover alterações na expressão gênica em determinadas áreas do SNC, visando um controle da osmolaridade a longo prazo. Observamos também que ratos com lesão A2 ou LF submetidos ao protocolo de hemorragia hipotensiva, (4 retiradas de sangue consecutivas com intervalos de 10 minutos entre elas) que a hipotensão causada pela hemorragia foi semelhante em ambos os grupos. Entretanto, os animais com lesão A2 apresentaram uma melhor recuperação da hemorragia, retornando os valores de pressão arterial média (PAM) aos níveis pré-hemorragia, enquanto animais LF não recuperam os valores de PAM até o final do experimento (60 min). Observamos também que nos animais com lesão A2 a melhor recuperação da resposta hipotensiva da hemorragia é devida a mecanismos angiotensinérgicos periféricos e centrais. Nossos resultados sugerem que os neurônios do grupamento A2 do NTS com fazem parte de uma circuitaria neural inibitória que controla a pressão arterial, secreção de vasopressina e ingestão de água induzida pelo aumento da osmolaridade plasmática, bem como possuem um papel inibitório sobre as vias angiotensinérgicas ativadas pela hemorragia.

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

Freiria-Oliveira, A H. Participation of A2 catecholaminergic neurons of nucleus of tract solitary on cardiovascular and hydroelectrolytic balance adjustments induced by plasmatic osmolality or volume changes. [Tese – 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. The great part of the catecholaminergic neurons of the A2 group is located in the commissural part of the NTS (NTScom). Thus, the aims of this study were: a) to verify the effects in the arterial pressure, water intake and renal excretion observed after intragastric (ig) 2 M NaCl in rats with lesion of the A2 neurons of the NTScom, b) to verify the effects in the c-Fos expression after ig 2 M NaCl in rats with lesion of the A2 neurons of the NTScom, c) to study changes in gene expression on NTS after ig 2 M NaCl, d) to study the effects in arterial pressure after hypotensive hemorrhage in rats with lesion of the A2 neurons of the NTScom. Male Holtzman rats (280-320 g) or Sprague-Dawley (250-280 g) were used. For the A2 lesion of the NTScom, a partial craniotomy of the occipital bone was performed, and the dorsal surface of the brainstem was exposed. The lesion was performed by the injection of the toxine anti-dopamine- β -hydroxylase-saporin into the NTScom to destroy A2 neurons in this region. Sham lesioned rats anti-IgG-saporin was injected into the NTScom. We observed that in A2 lesioned rats, ig 2 M NaCl induced a vasopressin dependent-pressor response, for at least 60 min. The water intake induced by sodium overload was also incremented in A2 lesioned rats, however the natriuresis and diuresis after 2 M NaCl were similar in both groups. After 2 M NaCl, we observed that the number of the c-FOS expressing cells in the magnocellular paraventricular nucleus (mPVN) was greater in the NTScom lesioned rats, and part of these neurons was either vasopressinergic or oxytocinergic. In intact animals, the intragastric 2 M NaCl load promoted an increase in the RNAm expression levels for macrophage inhibitory factor, D β H and vesicular glutamate transporter that indicate a possible chronic mechanism to control changes in osmolality. We observed that hemorrhage (4 consecutive blood withdraw) promoted a similar hypotension in both groups, but A2-lesioned rats showed a greater recovery in blood pressure levels than sham rats. Sham animals did not recover from

hypotension until the end of the recording (60 min). The greater recovery of the hypotension in A2 lesioned rats were due to an increase in central and peripheral angiotensinergic mechanism, and not vasopressin mechanisms. The present data suggest that the A2 neurons of the NTScom are part of an inhibitory neural circuitry controlling arterial pressure, vasopressin secretion and water intake induced by increasing plasma osmolality. In addition, A2 noradrenergic neurons of the NTScom have an inhibitory role upon angiotensinergic pathways activated by hemorrhage.

Keywords: Homeostasis; drinking; hypertension.

INTRODUÇÃO

O volume circulante e a osmolaridade plasmática são controlados dentro de uma faixa estreita e são fortemente defendidos em mamíferos por processos homeostáticos que integram as respostas dos sistemas cardiovascular, renal e neuroendócrino⁶. O compartimento extracelular é composto pelo compartimento vascular e extravascular (intersticial). O volume do compartimento extracelular é determinado em grande parte pelo balanço entre a ingestão e a excreção renal de sódio. As variações de volume do compartimento extracelular constituem um dos sinais que permitem que a excreção urinária de sódio varie apropriadamente de acordo com as flutuações da sua ingestão.

O sistema nervoso central (SNC) pode detectar variações da composição e do volume extracelular por meio de células especializadas (osmorreceptores), da concentração de hormônios circulantes (angiotensina II, por ex.) ou através de sinais neurais provenientes de 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 cardiopulmonares⁸⁵. Os barorreceptores arteriais localizam-se principalmente no arco da aorta e seio carotídeo, respondem primariamente à variações da pressão arterial, e as informações geradas por estes receptores são conduzidas ao SNC através do X e IX pares de nervos cranianos (nervos vago e glossofaríngeo, respectivamente)³⁶. A participação dos barorreceptores nos ajustes cardiovasculares à hipervolemia e aumento da osmolaridade plasmáticos já foram documentados^{38,113}. 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 vago⁵⁵. Já os osmorreceptores periféricos parecem estar localizados na veia porta e na circulação hepática, e convertem a concentração de Na⁺ da veia porta em atividade nervosa hepática aferente, cujos sinais são enviados ao SNC pelo nervo vago^{71,77}. Em comum, todos esses aferentes convergem para o núcleo do trato solitário (NTS), onde fazem sua primeira sinapse^{1,36,45,111}.

Além dos osmorreceptores periféricos, há um conjunto de osmorreceptores que estão localizados no SNC, em sua maioria, no prosencéfalo em áreas livre de barreira hematoencefálica, como o órgão subfornical (SFO) e órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT)²³⁻²⁴. Aumentos da osmolaridade plasmática, por privação hídrica^{68,107,117}, infusão intravenosa de soluções hipertônicas^{5,66,114,150} ou ainda sobrecarga intragástrica de solução hipertônica^{19,31,91,116} é capaz de ativar os osmorreceptores que se projetam para áreas

importantes para o controle neuroendócrino, como núcleo paraventricular (PVN) e supraóptico do hipotálamo (SON), ativando mecanismos fundamentais para a normalização da osmolaridade e volemia²².

Uma série de evidências experimentais tem demonstrado que regiões procencefálicas estão envolvidas nos ajustes cardiovasculares e do equilíbrio hidroeletrolítico frente às alterações de volume e osmolaridade plasmática^{6,85,100-101}. Ademais, outros estudos demonstram que regiões mais posteriores do encéfalo também podem modular esses ajustes. Dentre essas áreas, podemos destacar o NTS. Anatomicamente o NTS 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^{36,147}. 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 (NTSi) e NTS comissural (NTScom)⁴⁵ conforme representação esquemática abaixo:

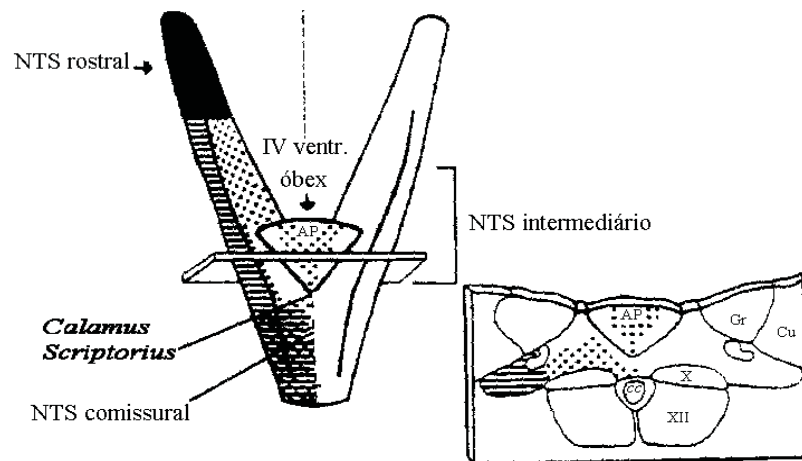


FIGURA 1: Representação esquemática do NTS. No detalhe corte sagital na altura do NTS intermediário (AP=área postrema; cc= canal central; Gr= núcleo gracile; Cu= núcleo cuneato; X= núcleo dorsal motor do nervo vago; XII= núcleo hipoglossal). [Modificado de¹⁴⁷].

Além das aferências cardiovasculares e de osmorreceptores periféricos, o NTS também recebe projeções da área postrema (AP) que, como demonstrada na figura acima, está situada dorsalmente ao NTS⁶¹. A AP é um órgão circumventricular, e, portanto, livre de barreira hematoencefálica e rica em receptores de angiotensina II (ANG II)⁶⁴. Conseqüentemente, alterações de hormônios circulantes, como a ANG II sanguínea, podem ser percebidas pela AP e as informações geradas 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), o núcleo paraventricular do hipotálamo, o núcleo parabraquial lateral (NPBL) e os núcleos vasomotores do bulbo^{65,74,119,123,147,152}.

Um dado anatômico interessante é que as porções intermédiana e comissural do NTS são densamente inervadas por axônios de neurônios que sintetizam e liberam catecolaminas, bem como contém neurônios do grupamento catecolaminérgico A2 (neurônios que sintetizam noradrenalina, figura abaixo)⁴⁸. Trabalhos de Saper¹²⁴ verificaram que parte dos neurônios do NTS são imunoreativos à tirosina hidroxilase (TH), primeira enzima da síntese de noradrenalina ou adrenalina. O grupamento catecolaminérgico A2 que está na região do NTS, se projeta para áreas hipotalâmicas como a região AV3V, o PVN e SON^{49,128}, os quais fazem estão intimamente relacionadas com o balanço equilíbrio hidroeletrólítico e regulação cardiovascular⁸⁵. Além do grupamento A2 situado no NTS, também foi demonstrado que parte dos neurônios do bulbo ventrolateral também são reativos a TH^{48,121}. Técnicas de imunohistoquímica demonstraram que parte dos neurônios do bulbo caudo ventrolateral (CVL) são reativos TH, mas não o são para a feniletanolamina N-metil transferase, enzima que converte noradrenalina em adrenalina, demonstrando que esses neurônios compõem o grupo catecolaminérgico A1 como originalmente definido por Hokefelt e Fuxe¹⁵¹. Da mesma maneira, trabalhos anteriores demonstraram que as regiões do bulbo rostroventrolateral (RVL) com maior atividade no controle cardiovascular coincidem com o polo anterior dos neurônios adrenérgicos do grupo C1, ou seja, são neurônios que sintetizam adrenalina^{48,121}.

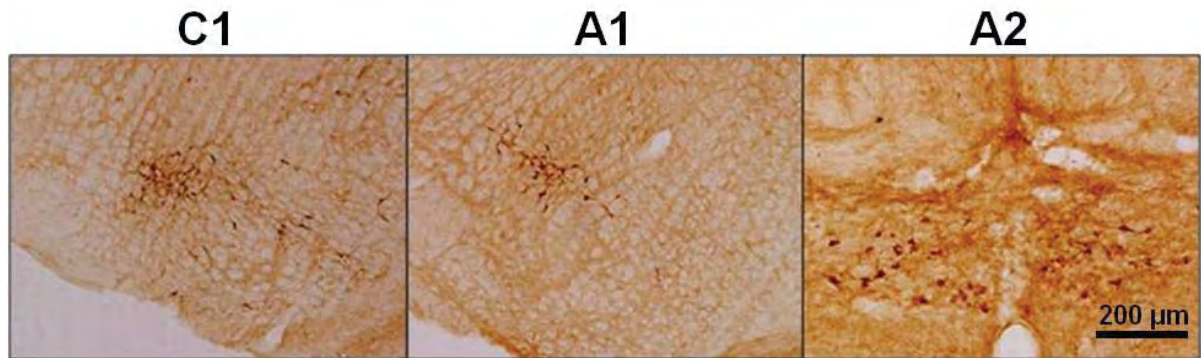


FIGURA 2: Neurônios do grupamento catecolaminérgico C1, A1 e A2 (marron) situados no RVL, CVL e NTS comissural, respectivamente, reativos à tirosina hidroxilase.

Os grupamentos A2 e A1 recebem informações sobre a pressão arterial e volume circulante por meio dos barorreceptores arteriais e receptores cardiopulmonares, e podem, graças às suas eferências às regiões hipotalâmicas, informá-las das alterações na pressão arterial e na volemia. Portanto, parece que estas áreas catecolaminérgicas bulbares podem constituir uma alça importante no controle neuro-humoral da pressão arterial e da composição e do volume circulante. De fato, foi demonstrado que a lesão do grupamento catecolaminérgico A1 feita com a injeção da toxina anti-DβH-saporina, que destrói seletivamente neurônios noradrenérgicos ou adrenérgicos, reduz a vasodilatação renal e a redução da atividade simpática renal induzida por aumento da osmolaridade plasmática ou do volume circulante^{113,115}. A redução da atividade simpática renal e a vasodilatação renal são importantes mecanismos de ajustes para aumento da excreção renal em situação hipervolemia ou hiperosmolaridade plasmática.

AJUSTES À ESTÍMULOS OSMÓTICOS

Existem várias formas pelas quais os osmorreceptores centrais são ativados, por qualquer manobra experimental que cause aumento da osmolaridade plasmática ou seletivamente no SNC^{35,67,135}, levando a ativação dos osmorreceptores centrais localizados no SFO e OVLT²³. A ativação dos osmorreceptores centrais por infusão intravenosa de salina hipertônica aumenta a pressão arterial^{66,114}, atividade simpática^{5,66,115,150} e ativa áreas responsáveis pela secreção de vasopressina e ocitocina como o PVN e SON⁷⁵⁻⁷⁶. Sabe-se que a privação hídrica causa aumento da osmolaridade plasmática e também ativa neurônios do PVN e SON^{68,107,117} e do NTS⁸⁴, além de causar aumentos da atividade simpática^{25,140,141}. Também foi demonstrado que aumentos da osmolaridade causado pela ingestão apenas de solução hipertônica de NaCl sem acesso à água por 6 dias¹⁵⁷ foi capaz de aumentar a

expressão do RNAm para vasopressina do hipotálamo, demonstrando que aumentos crônicos da osmolaridade plasmática são capazes de provocar modificações gênicas de áreas hipotalâmicas. Uma outra maneira de ativar os osmorreceptores centrais é a sobrecarga intragástrica (ig) de salina hipertônica^{33,91-92,116,142}, onde a sobrecarga ig com NaCl 2 M é capaz de aumentar a osmolaridade plasmática em 4% sem alterar o volume plasmático¹¹⁶.

O aumento da osmolaridade plasmática, independente do protocolo utilizado, promove resposta dipsogênica e natriurese^{3,24,63,67,116,143}, mas os mecanismos pelos quais a hiperosmolaridade promove natriurese ainda não é totalmente esclarecido. Certamente, um dos mecanismos que participam desta resposta é a liberação do hormônio ocitocina (OT) pelo PVN e SON, uma vez que a OT induz natriurese e é liberada em situações de aumento da osmolaridade plasmática^{6,78-79,102}.

Já está bem estabelecido que a gavagem ig com NaCl 2 M aumenta a concentração plasmática de sódio e a osmolaridade plasmática em 4%, contudo o volume plasmático permanece inalterado e a concentração de renina plasmática ficam reduzidos¹¹⁶, mostrando que não há alteração de volemia. A ingestão de água após a sobrecarga de NaCl 2 M ig é consequência da ativação de osmorreceptores centrais, localizados em áreas prosencefálicas, como SFO e o OVLT, que são parte da lâmina terminal^{22,102}. Estudos funcionais têm demonstrado que a lesão do SFO ou da região AV3V (que engloba o OVLT) reduzem a ingestão de água induzida por um aumento da osmolaridade plasmática^{26,138}.

Por muito tempo, a sede induzida pela sobrecarga ig de solução de NaCl hipertônico foi creditada apenas a estimulação de osmorreceptores centrais situados nestas áreas. Mais recentemente, a participação de osmorreceptores hepáticos (periféricos), cujos aferentes cursam por meio do nervo vago^{71,77}, parecem também contribuir para a ingestão de água induzida por sobrecarga intragástrica de sódio hipertônico^{90-91,142}. Esses trabalhos demonstraram que a ingestão de água induzida por sódio hipertônico ig ocorre mesmo antes de haver algum aumento na osmolaridade plasmática^{91,142}, 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. Como citado anteriormente, aferências de osmorreceptores presentes na região portal, que ascendem através do vago fazem sua primeira sinapse no NTS. Outros trabalhos demonstram que após a sobrecarga de salina hipertônica capaz de ativar apenas os osmorreceptores periféricos, os neurônios do NTScom e NTSi apresentaram marcação para proteína c-FOS, o que nos mostra uma ativação destas regiões após a sobrecarga⁸⁷.

Como descrito anteriormente, o aumento na osmolaridade plasmática por meio da gavagem intragástrica com NaCl 2 M promove ingestão de água. Este procedimento experimental também induz natriurese¹¹⁶. No entanto os efeitos da sobrecarga ig NaCl 2 M sobre a pressão arterial ainda não foram descritos, bem como a participação dos neurônios A2 do NTScom nas respostas cardiovasculares e equilíbrio hidroeletrólítico induzidos pela aumento da osmolaridade plasmática também não são conhecidos.

AJUSTES À HEMORRAGIA

Para a perfeita manutenção do equilíbrio dos líquidos corporais, além dos osmorreceptores há também mecanismos que controlam alterações do volume circulante. Um grande e complexo exemplo de alteração do volume circulante é a hemorragia. A hemorragia pode ser do tipo não hipotensiva, onde mecanismos rápidos de controle da pressão arterial, como aumento da atividade simpática^{72,134}, são recrutados para reestabelecer os níveis necessários de pressão arterial para a boa perfusão sanguínea e distribuição de nutrientes pelo corpo. Se o estímulo hemorrágico permanece ocasionando hipotensão, ocorre uma intensa liberação de vasopressina e renina^{15,27,60,132} e uma redução da atividade simpática¹³⁴. Neste trabalho, Scrogin¹³⁴ observou que a hemorragia promovida pela retirada de sangue (3,2 ml/min/kg) promove aumento da atividade simpática no período inicial da hemorragia, fase não hipotensiva, e após 3 minutos do início da retirada, o aumento da atividade simpática alcança o pico máximo, uma vez que a hemorragia não é interrompida, ocorre a segunda etapa da hemorragia, onde há hipotensão, e após 7 minutos do início da hemorragia, ocorre então a diminuição da atividade simpática. Já o aumento da atividade da renina plasmática é observado logo após uma ligeira diminuição da pressão arterial e perda de 20% da volume total de sangue^{118,130} que ocorre concomitantemente com o pico do aumento da atividade simpática. Sabe-se também que a hemorragia hipotensiva, ocasionada por 4 retiradas sucessivas de sangue em intervalos de 10 minutos, é capaz de aumentar a concentração plasmática de vasopressina em duas vezes em relação ao basal após a terceira retirada e em 6 vezes em relação à concentração basal após a quarta retirada de sangue¹³². Após uma perda de 30% do volume total de sangue há também grande secreção de vasopressina¹¹⁸. Dessa forma podemos entender a cronologia dos eventos que sucedem a perda de sangue, com um aumento da atividade simpática nos primeiros minutos que seguem a perda de sangue; com o início da queda de pressão ocasionada pela persistência da hemorragia, há o aumento da atividade da

renina plasmática e então o grande aumento da secreção de vasopressina para tentar restabelecer os valores da pressão arterial.

Trabalhos demonstram que a hemorragia é capaz de aumentar a expressão da proteína c-FOS em áreas do SNC como OVLT, SFO⁸, PVN, SON^{8,27,82-83}, amígdala⁵², NPBL, locus coeruleus⁸³, bulbo ventrolateral^{8,27} e NTS²⁸, sendo que essas áreas são relacionadas seja com regulação do equilíbrio hidroeletrólítico, secreção de vasopressina e regulação cardiovascular. Está bem estabelecido também que vias catecolaminérgicas centrais são ativadas pela hemorragia^{7-8,15,27,34,72,82,96,130,145}. Foi demonstrado que a hemorragia hipotensiva é capaz de aumentar a atividade dos neurônios catecolaminérgicos do NTS que se projetam para o SFO¹⁴⁵, assim como a lesão do feixe noradrenérgico dorsal (DNAB), que compreende as fibras dos neurônios A1 e também do locus coeruleus, reduz a atividade da renina plasmática e a secreção de vasopressina⁹⁵⁻⁹⁶.

NTS/NEURÔNIOS A2 E EQUILÍBRIO HIDROELETRÓLÍTICO

Por muitos anos, os estudos do controle da ingestão de água e sódio focalizaram-se nas áreas prosencefálicas e hipotalâmicas. Entretanto, um possível papel de áreas do tronco encefálico como AP, NTS e o NPBL, tem sido sugerido no controle do balanço hidroeletrólítico^{18,39,44,81,104,108,154}. Enquanto que as áreas hipotalâmicas e prosencefálicas teriam um papel preferencialmente excitatório sobre a ingestão de água e sódio, uma série de evidências experimentais sugerem que as áreas mais posteriores do encéfalo, situadas na ponte e no bulbo, fariam parte do circuito das vias inibitórias da sede e do apetite ao sódio^{85,102}.

A lesão da AP e adjacências imediatas do NTSi (AP/NTSi) promove uma maior ingestão de água do que a observada em ratos não lesados, quando os animais recebem injeção de ANG II ou isoproterenol periféricamente⁵⁸. Esta mesma região também tem sido implicada no controle da ingestão de sódio^{44,57,81,154}. Com relação ao NTS, foi demonstrado que a lesão do NTSi promove uma potencialização da ingestão de água induzida pela infusão iv de ANG II, mas não altera a ingestão de água induzida por salina hipertônica iv¹³³. Estes autores argumentam que o aumento da pressão arterial causado pela ANG II iv, que seria um fator inibitório para a ingestão de água como demonstrado por outros estudos⁵⁹, não seria percebido nos animais com lesão do NTSi, pois os mesmos estão com o barorreflexo bloqueado, e por isso, os animais teriam um aumento da ingestão de água. Desta forma, segundo estes autores, o NTSi teria uma participação indireta na ingestão de água induzida por ANG II periférica. No entanto, esses mesmos autores não discutem a ausência de efeito da lesão do NTSi sobre a

ingestão de água induzida por desidratação intracelular (infusão de salina hipertônica, iv). Dados do nosso laboratório demonstraram que a lesão eletrolítica do NTS com potencializa a resposta dipsogênica induzida pela administração de isoproterenol subcutaneamente¹⁸, bem como a ingestão de água induzida pela administração intragastricamente de NaCl 2 M^{16,19}. A potencialização das respostas dipsogênicas não são decorrentes de uma maior hipotensão nos ratos lesados, uma vez que a hipotensão é um fator facilitatório para a ingestão de água¹⁴⁸⁻¹⁴⁹, e isso poderia contribuir para a resposta dipsogênica. Foi observado nesses estudos que a queda da pressão arterial induzida pelo isoproterenol foi semelhante nos ratos lesados e com lesão fictícia e a sobrecarga de sódio induziu hipertensão nos ratos lesados^{16,18}. Também foi demonstrado que a gavagem de NaCl 2 M além de promover ingestão de água também promove uma intensa natriurese^{19,116} possivelmente ocasionada pelo aumento de ocitocina promovido pela sobrecarga de NaCl, e essa natriurese é potencializada em animais com lesão eletrolítica no NTS com¹⁹.

Conforme descrito anteriormente, o NTS envia projeções para o NPBL^{74,152}. A participação do NPBL no controle da ingestão de água e sódio foi inicialmente demonstrada nos trabalhos pioneiros de Ohman e Jonhson¹⁰⁸⁻¹⁰⁹, e posteriormente contaram com a grande participação do nosso laboratório^{4,30,39,103}. Esses estudos demonstram que a lesão ou inibição do NPBL promovem uma potencialização da ingestão da água e sódio induzidos por diversos protocolos dipsogênicos e/ou natriorexigênicos, sugerindo que o NPBL faz parte de uma via inibitória para a ingestão de água e sódio. Desta forma as projeções do NTS ao NPBL que também se projeta ao prosencéfalo, ou mesmo do NTS diretamente ao prosencéfalo envolvidas no controle da ingestão de água e sódio, como a região AV3V e PVN^{65,74,119,124} podem constituir o substrato anatômico para os efeitos inibitórios do NTS com na ingestão de água induzida pelo isoproterenol ou pela salina hipertônica¹⁶⁻¹⁸.

Os neurônios catecolaminérgicos do SNC e o neurotransmissor noradrenalina bem como receptores adrenérgicos centrais parecem também ser importantes para o controle da ingestão de água e sódio. Entretanto, vários estudos têm demonstrado que a noradrenalina tem efeitos facilitatórios e inibitórios para ao comportamento ingestivo, sugerindo uma função dupla para este neurotransmissor no controle do equilíbrio hidrossalino^{53,85-86}. Estudos realizados pelo nosso laboratório sugerem que a noradrenalina (ou agonistas adrenérgicos) tem um efeito inibitório sobre a ingestão de água e de sódio⁵³⁻⁵⁴. Por exemplo, a injeção na área pré-óptica lateral de clonidina (agonista α_2 -adrenérgico) reduz a ingestão de água induzida por privação hídrica²⁹; a injeção no hipotálamo lateral desta mesma droga reduz a ingestão de água induzida pela ANGII central⁶². A ingestão de sódio e água induzidos por

privação hídrica, e a ingestão de água induzida por ANGII e carbacol (agonista colinérgico) injetados no ventrículo lateral, também são reduzidas pelo tratamento prévio com moxonidina (agonista α 2-adrenérgico) também injetada no ventrículo lateral¹⁰⁵. A lesão do grupamento A1 potencializa a ingestão de sódio induzida pela administração simultânea de furosemida e dose baixa de captopril e pela privação hídrica⁴⁰, sugerindo um papel inibitório das vias adrenérgicas do grupamento A1 na ingestão de sódio induzida por protocolos experimentais que aumentem a concentração plasmática de ANG II e/ou causem hipotensão.

Entretanto, outro conjunto de resultados obtidos pelo laboratório do Professor Dr. Alan Kim Johnson⁸⁵⁻⁸⁶, demonstraram que terminais noradrenérgicos centrais são excitatórios para ingestão de água induzida por angiotensina II (ANGII). Foi demonstrado que a injeção central de 6-hidroxidopamina (6-OHDA; toxina que destrói terminais catecolaminérgicos) promove redução da ingestão de água induzida pela injeção central de ANGII¹¹⁻¹². Se nestes animais for feita uma infusão de noradrenalina, ocorre o restabelecimento da ingestão de água à ANGII⁴⁷. Segundo⁸⁶, as vias ascendentes catecolaminérgicas bulbares, provavelmente oriundas de A1 e A2, seriam importantes para modular a resposta dipsogênica da ANGII frente a situações de hipovolemia/hemorragia, situações estas em que a concentração plasmática de ANGII está elevada. Apesar dessas contradições, o papel dos neurônios A2 do NTScom na regulação da ingestão de água ainda não são conhecidas. Uma vez que a ingestão de água induzida por estímulo osmótico com NaCl 2 M em ratos com lesão eletrolítica do NTScom é potencializada, seria interessante estudar a participação dos neurônios A2 do NTScom nessas respostas.

NTS/NEURÔNIOS A2 E REGULAÇÃO CARDIOVASCULAR

Enquanto que poucos estudos mostram a participação do NTS no controle da ingestão de água e sódio, a participação NTSi e NTScom na regulação cardiovascular têm sido bem descrita^{43,97}. Embora o NTSi e o NTScom sejam adjacentes, eles têm uma função diferencial nos ajustes dos reflexos cardiovasculares. Enquanto que a lesão eletrolítica do NTScom promove um bloqueio do quimiorreflexo, mas não do barorreflexo^{42,127}, a lesão eletrolítica do NTSi promove um bloqueio do barorreflexo^{129,133}. Ademais, a lesão do NTScom não altera a pressão arterial basal^{42,127}, diferente da lesão do NTSi que promove hipertensão fulminante¹⁰⁶, caso os animais não sejam previamente tratados com bloqueador ganglionar e com antagonista de vasopressina^{129,133}. O papel dos neurônios noradrenérgicos A2, localizados no

NTS, na regulação cardiovascular tem sido demonstrada por diferentes estudos, contudo os resultados são ainda um pouco controversos dependendo do local de lesão ou estimulação do NTS^{18,42,56,137,144}. Lesões eletrolítica¹⁴⁴ ou química com 6-hidroxidopamina¹³⁷ dos neurônios A2 do NTS (do intermediário ao comissural) causaram labilidade na pressão arterial. Duale et al.⁵⁶ mostraram que a transfecção gênica com lentivírus que promove inserção de canais retificadores de potássio nos neurônios A2 do NTSi e NTScm foi também capaz de promover labilidade da pressão arterial, no período de 3 a 7 dias após a transfecção. Em contraste, lesões específicas do NTScm, que compreendem a grande parte de neurônios A2⁴⁸, não produziu labilidade da pressão arterial^{18,42,126}.

A participação facilitatória ou inibitória do NTS na secreção de vasopressina também tem sido demonstrada^{51,93}. Foi verificado que a injeção no NTSi de muscimol, agonista gabaérgico, promovia aumento da pressão arterial que era em parte decorrente da secreção de vasopressina⁹³. Sato et al.¹²⁷ demonstraram que a lesão eletrolítica do NTScm potencializava a resposta pressora da oclusão bilateral das carótidas comuns em parte por aumentar a secreção de vasopressina nestes ratos, bem como animais com lesão do NTScm apresentaram resposta pressora frente a sobrecarga ig de NaCl 2 M¹⁹⁻²⁰ que foi ocasionada por uma potencialização da secreção de vasopressina em relação aos animais controle. Portanto, esses trabalhos sugerem que o NTS, seja o intermediário ou comissural, estão inibindo a secreção de vasopressina, pois uma vez inativado/lesado ocorreu uma maior secreção de vasopressina. Entretanto, outros estudos demonstraram que a estimulação elétrica do NTScm induzia secreção de vasopressina⁵¹, sugerindo um papel facilitatório do NTS na secreção de vasopressina. Por outro lado, a lesão do NTSi não foi capaz de alterar a secreção de vasopressina induzida por hemorragia¹³², sugerindo que o NTS não tem nenhuma participação na secreção de vasopressina em situações de hipovolemia/hipotensão. Esta diversidade de resultados pode ser devido a uma série de fatores, tais como, sítio de lesão ou inibição no NTS, experimentos com ratos acordados e anestesiados, lesão eletrolítica que lesa inespecificamente corpos celulares e fibras de passagem e estimulação elétrica que também não discrimina o que está sendo estimulado (corpos celulares ou fibras de passagem).

Quail et al.¹¹⁸ demonstraram que com a progressão da perda de sangue e então diminuição da pressão arterial ocorre um aumento inversamente proporcional da atividade da renina plasmática e após a perda de aproximadamente 25% da quantidade de sangue há um grande aumento na secreção de vasopressina, e este aumento na secreção de vasopressina é devido a informações que ascendem ao SNC derivados dos receptores cardíacos, que ascendem ao NTS⁵⁵. A lesão do DNAB que compreende axônios de neurônios do locus

coeruleus e alguns axônios de neurônios A1 provenientes do feixe noradrenérgico ventral (VNAB)¹²⁸ causa um aumento na atividade de renina plasmática após hemorragia não hipotensiva sem alterar a expressão da proteína c-FOS no PVN e SON, áreas responsáveis pela liberação de vasopressina. Desta forma, a participação dos neurônios A2 do NTScom na secreção de vasopressina seja por estímulos osmóticos ou por redução de volume circulante, assim como a participação de mecanismos dependentes do sistema renina-angiotensina ainda não estão bem estudados.

Assim sendo, por meio da lesão específica dos neurônios A2 no NTScom, os quais se projetam para as áreas hipotalâmicas, foi nosso objetivo verificar a participação desse conjunto de neurônios nos ajustes cardiovasculares, renais e na ingestão de água em situação de hiperosmolaridade, bem como a participação desses neurônios sobre as respostas hipotensora e de recuperação da hipotensão causadas pela hemorragia.

OBJETIVOS

- Estudar os efeitos na pressão arterial, na expressão da proteína c-FOS, na ingestão de água e na excreção renal subsequentes a administração de NaCl 2 M em ratos com lesão seletiva dos neurônios A2 do NTScom;
- Estudar as alterações genômicas que ocorrem no NTS após a administração de NaCl 2 M;
- Estudar os efeitos na hipotensão e na recuperação da hipotensão causada por hemorragia em ratos com lesão seletiva dos neurônios A2 do NTScom.

MATERIAL E MÉTODO

1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Holtzman machos, 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 em uma sala com ciclo claro escuro 12:12 horas (luzes acesas das 7:00 a 19:00), com temperatura ($23 \pm 3^\circ \text{C}$) e humidade ($55 \pm 10\%$) 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 (Proc. CEEA 09/2007).

Foram também utilizados ratos Sprague-Dawley, pesando de 230 – 280 g, adquiridos da empresa Charles River (Wilmington, MA, EUA). Os animais, em duplas, foram mantidos em gaiolas livres de patógenos específicos (SPF) em uma sala com ciclo claro escuro 12:12 horas, temperatura ($23 \pm 3^\circ \text{C}$) e humidade ($55 \pm 10\%$) controladas, com água e ração granulada ad libitum. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Uso e Cuidado Animal (IACUC) da Universidade da Flórida (número de protocolo 200801275).

2 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E DA FREQUÊNCIA CARDÍACA

Para o registro direto da pressão arterial (PA) foram utilizados tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50. Os cateteres para o registro da PA foram inseridos na aorta abdominal, através da artéria femoral. Os cateteres, para registro de PA foram conectados a um transdutor de pressão acoplado a um amplificador (ETH-200 CB SCIENCES INC) e a um sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab, ADInstruments). Foi registrada simultaneamente a pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC). A PAM foi calculada a partir do sinal de PA. A FC foi calculada como a frequência instantânea do sinal de PA.

3 INJEÇÕES DE DROGAS

Para injeção de drogas por via intravenosa (iv) foram utilizados tubos de polietileno PE-10 soldados a tubos de polietileno PE-50. Os cateteres foram preenchidos com solução de salina isotônica e inseridos na veia cava inferior, através da veia femoral.

4 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.

5 DOSAGEM URINÁRIA

Os animais foram transferidos de suas gaiolas e colocados em gaiolas metabólicas. A urina foi coletada por gravidade em tubos graduados em 0,1 ml. As amostras de urina foram analisadas em um analisador de Na^+/K^+ (NOVA 1, Nova Biomedical). A excreção total de Na^+ e K^+ foi calculada como concentração de Na^+ e K^+ multiplicado pelo volume urinário.

6 LESÃO DO GRUPAMENTO CATECOLAMINÉRGICO A2 DO NTS_{com}

Os animais foram submetidos à lesão do grupamento A2 do NTS comissural pela imunotoxina anti-DBH-saporina. Esta imunotoxina consiste em um anticorpo à dopamina β -hydroxilase (D β H), enzima que converte a dopamina em noradrenalina, conjugado com uma toxina, saporina. A enzima D β H está associada com a membrana interna das vesículas, e, portanto, é exposta extracelularmente durante o processo de exocitose na liberação do neurotransmissor. Esta exposição permite que a porção do anticorpo da imunotoxina se ligue à D β H. Após a reciclagem vesicular por endocitose, a anti-D β H-saporina é levada para dentro do neurônio. Uma vez dentro do neurônio, a saporina inativa a subunidade 60s dos ribossomos, desta forma bloqueando a síntese celular, e causando morte celular¹³⁹. Embora esta imunotoxina seja captada por terminações neuronais (que expõe a D β H), estudos⁹⁸ demonstraram que quando esta imunotoxina foi injetada nas região catecolaminérgica C1 do bulbo rostroventrolateral também ocorreu uma captação somatodendrítica. Estes autores também demonstraram que esta neurotoxina lesou somente neurônios do grupamento C1,

deixando as outras células do RVL intactas. É importante salientar que a injeção apenas de saporina no SNC não promove nenhuma destruição neuronal^{21,98,156}. As lesões dos neurônios catecolaminérgicos pela anti-DβH-saporina ocorrem após 10 dias das injeções^{40,98,113,156}.

Uma vez anestesiados com 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) administradas intraperitonealmente os animais foram fixados em um aparelho estereotáxico para pequenos animais (David Kopf Instruments). A barra incisora foi posicionada 11 mm abaixo da linha interaural. A musculatura do pescoço foi cuidadosamente rebatida expondo o occipital e a membrana atlanto-occipital. Após a separação entre a dura-mater e o osso occipital, este foi removido utilizando-se um osteótomo. A membrana atlanto-occipital foi aberta e a dura-mater rebatida, expondo assim o *calamus scriptorius* que foi utilizado como ponto de referência para as coordenadas estereotáxicas.

As microinjeções da toxina anti-DβH-saporina (lesão A2, 12,6 ng/60 nl) ou anti-IgG-saporina (lesão fictícia, 12,6 ng/60 nl) no grupamento A2 foram feitas utilizando-se uma pipeta de vidro (d.i. = 1 mm), que foram estiradas e as pontas ajustadas a um diâmetro final entre 30 e 50 μm. As pipetas de vidro foram conectadas a um sistema de microinjeção Picospritzer. As injeções no grupamento A2 ao nível do NTS comissural foram à linha média, sempre em um volume de 60 nl. As coordenadas foram obtidas e modificadas a partir do atlas de¹¹², sendo as injeções feitas na linha média 0,5 e 0 mm caudal ao *calamus scriptorius* e 0,5 mm ventral à superfície dorsal do bulbo.

Após as injeções, a musculatura da nuca e a pele foram suturadas, e os animais receberam uma dose profilática de pentabiótico veterinário (benzilpenicilina 80000 IUs + streptomina 33 mg, intramuscular, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, SP, Brasil) e de anti-inflamatório cetoprofeno (ketoprofeno 1%, 1 mg/kg de peso corporal, Mundo Animal, São Paulo, SP, Brasil) por animal. Os experimentos foram realizados entre 20 a 30 dias após as lesões.

7 IMPLANTE DE CÂNULAS NO VENTRÍCULO LATERAL (VL)

Sete dias antes dos experimentos os animais foram submetidos a anestesia com 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) administradas intraperitonealmente os animais foram fixados em um aparelho estereotáxico para pequenos animais (David Kopf Instruments). Então o crânio foi nivelado utilizando o bregma e lambda como referência. Uma cânula de aço inoxidável (10 mm comprimento x 0,7 mm diâmetro interno) foi implantada no VL usando as coordenadas 0,3 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral a linha média e 3,6 mm abaixo da superfície do crânio. A cânula foi fixada no crânio utilizando parafusos e resina acrílica. Uma dose profilática de pentabiótico veterinário (benzilpenicilina 80000 IUs + streptomina 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) foi administrada intramuscularmente em todos os animais.

8 MICROINJEÇÃO NO VL

As injeções no VL foram feitas sempre em um volume de 1 µl, com auxílio de uma seringa Hamilton (5µl) conectada a um tubo de polietileno PE-10 e à uma agulha injetora (0,3 mm diâmetro, 2 mm mais longa que a cânula guia).

9 HISTOLOGIA E IMUNOISTOQUÍMICA

9.1 Técnica de histologia

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados profundamente, o coração foi exposto cirurgicamente e por meio de uma bomba de perfusão foi realizada inicialmente uma perfusão com PBS 0,1 M (300 ml/8 min), seguido de solução de paraformaldeído a 4% em PBS 0,1 M (500 ml/12 min). A seguir os cérebros foram retirados e fixados no mesmo fixador por 1 h, e depois ficaram imersos em uma solução de sacarose a 20% até o momento de serem processados (não mais que 15 dias). Posteriormente os cérebros foram seccionados em cortes coronais de 40 µm de espessura em um micrótomo de congelamento.

9.2 Verificação do posicionamento da cânula no VL

Para verificarmos a correta localização das microinjeções realizadas em alguns experimentos, os cortes do prosencéfalo tratados pelo método de Giemsa foram analisados

em microscopia de luz, não sendo utilizados os resultados dos animais em que as injeções ficassem fora do VL.

9.3 Imunohistoquímica para detecção de tirosina hidroxilase

A tirosina-hidroxilase (TH) é a primeira enzima necessária para a formação das catecolaminas dopamina, noradrenalina e adrenalina. Desta forma, a detecção imunohistoquímica da TH foi utilizada para marcação de células noradrenérgicas do grupamento A2. Para verificarmos a extensão da lesão dos neurônios A2 pela toxina anti-D β H-saporina, seções de cortes coronais seriados de 40 μ m a cada 160 μ m do tronco cerebral, extendendo-se do bulbo até a ponte (região do Locus Cereulus), foram lavados com KPBS 0,02 M por 30 min para remover possíveis impurezas do processo de corte por congelamento. Os cortes foram separados em 4 lotes. Em um dos lotes, foi feito o bloqueio das peroxidases endógenas incubando-se os cortes com H₂O₂ 1% por 15 min, seguido de 45 min de lavagem no KPBS 0,02 M. Na sequência, os cortes foram incubados com soro normal de cavalo por 30 min para bloquear as ligações inespecíficas, e novamente lavados com KPBS 0,02 M por 45 min. Feito isso, os cortes foram processados para a presença da enzima tirosina hidroxilase (TH). Os cortes selecionados foram incubados sequencialmente em soluções contendo: **a**) anticorpo primário (anti-TH, originado em camundongo, Immunostar, Inc., Hudson, WI, EUA) 1:2000 por 18 h à 4°C; **b**) anticorpo secundário biotilado (anti-camundongo, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) 1:200 por 1 h; **c**) reagente ABC (complexo avidina-biotina, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) 1:100 por 1h; **d**) diaminobenzidina (DAB) 0,05% por 10 min, seguido de H₂O₂ 0,03%. Entre as etapas **a** e **d**, após cada incubação os cortes foram lavados em tampão KPBS 0,02 M por 1 h. As etapas **b** e **d** foram realizadas à temperatura ambiente. Ao final do processamento imunohistoquímico os cortes foram montados em lâminas de vidro, desidratados com álcool, diafanados com xilol e cobertos com resina histológica DPX, para posterior análise histológica.

9.4 Imunohistoquímica para detecção de c-FOS e dupla marcação para c-Fos/vasopressina ou c-Fos/ocitocina.

Para verificação da ativação neuronal nos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo, seções de 30 µm a cada 150 µm foram lavados em PBS 0,1 M e processados imunohistoquimicamente para detecção de c-FOS. Os cortes foram pré-incubados por 10 minutos em peróxido de hidrogênio 3% em PBS 0,1 M seguido pela incubação por 15 minutos em uma solução de bloqueio contendo 10% de soro normal de ovelha (NGS, Sigma, St.Louis, MO, EUA) na Triton-X 0,3% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em PBS 0,1 M. Os cortes foram então incubados em anticorpo polyclonal anti c-FOS feito em coelho (Ab-5 – 1:20.000, Calbiochem, San Diego, CA, EUA) em PBS contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3% por 48 horas a 4°C, seguido por uma hora de incubação com anti-IgG de coelho biotilado feito em ovelha (1:500; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3%. Após essas incubações, para amplificação do sinal resultante da marcação antígeno-anticorpo, os cortes foram incubados por mais uma hora com HRP streptavidina (1:500, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA) em PBS contendo 1% de NGS e Triton-X 0,3%. DAB foi usado para reação com a peroxidase produzindo uma coloração marrom do núcleo celular. Entre cada passo, os cortes foram lavados 3 x 10 minutos com PBS 0,1 M. Ao final do processamento imunohistoquímico os cortes foram montados em lâminas de vidro, desidratados com álcool, diafanados com xilol e cobertos com resina histológica DPX, para posterior análise histológica.

Em outros dois conjuntos de seções do hipotálamo, após incubação com solução de bloqueio 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, EUA) 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, EUA)^{13,69,155}. 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-IgG de 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-IgG de camundongo feito em cabra (ambos 1:500, Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). 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 solução para montagem antidesaparecimento da fluorescência (VectorShield, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, EUA), 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, Alemanha) utilizando o filtro apropriado, em seções semelhantes, representativas dos diferentes grupos.

10 CONTAGEM CELULAR

A contagem de neurônios marcados foi feita em cada seção de quatro (40 a cada 160 μm). Todas as células do bulbo ventrolateral (VLM; A1/C1) e NTS (A2/C2) foram contadas bilateralmente a fim de quantificar a extensão da lesão causada pela anti-D β H-saporina. As células c-FOS positivas 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 (PVNm) e parvocelular (PVNp). Os neurônios foram contados em microscópio de luz (Nikon) com uma magnificação de 200x.

11 ANÁLISE DO RNAm por técnica de RT-PCR

Foi feita a análise do RNA mensageiro pela técnica de RT-PCR onde, os animais foram decapitados e o tronco encefálico rapidamente removido e o NTS foi removido com auxílio de um microscópio cirúrgico e colocado em uma solução contendo tampão β ME+RLT (200 μL), onde o tampão contém β -mercaptanol (10 μL) e RLT (1 mL). O tecido foi homogeneizado com auxílio de um micro motor e mantido a 4°C. Foi extraído o RNAm utilizando-se o kit para extração de RNA (Qiagen, Germantown, MD, EUA). O RNAm foi então convertido em cDNA utilizando o método de reação de transcriptase reversa em tempo real utilizando o kit iScript (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). O cDNA foi então utilizado para quantificação através de sondas específicas (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para os genes que codificam as seguintes proteínas: fator inibitório da migração de macrófagos (MIF), receptores AT1 da ANGII (AT1r), isoforma da proteína glutamato descaboxilase

(GAD₆₇)vesícula transportadora de glutamato (VGLUT₂), dopamina-β-hidroxilase (DβH) e 18s (gene reporter). As reações de amplificação foram realizadas em 45 ciclos e as sequências alvo foram detectadas em tempo real pela emissão de fluorescência, que ocorre quando existe formação de dupla fita na região codificada pelo par de iniciadores utilizando aparelho e software ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os dados foram normalizados pela quantidade de cDNA da proteína 18s.

12 SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- NaCl 0,15 M
- NaCl 2 M
- Anti-DβH-saporina (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, EUA)
- Anti-IgG-saporina (Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, EUA)
- Fenilefrina (agonista adrenérgico – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Nitroprussiato de sódio (NPS – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Cianeto de potássio (KCN- Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Fenilbiguanida (agonista serotoninérgico 5-HT₃ – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Composto de Manning (antagonista de receptores V1 da vasopressina - [β-Mercapto-β,β-Cyclopentamethylenepropionyl¹, O-Me-Tyr², Arg⁸]-Vasopressina) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Vasopressina ([Arg⁸]-Vasopressina)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA)
- Losartan (antagonista AT1 de ANGII)

13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram expressos como média ± 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 $p < 0,05$.

PARTE I:

ESTÍMULO OSMÓTICO E LESÃO DO GRUPAMENTO A2 **DO NTScm**

O NTScm é importante para a regulação cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico frente a estímulos osmóticos. Nosso objetivo na primeira parte da tese foi verificar a participação dos neurônios A2 do NTScm em respostas cardiovasculares e do balanço hidroeletrolítico após a hiperosmolaridade e os mecanismos efetores das respostas observadas. Procuramos também investigar quais as alterações da expressão gênica que ocorrem no NTS após o estímulo osmótico.

PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS PARTE I

1 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTS com nos ajustes cardiovasculares induzidos pela gavagem de NaCl 2 M: participação da vasopressina .

Em todos os animais, no dia anterior ao experimento, os animais previamente submetidos à lesão química do grupamento catecolaminérgico A2, ou lesão fictícia (LF), foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) para a cateterização da artéria femoral, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), e veia femoral para infusão de drogas.

No dia seguinte à cateterização, em animais não anestesiados, após um período basal de registro (20 min), o barorreflexo foi testado com uma dose pressora de fenilefrina (2,5 µg/kg de peso corporal, iv) e com uma dose hipotensora de nitroprussiato de sódio (30 µg/kg de peso corporal, iv); o quimiorreflexo foi testado com uma injeção intravenosa de cianeto de potássio (KCN, 40 µg/rato); foi realizado também a injeção de fenilbiguanida (4 µg/rato) para testar o reflexo cardiopulmonar. O intervalo entre cada teste de reflexo será de pelo menos 5 min. Após os testes reflexos, os animais foram submetidos ao protocolo de aumento agudo da osmolaridade plasmática utilizando a sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico onde após uma hora pode-se observar aumento da concentração de sódio e osmolaridade plasmática sem alterações da concentração das proteínas plasmáticas, indicando que este protocolo é capaz de promover aumento da osmolaridade sem alterar o volume plasmático¹¹⁶. Para esse protocolo os animais receberam uma sobrecarga de NaCl 0,15 M ig (2 ml), e após 60 min, a uma sobrecarga de NaCl 2 M ig (2 ml), e o registro foi realizado por mais 60 min.

Em outro grupo experimental, foi realizado o protocolo experimental de registro de PAM e FC em animais submetidos à sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M pretratados com o antagonista dos receptores V1 de vasopressina (composto de Manning – 10 µg/kg). Os animais foram conectados ao transdutor de pressão e após um período basal de registro, foi injetado iv a vasopressina (12,5 ng/rato), após cinco minutos os animais receberam o composto de Manning ou salina iv, e a eficácia do bloqueio dos receptores V1 da vasopressina foi testada com uma injeção, subsequente ao composto de Manning, de vasopressina e após 75 minutos após o bloqueio. Quinze minutos após o bloqueio dos

receptores V1 da vasopressina, os animais receberam a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M e o registro da PAP, PAM e FC durou mais 60 minutos.

2 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom na expressão da proteína c-FOS nos neurônios do PVN e SON induzida pela gavagem de NaCl 2 M.

Em outro grupo experimental, foi testado o efeito da sobrecarga intragástrica de NaCl 0,15 e 2 M na expressão da proteína c-FOS em neurônios vasopressinérgicos e ocitocinérgicos do PVN e SON. Durante sete dias, os animais receberam gavagens para minimizar o efeito do estresse nas respostas observadas no dia do experimento, onde no primeiro dia foi feita em todos os animais a gavagem com NaCl hipertônico (2 M, 2 ml) e nos 5 dias subsequentes os animais receberam a gavagem de NaCl 0,15 M (2 ml). No dia do experimento, a água e ração foram removidas das gaiolas, e os animais receberam aleatoriamente a sobrecarga de NaCl 0,15 ou 2 M (lesão fictícia, N=4/grupo e lesão A2, N=4/grupo). Duas horas após a gavagem os animais foram profundamente anestesiados, perfundidos e os encéfalos foram retirados e submetidos ao processo de fixação como descrito nos métodos. Então, os encéfalos foram congelados e cortados em criostato em seções de 30 µm do prosencéfalo e coletados em cinco séries (30 µm a cada 150 µm). Os cortes foram coletados em placas de cultura de células com 24 poços contendo PBS 0,1 M antes do processo de imunohistoquímica para detecção da proteína c-FOS e para a dupla marcação de c-FOS e vasopressina/ocitocina. O bulbo destes animais foram cortados em seções de 40 µm e coletados em quatro séries (40µm a cada 160 µm) e processados para imunohistoquímica para detecção da proteína tirosina hidroxilase (TH) como descrito nos métodos.

3 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom na ingestão de água e excreção urinária induzida por gavagem intragástrica de NaCl 2 M.

No dia do experimento, em uma parte dos animais tanto do grupo com lesão nos neurônios A2 do NTScom como nos com lesão fictícia, foi feita a sobrecarga intragástrica de solução hipertônica de cloreto de sódio (NaCl, 2 M; 2 ml) e na outra parte foi feita a sobrecarga intragástrica com solução isotônica de cloreto de sódio (NaCl, 0,15 M; 2 ml) e

após uma hora, foram oferecidas buretas graduadas contendo água para medidas da ingestão de água durante 120 minutos, a cada 30 minutos. Durante o período de 1 h em que os animais não tiveram acesso à água, e durante as duas horas de ingestão de água, foram feitas as coletas de urina.

4 Alteração na expressão gênica no NTS após gavagem com NaCl 2 M.

Em animais intactos, foi realizada a gavagem com 2 ml de NaCl 0,15 M ou NaCl 2 M e após 2 horas os animais foram decapitados e o tronco encefálico rapidamente removido. O NTS foi removido com auxílio de um microscópio cirúrgico, e processado para análise dos genes que traduzem as seguintes proteínas:

- Fator inibitório da migração de macrófagos (MIF)
- Receptores angiotensinérgico do subtipo AT1 (AT1r)
- Isoforma da proteína glutamato descarboxilase (GAD₆₇)
- Vesícula transportadora de glutamato (VGLUT₂)
- Dopamina-β-hidroxilase

RESULTADOS PARTE I

1 Quantificação de neurônios catecolaminérgicos no bulbo em ratos com lesão A2

Já está bem estabelecido que a anti-DBH-saporina destrói neurônios noradrenérgicos no local onde é injetada e em regiões noradrenérgicas que se projetam para o sítio de injeção^{40,98,113}. As células positivas à TH foram encontradas no NTS e no bulbo ventrolateral aproximadamente 2 mm caudal a 2 mm rostral ao obex (figuras 3 e 4). O tratamento com anti-DBH-saporina (lesão A2, N= 56) foi capaz de reduzir o número de células positivas à TH quando comparado aos animais que receberam injeção de anti-IgG-saporina (LF, N = 45) no NTScom. A região onde houve perda celular se estende 1,3 mm caudal a 0,3 mm rostral ao óbex, que engloba os neurônios A2 da região do NTScom e uma pequena porção dos neurônios A2 da região do NTS subpostremal. O número de células positivas a TH nesta região foi reduzida em média 76% (variando entre 61 – 85%) [$F(42,1107)=60,638$; $p<0.05$]. As injeções não foram capazes de destruir neurônios catecolaminérgicos na superfície ventral do bulbo (figuras 3 e 4).

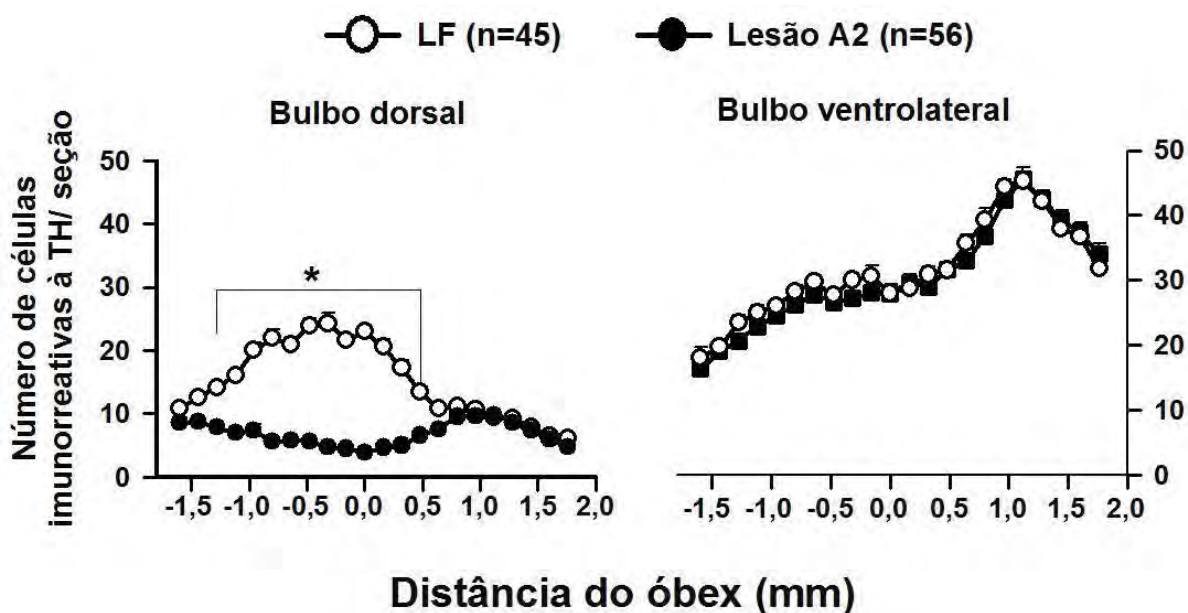


FIGURA 3 – Número (média ± EPM) de células positivas para TH em seções de 40 µm de espessura da região dorsal e ventral do bulbo. Microinjeções de anti-DβH-saporina (lesão A2) ou anti-IgG-saporina (LF) no NTScom. *diferente de LF (One Way ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Número de animais entre parênteses.

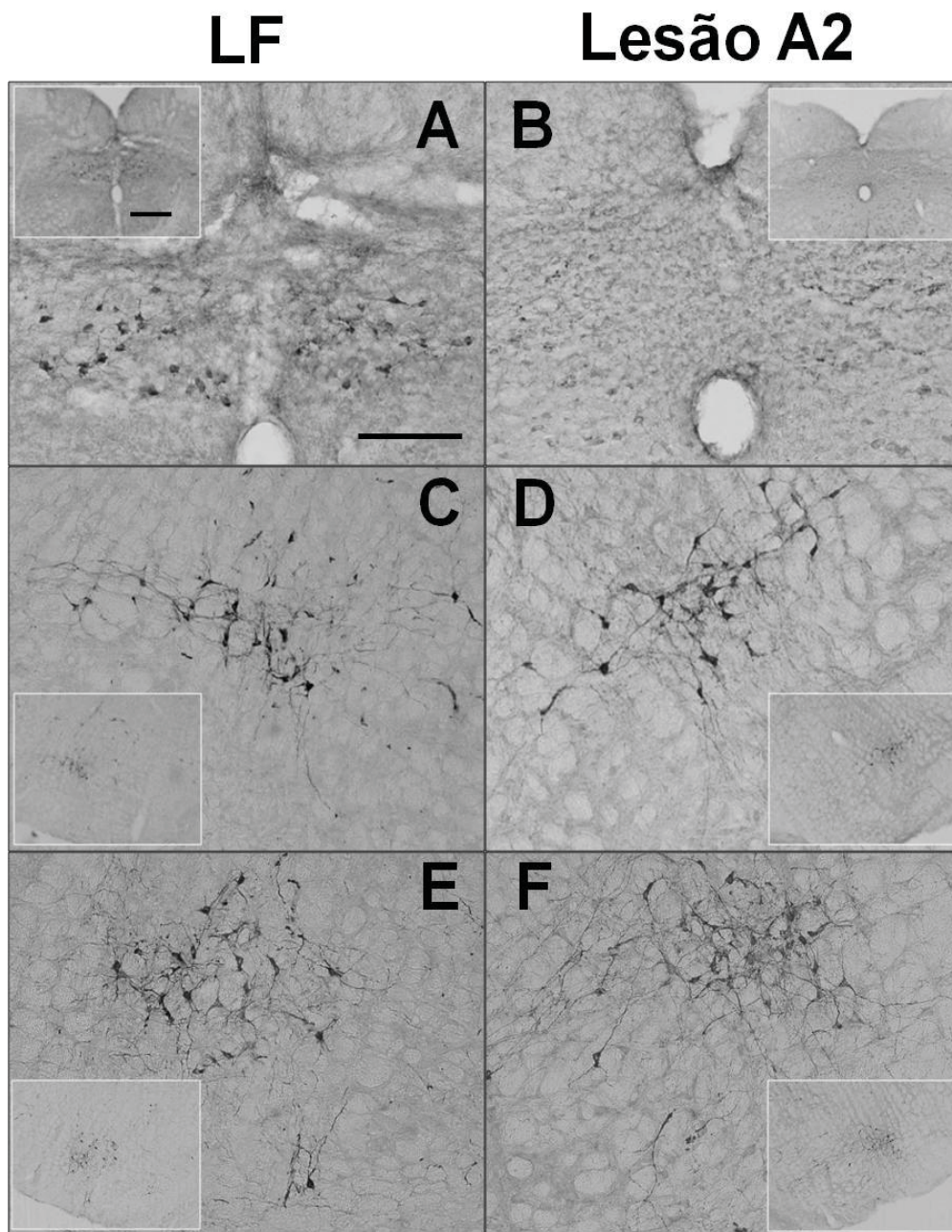


FIGURA 4 – Fotomicrografia de três níveis do bulbo (640 μm caudal, óbex e 640 μm rostral ao óbex) mostrando células imunoreativas à tirosina hidroxilase (TH) no NTScom (area A2; A e B), CVL (area A1; C e D) e RVL (area C1; E e F) de ratos que receberam microinjeção de anti-D β H-saporina (Lesão A2) ou anti-IgG-saporina (LF) no NTScom. Escala = 200 μm .

2 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTS com nos ajustes cardiovasculares induzidos pela gavagem de NaCl 2 M: participação da vasopressina

Podemos observar na tabela 1 que a lesão dos neurônios bulbares A2 não altera os valores basais de PAM e FC quando comparado com os animais do grupo lesão fictícia.

As lesões A2 não produziram alterações na bradicardia ou na taquicardia reflexa induzidas respectivamente pela fenilefrina e nitroprussiato de sódio (tabela 1), tampouco alteraram a resposta pressora e bradicárdica do quimiorreflexo induzida pela administração de KCN iv ou a resposta hipotensora e bradicárdica da fenilbiguanida (tabela 1).

A gavagem de NaCl 2 M não altera PAM no grupo lesão fictícia ($\Delta 3 \pm 2$ mmHg vs. 0,15 M $\Delta -7 \pm 2$ mmHg), mas no grupo lesão A2 a gavagem de NaCl 2 M causou um aumento na PAM ($\Delta 15 \pm 4$ mmHg vs. 0,15 M $\Delta -0,7 \pm 2$ mmHg) [$F(1,168) = 38,550$] a partir de 10 minutos após a gavagem que persistiu por todo período experimental (lesão A2: $\Delta 16 \pm 3$ mmHg VS lesão fictícia: $\Delta 2 \pm 2$ mmHg aos 60 min) como podemos observar na figura 5A.

A frequência cardíaca após a gavagem de NaCl 2 M não apresentou grandes alterações nos grupos lesão fictícia e lesão A2 apesar de ser muito variável, devido aos animais estarem com livre movimentação, como podemos observar na figura 5B [$F(1,168) = 23,314$].

Tabela 1 – Valores basais e variação (Δ) na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) após fenilefrina (2,5 μ g/kg peso corporal; iv), nitroprussiato de sódio (NPS, 30 μ g/kg peso corporal; iv), cianeto de potássio (KCN, 40 μ g/rato) e fenilbiguanida (4 μ g/rato) em animais LF e lesão A2

	LF (N = 5)		Lesão A2 (N = 9)	
	PAM (mmHg)	FC (bpm)	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Basal	110 \pm 3	341 \pm 12	117 \pm 4	381 \pm 26
Fenilefrina	Δ 61 \pm 3	Δ -93 \pm 20	Δ 62 \pm 2	Δ -112 \pm 16
NPS	Δ -36 \pm 4	Δ 106 \pm 9	Δ -34 \pm 2	Δ 92 \pm 7
KCN	Δ 64 \pm 9	Δ - 171 \pm 29	Δ 63 \pm 4	Δ -166 \pm 14
Fenilbiguanida	Δ -48 \pm 9	Δ - 204 \pm 22	Δ -44 \pm 3	Δ -247 \pm 37

Os resultados estão representados como média \pm EPM. N = número de animais.

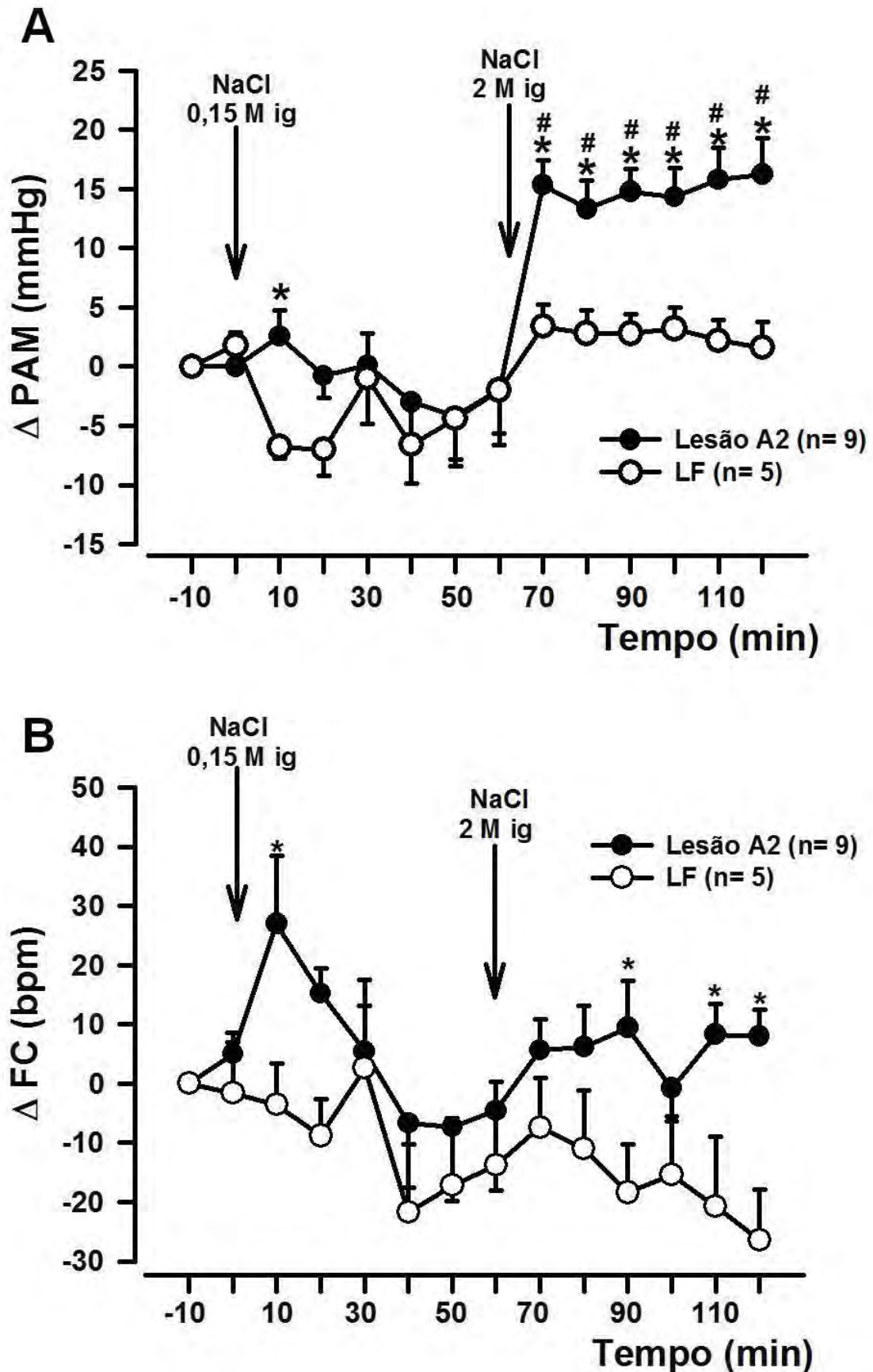


FIGURA 5 – Alterações na (A) pressão arterial media (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão A2 e lesão fictícia (LF) após gavagem intragástrica de NaCl 0,15 M NaCl e NaCl 2 M (2 ml, setas). * diferente de LF; # diferente do basal (-10 minutos); (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais está indicado entre parênteses.

Em outro grupo de animais com lesão A2, a resposta pressora induzida por NaCl 2 M ig foi bloqueada quando os animais foram pré-tratados com o antagonista de receptores V1 da vasopressina ($\Delta 3 \pm 2$ vs. lesão A2 + salina iv: 16 ± 2 mmHg, 10 min após NaCl 2 M ig), [$F(3,208)=20.991$; $p<0.05$], (Figuras 6 e 7A). Não houve alteração na PAM nos ratos sham submetidos a gavagem com NaCl 2 M pré-tratados ou não com antagonista de receptores V1 da vasopressina ($\Delta 4 \pm 3$ mmHg vs. sham + salina iv: 9 ± 3 mmHg), (Figuras 6 e 7A). A frequência cardíaca foi muito variável e não foram encontradas alterações significantes ao longo do período experimental (Figuras 6 e 7B). A eficácia do bloqueio dos receptores V1 durante todo o período experimental pode ser verificado na Tabela 2. A injeção prévia intravenosa (iv) do antagonista de receptores V1 da vasopressina, não altera a PAM nos grupos lesão fictícia e lesão A2, mas foi eficaz em inibir a resposta pressora da vasopressina iv antes do experimento e após 60 minutos da gavagem com NaCl (tabela 2), mostrando que durante todo o protocolo experimental os receptores V1 de vasopressina estavam bloqueados.

Tabela 2 – Alterações da pressão arterial média após injeção intravenosa de vasopressina (AVP – 12,5 ng/rato) antes e após 5 e 75 minutos após o antagonista V1 da vasopressina (Manning compound, V1 ant – 10 μ g/kg) em ratos LF e lesão A2

Grupo	N	AVP	V1 ant	AVP 5'	AVP 75'
<i>LF</i>	8	13 ± 2	0 ± 2	-1 ± 2	0 ± 2
<i>Lesão A2</i>	10	14 ± 3	-3 ± 1	0 ± 2	2 ± 2

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

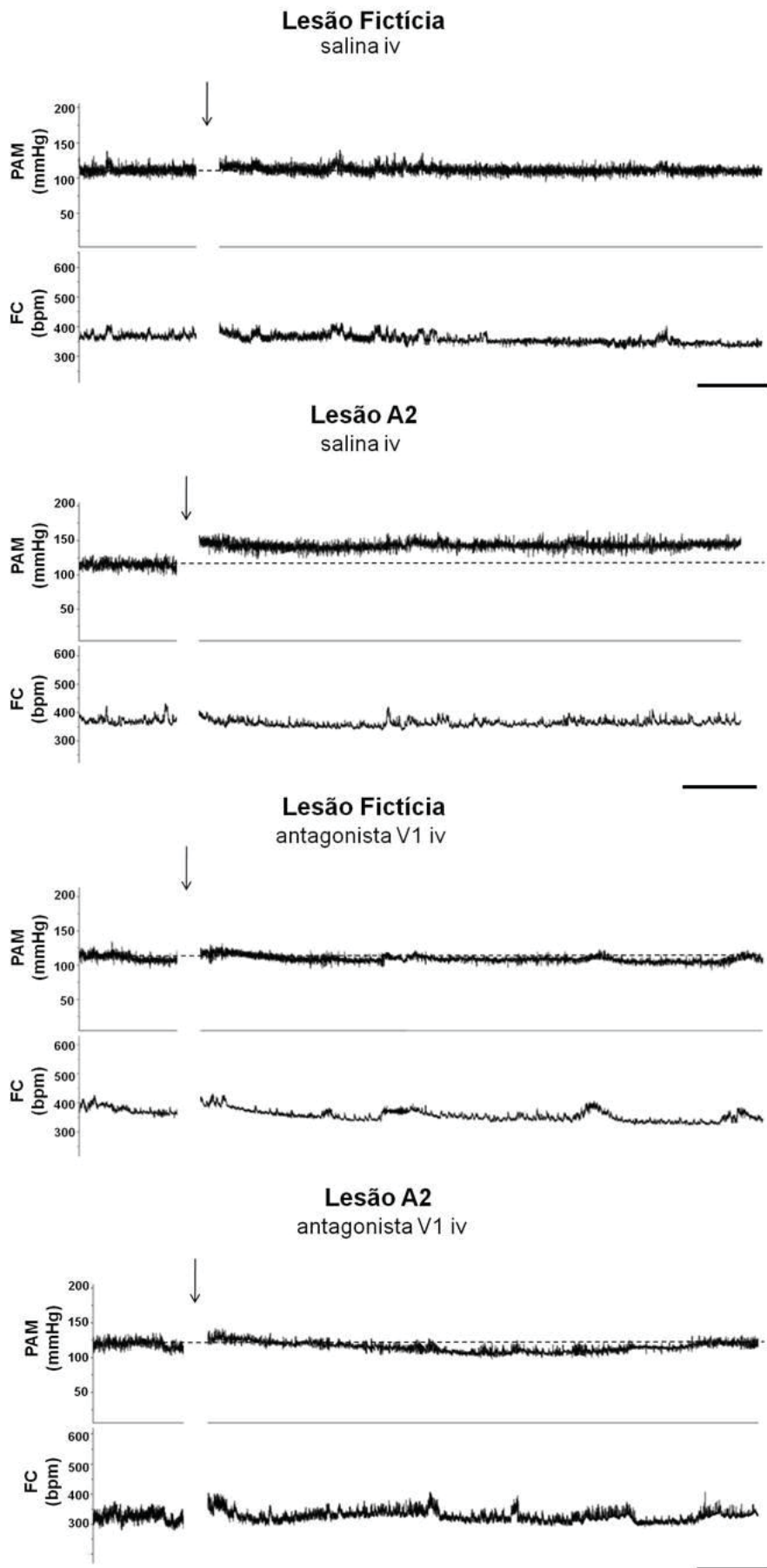


FIGURA 6 – Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos lesão fictícia e lesão A2 que receberam injeções intravenosas de salina (NaCl 0,15 M; 1 ml/kg) ou antagonista de receptores V1 da vasopressina (composto de Manning, 10 µg/kg peso corporal) antes da gavagem de NaCl 2 M (2 ml). Setas indicam o momento da gavagem. Escala = 10 minutos.

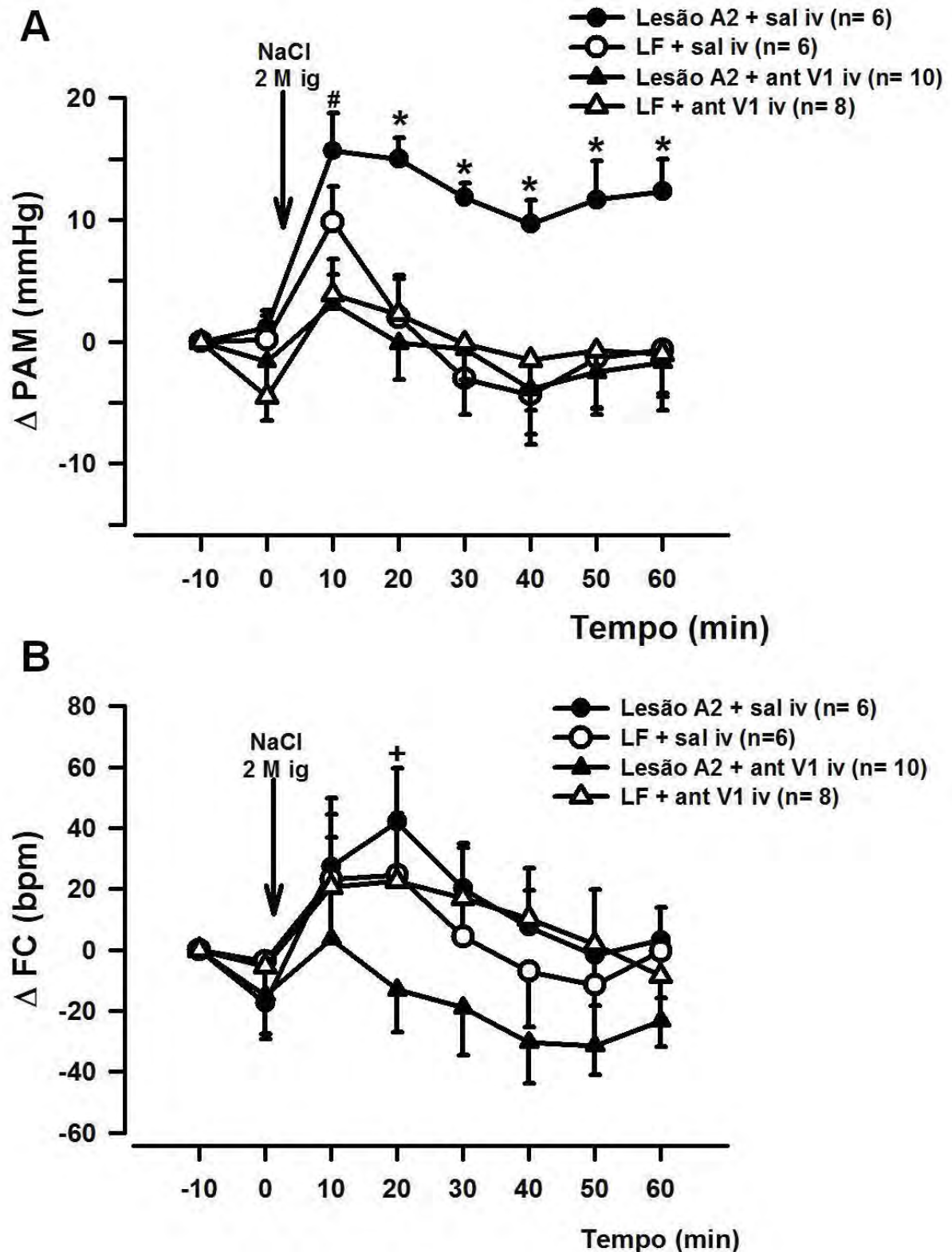


FIGURA 7 – Alterações na (A) pressão arterial média (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão A2 e lesão fictícia (LF) pré-tratados com antagonista de receptores V1 da vasopressina (composto de Manning, 10 μ g/kg peso corporal, iv) ou salina (NaCl 0,15 M; 1 ml/kg, iv) após NaCl 2 M intragástrico (2 ml; seta). * diferente do basal (-10 minutos); † diferente dos grupos LF; # diferente de lesão A2 + antagonista V1 (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Os resultados estão representados como média \pm EPM. O número de animais está indicado entre parênteses.

3 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom na expressão da proteína c-FOS induzida pela gavagem de NaCl 2 M.

A gavagem de NaCl 2 M promoveu aumento da proteína c-FOS, indicando ativação neuronal na porção magnocelular do PVN (PVNm), parvocelular do PVN (PVNp) e SON tanto no grupo lesão fictícia quanto lesão A2. Contudo, o número de células positivas no PVNm foi maior após a sobrecarga de NaCl 2 M no grupo lesão A2 (90 ± 13 células por seção a cada $150 \mu\text{m}$) quando comparado com o grupo lesão fictícia (47 ± 20 células por seção a cada $150 \mu\text{m}$) [$F(3,10)=8.691$; $p<0.05$] (figuras 8C e D e 9). O tratamento com NaCl 2 M causou um aumento similar no número de células positivas no PVNp e SON nos grupos lesão A2 (37 ± 6 e 88 ± 7 células por seção a cada $150 \mu\text{m}$, respectivamente) e lesão fictícia (22 ± 9 e 105 ± 27 células por seção a cada $150 \mu\text{m}$, respectivamente), (figuras 8 e 9). A figura 9 e 10 mostram a marcação para a proteína c-FOS (verde) em neurônios vasopressinérgicos (vermelho) e ocitocinérgicos (vermelho) respectivamente, do PVN e SON em animais que receberam a gavagem de NaCl 0,15 M e NaCl 2 M, mostrando que as células do PVN e SON ativadas pela gavagem de NaCl 2 M estão co-localizadas em neurônios vasopressinérgicos ou ocitocinérgicos.

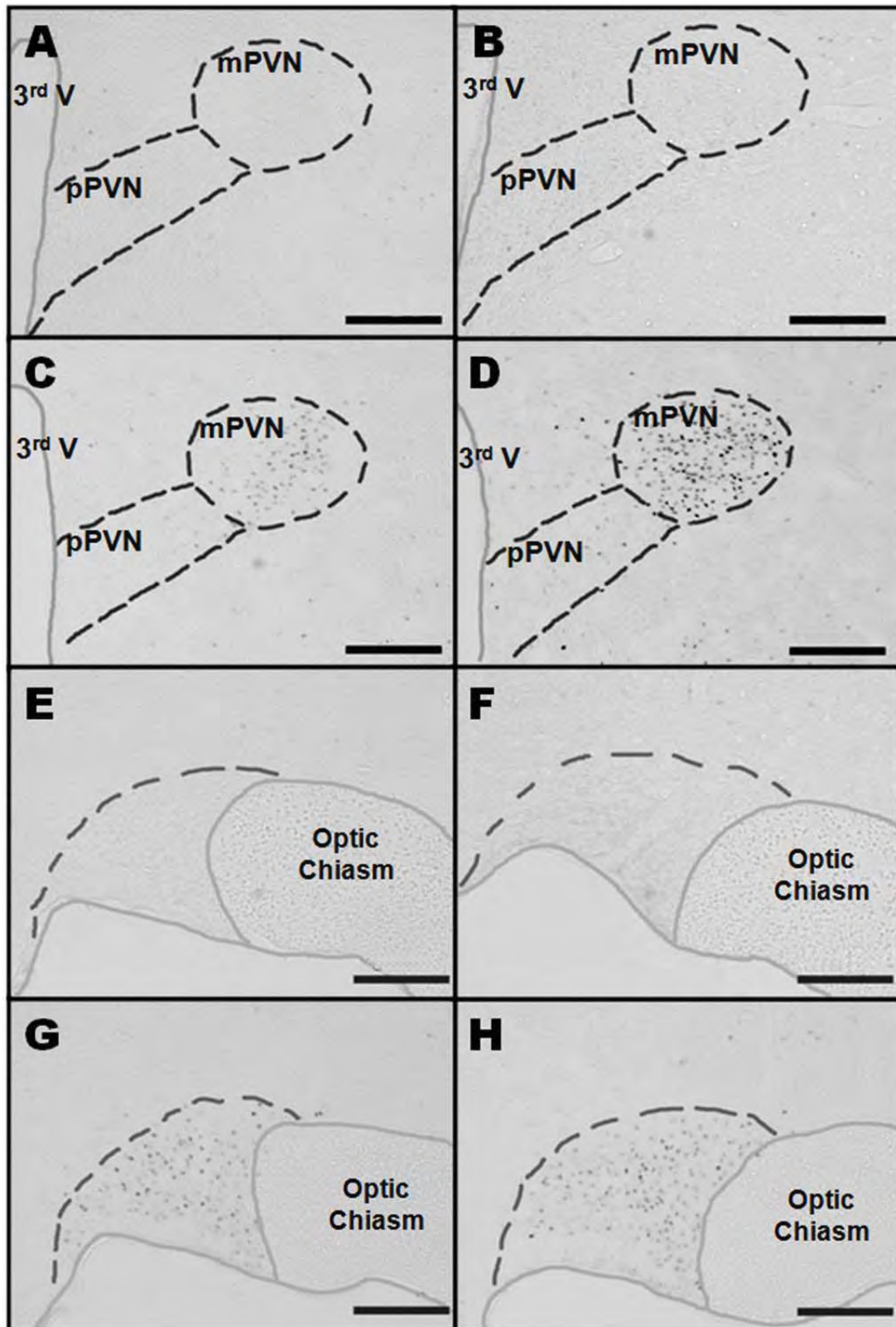


FIGURA 8 – Fotomicrografia mostrando imunoreatividade para c-FOS em ratos com LF (A, C, E e G) e Lesão A2 (B, D, F e H) após gavagem intragástrica com NaCl 0,15 M (A, B, E e F) ou NaCl 2 M (C, D, G e H). 3^o V: terceiro ventrículo; PVNm: PVN magnocelular; PVNp: PVN parvocelular. Escala = 200 μ m.

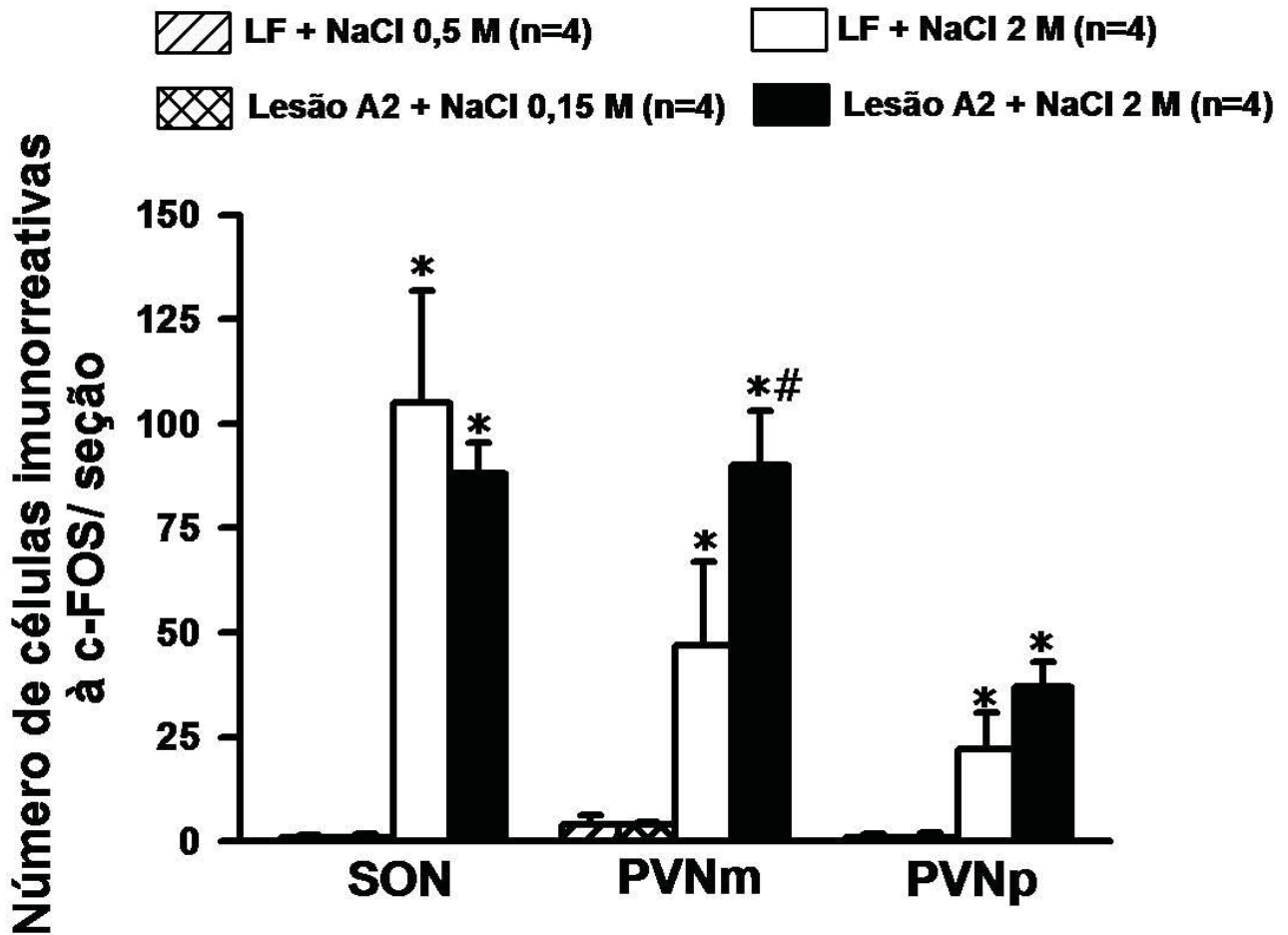


FIGURA 9 – Número de células imunoreativas para c-FOS por seção de 150 μ m no núcleo supraóptico (SON), porção magnocelular (PVNm) e parvocelular (PVNp) do núcleo paraventricular do hipotálamo em ratos com lesão A2 e lesão fictícia (LF) após gavagem intragástrica de NaCl 0,15 M ou NaCl 2 M (2 ml). * diferente de NaCl 0,15 M, # diferente de LF + NaCl 2 M (ANOVA de uma via associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais está indicado entre parênteses.

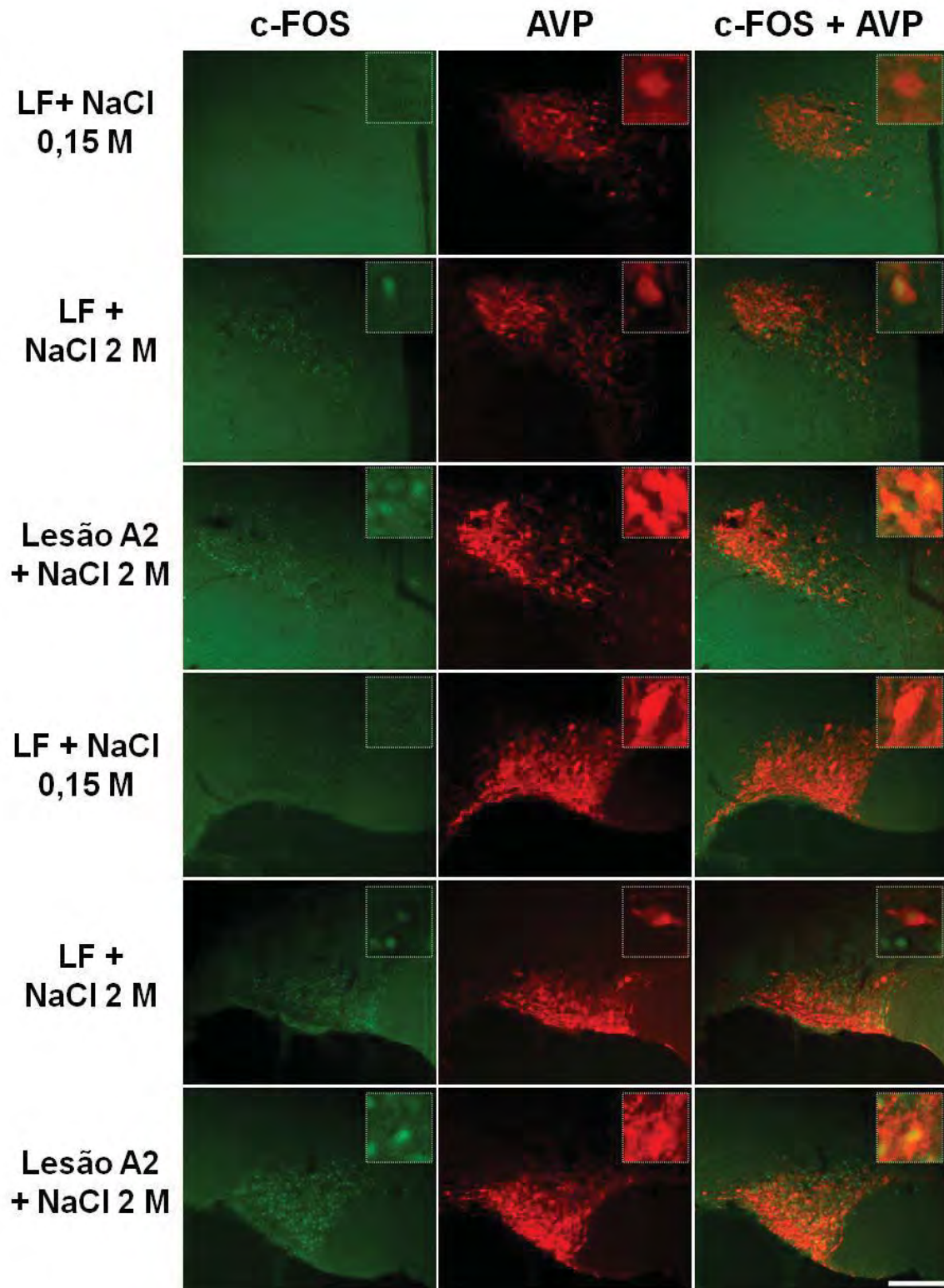


FIGURA 10 – Fotomicrografia de cortes coronais representativos para c-FOS (verde) e vasopressina (AVP, vermelho) e dupla marcação (FOS+AVP) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo supraoptico (SON) de ratos com lesão A2 e ratos com lesão fictícia (LF). Escala= 200 μ m.

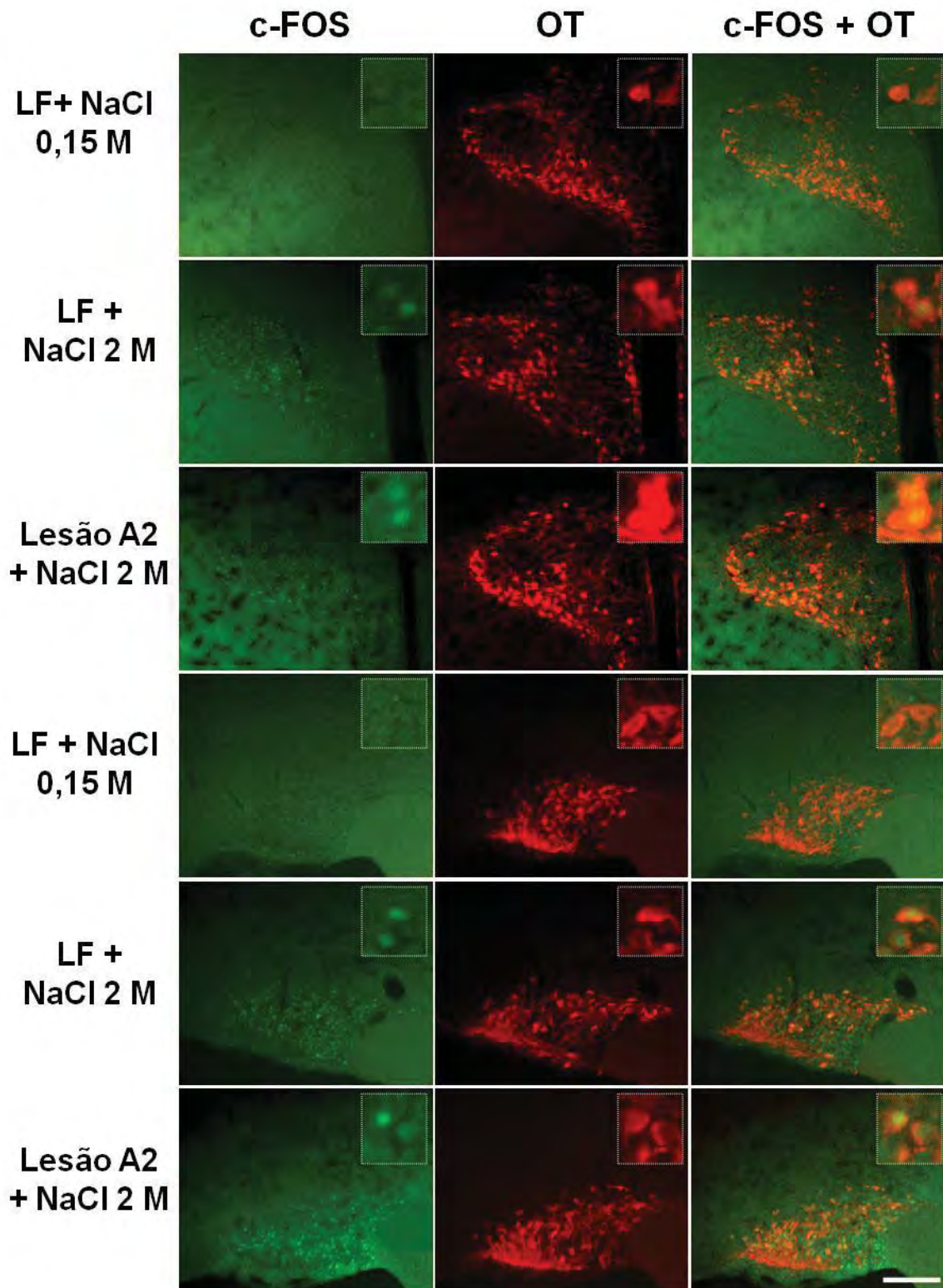


FIGURA 11 – Fotomicrografia de cortes coronais representativos para c-FOS (verde) e ocitocina (OT, vermelho) e dupla marcação (FOS+OT) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e no núcleo supraoptico (SON) de ratos com lesão A2 e ratos com lesão fictícia (LF). Escala= 200 μ m.

4 Alterações da expressão gênica no NTS após a gavagem de NaCl 2 M

Podemos observar na figura 12, que a gavagem de NaCl 2 M foi capaz de aumentar a expressão gênica das proteínas MIF ($0,92 \pm 0,01$ vs NaCl 0,15 M: $0,67 \pm 0,04$ unidades arbitrárias, ua), vesícula transportadora de glutamato (VGLUT₂, $0,71 \pm 0,05$ vs NaCl 0,15 M: $0,39 \pm 0,05$ ua) e dopamina- β -hidroxilase (D β H, $0,64 \pm 0,07$ vs NaCl 0,15 M: $0,42 \pm 0,05$ ua), indicando que a gavagem de NaCl 2 M ativa tanto neurônios glutamatérgicos como noradrenérgicos do NTS.

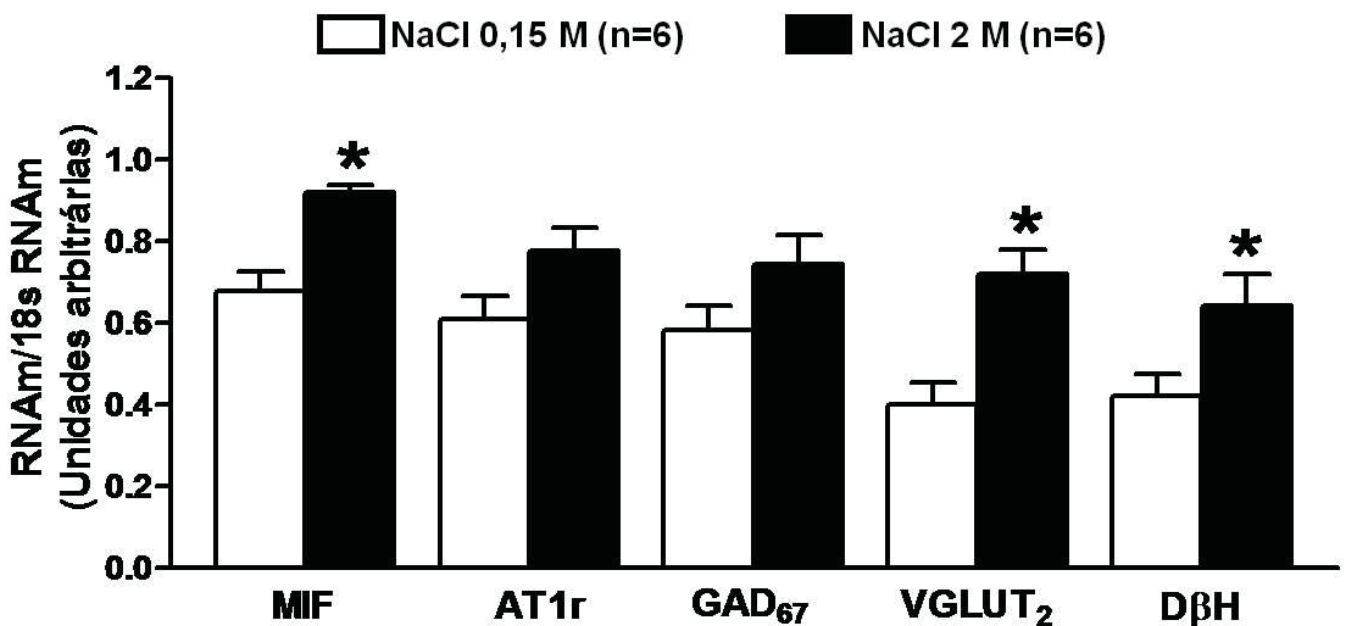


FIGURA 12 – Alterações na expressão gênica no NTS após NaCl 2 M. Todos os resultados foram corrigidos pela expressão gênica da proteína 18s de cada animal. * diferente de NaCl 0,15 M (ANOVA de uma via associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais está entre parênteses.

5 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento A2 do NTScom na ingestão de água e excreção urinária induzida por gavagem intragástrica de NaCl 2 M.

A gavagem de NaCl 2 M induziu um maior aumento na ingestão de água nos ratos A2 comparado com os ratos LF apenas nos primeiros 15 minutos do experimento $\{8,1 \pm 1,4$ ml vs. LF: $4,5 \pm 1,2$ ml, $[F(3,140)=10,663; p<0.05]$, (Figura 13A)}. Na figura 13B, podemos observar que a maior ingestão cumulativa de água em animais com lesão A2 não é alcançada pelos animais com LF.

Na Figura 14 o volume urinário, a natriurese e a caliurese, respectivamente induzidos por NaCl 2 M ig foram maiores nos ratos LF e nos ratos com lesão A2 comparados com os ratos com o mesmo tipo de lesão que receberam gavagem com NaCl 0,15 M. Entretanto, as alterações induzidas pela gavagem de NaCl 2 M foram semelhantes nos grupos LF e lesão A2, tanto antes da ingestão (tempo -60 a 0) como durante a ingestão de água (tempo 0 a 120 min).

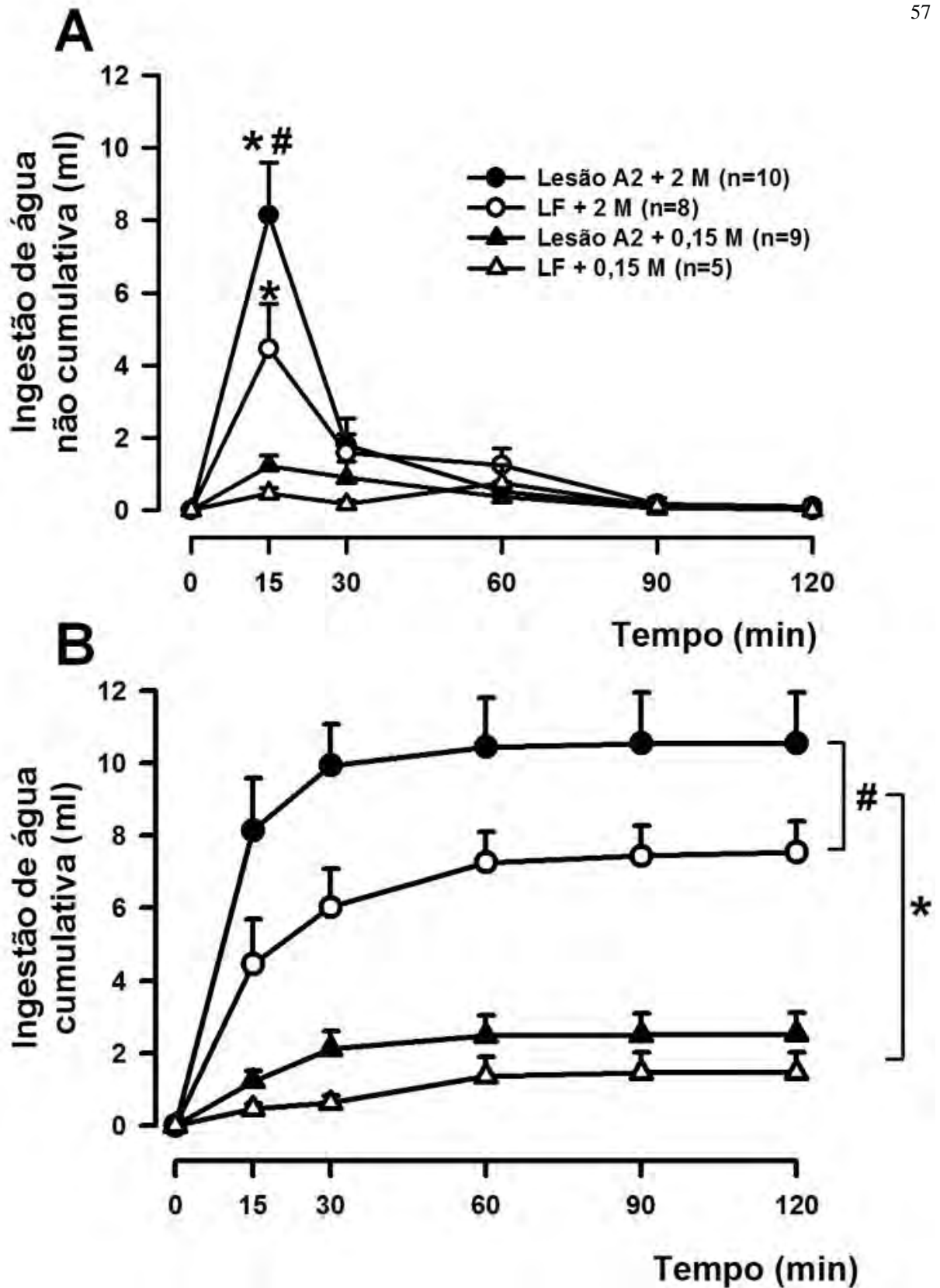


FIGURA 13 – Efeitos da gavagem intragástrica de NaCl 2 M em ratos com Lesão A2 ou LF sobre a ingestão não cumulativa (A) e cumulativa (B) de água. Os resultados são expressos como média \pm EPM. # diferente de LF, * diferente de NaCl 0,15 M (ANOVA de duas vias associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Número de animais está indicado entre parênteses.

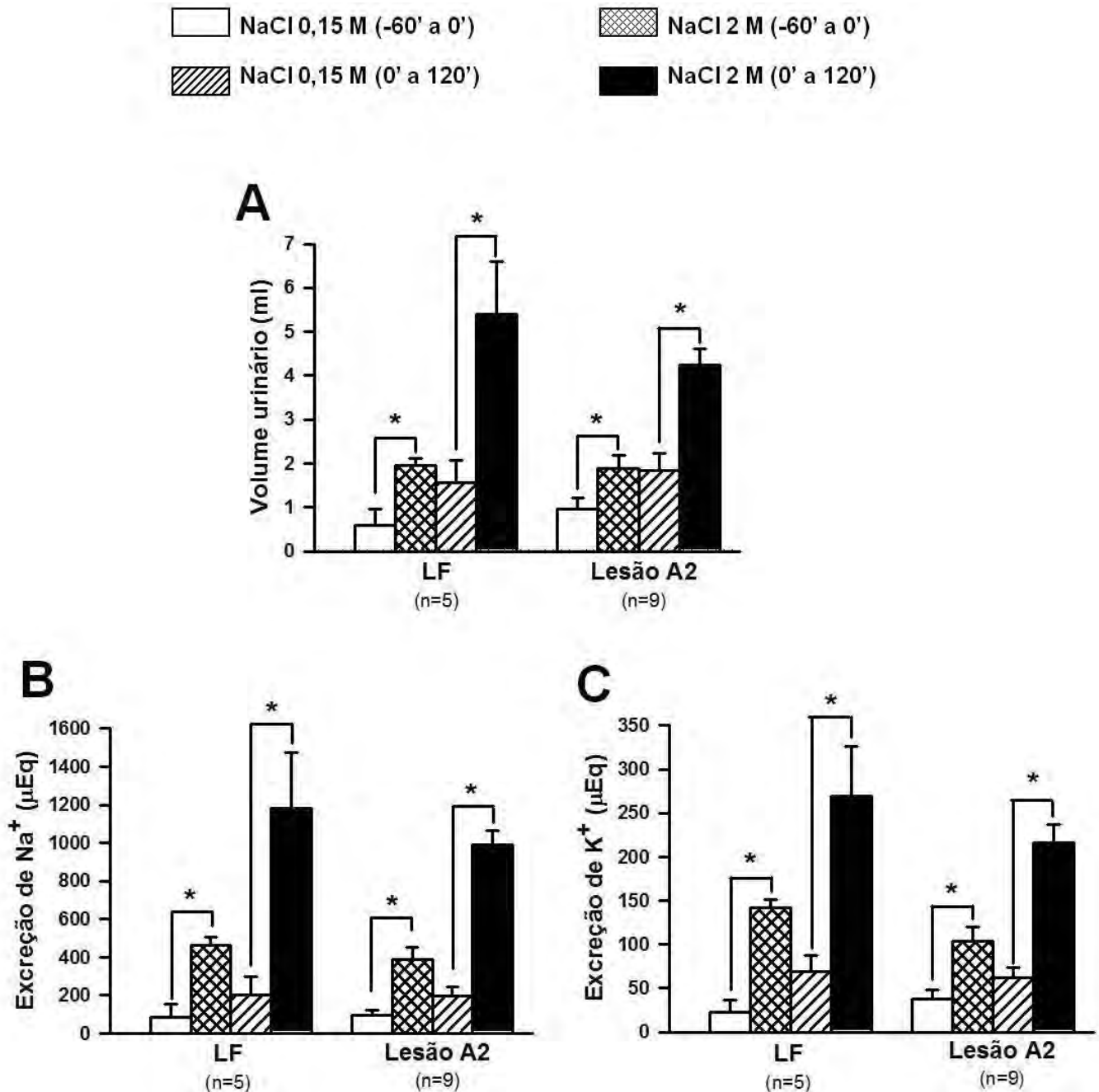


FIGURA 14 – Efeitos da gavagem intragástrica de NaCl 2 M em ratos com lesão A2 ou lesão fictícia (LF) sobre (A) diurese (B) natriurese and (C) caliurese antes (-60 a 0 min) e durante a ingestão de água (0 a 120 min). Os resultados são expressos como média \pm EPM.* diferente de NaCl 0,15 M (ANOVA de uma via associada ao Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$). Número de animais está indicado entre parênteses.

6 RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PARTE I:

Observamos que após o estímulo osmótico causado pela gavagem de NaCl 2 M:

- Animais com lesão A2, mas não animais com lesão fictícia, apresentaram resposta pressora que é dependente de vasopressina;
- Animais com lesão A2 apresentaram uma maior ativação de neurônios da porção magnocelular do PVN comparado aos ratos com lesão fictícia;
- Animais com lesão A2 apresentaram uma maior ingestão de água;
- Animais com lesão A2 apresentaram uma natriurese, caliurese e diurese semelhante aos ratos com lesão fictícia;
- Há um aumento da expressão de RNAm para MIF, VGLUT₂ e DβH no NTS.

PARTE II:

HEMORRAGIA E LESÃO DO GRUPAMENTO A2 DO NTScom

Já foi demonstrado que o NTS é ativado após hemorragia. Nosso objetivo nesta parte da tese foi verificar o papel dos neurônios A2 do NTScom nos ajustes cardiovasculares à hemorragia hipotensiva, assim como explorar os mecanismos envolvidos nessas respostas.

PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS PARTE II

1 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupo A2 nos ajustes cardiovasculares induzidos por hemorragia: participação da vasopressina e da angiotensina II periférica.

Em todos os animais, no dia anterior ao experimento, os animais previamente submetidos à lesão química do grupamento catecolaminérgico A2, ou lesão fictícia (LF), foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) para a cateterização da artéria femoral, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) e veia femoral para infusão de drogas.

No dia seguinte à cateterização, em animais não anestesiados, foi analisada a labilidade da pressão arterial, onde a labilidade é definida como o desvio padrão da pressão arterial média. A labilidade foi calculada a partir de 20 observações dos valores de PAM durante 20 minutos de registro para cada animal individualmente². Após este período, foi administrado iv salina isotônica, composto de Manning (antagonista dos receptores V1 da vasopressina, 10 µg/kg), ou losartan (antagonista dos receptores AT1 da ANGII, 10 mg/kg). Após 10 minutos foram realizadas 4 retiradas de sangue arterial (2 ml/300 g peso corporal) em intervalos de 10 minutos entre elas, baseado em protocolo descrito anteriormente¹³². Após a quarta retirada de sangue, os registros perduraram por mais 60 minutos. A eficácia do bloqueio dos receptores de vasopressina ou ANGII foi testada antes e após 60 min da última retirada de sangue.

2 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupo A2 nos ajustes cardiovasculares induzidos por hemorragia: participação da angiotensina II central

Em outro grupo experimental, sete dias antes do experimento os animais receberam implante de cannulas guia direcionadas ao ventrículo lateral (VL), no dia do experimento, 15 minutos antes da primeira retirada de sangue, os animais receberam 1 µl de salina isotônica ou losartan (100 µg/µl) no VL. Após 10 minutos foram realizadas 4 retiradas de sangue arterial conforme descrito no item anterior. A eficácia do bloqueio dos receptores de ANGII centrais foi testado com a microinjeção de ANGII (50 ng/µL) no VL após os 60 minutos.

RESULTADOS PARTE II

1 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupo A2 nos ajustes cardiovasculares induzidos por hemorragia: participação da vasopressina e da angiotensina II periférica

Foi verificado que a lesão A2 não promoveu labilidade da pressão arterial quando comparados com os animais LF (tabela 3 e figura 15). Os valores de pressão arterial média também não foram diferentes entre os grupos experimentais (tabela 3).

Tabela 3 – Pressão arterial media (PAM), frequência cardíaca (FC) e labilidade da PAM em animais LF e com lesão A2

Grupos	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Labilidade (mmHg)
<i>LF</i>	17	112.3 ± 2	381.8 ± 26	6.5 ± 0.5
<i>Lesão A2</i>	19	113.4 ± 2	341.6 ± 12	6.4 ± 0.3

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

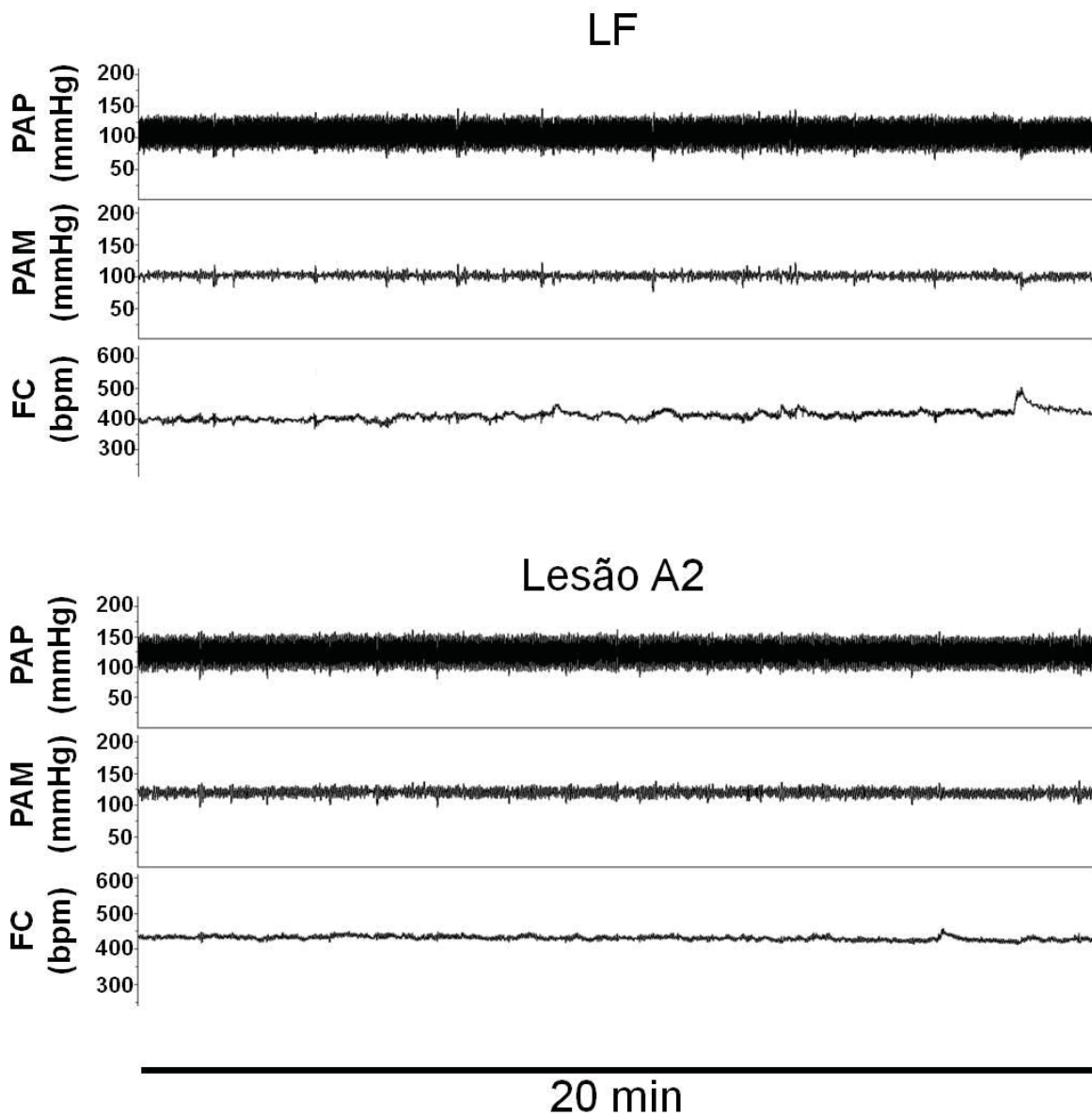


FIGURA 15 – Traçado representativo mostrando pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em animais com lesão fictícia (LF) ou lesão dos neurônios A2 por um período de 20 minutos onde foi avaliado a labilidade da pressão arterial causada pela lesão fictícia ou e lesão A2 do NTScom.

Nesses mesmos animais, após um período basal de registro foram feitas 4 retiradas consecutivas de sangue (2 ml/300 g de peso corporal) com intervalo de 10 minutos entre elas. A hipotensão observado foi de igual em animais com lesão fictícia ($\Delta -73\pm 7$ mmHg) e com lesão A2 ($\Delta -62\pm 7$ mmHg), figuras 16 e 17A. Contudo animais com lesão A2 apresentaram uma recuperação rápida (aproximadamente 20 min) da hipotensão causada pela hemorragia ($\Delta -7\pm 2$ mmHg vs. pré hemorragia), enquanto animais com lesão fictícia não recuperaram seus níveis de PAM completamente até o final do registro (60 min após a 4º retirada de sangue, $\Delta -20\pm 3$ mmHg, vs. pré hemorragia) [$F(5,287)=22,783$; $p < 0,05$].

Após o pré-tratamento com antagonista de vasopressina (10 $\mu\text{g}/\text{kg}$), podemos observar que não houve alteração da recuperação da hipotensão tanto em animais com lesão A2 ($\Delta -9\pm 4$ mmHg vs. lesão A2 + salina: -7 ± 2 mmHg, 20 min após a 4º retirada de sangue), como em animais com lesão fictícia ($\Delta -33\pm 7$ mmHg vs. lesão fictícia + salina: -35 ± 9 mmHg 20 min após 4º retirada de sangue). Por outro lado, o pré tratamento com losartan (antagonista dos receptores AT1 da ANGII, 10 mg/kg, iv) foi capaz de abolir a recuperação apresentada pelo grupo lesão A2 ($\Delta -29\pm 4$ mmHg e -28 ± 3 mmHg, respectivamente, 20 e 60 min após a 4º retirada de sangue vs. pré hemorragia, figuras 16 e 17A). Nos animais LF, o tratamento com losartan reduziu a recuperação parcial apresentada nestes animais até o final do experimento ($\Delta -39\pm 6$ mmHg vs lesão fictícia: $\Delta -20\pm 3$ mmHg, 20 e 60 min após a 4º retirada de sangue). Não foram observadas alterações significantes na FC causadas pela hemorragia (figuras 16 e 17B) e pela administração de losartan iv. No final do experimento foi comprovado a eficácia do bloqueio dos receptores V1 da vasopressina ou de receptores AT1 de angiotensina (tabelas 4 e 5).

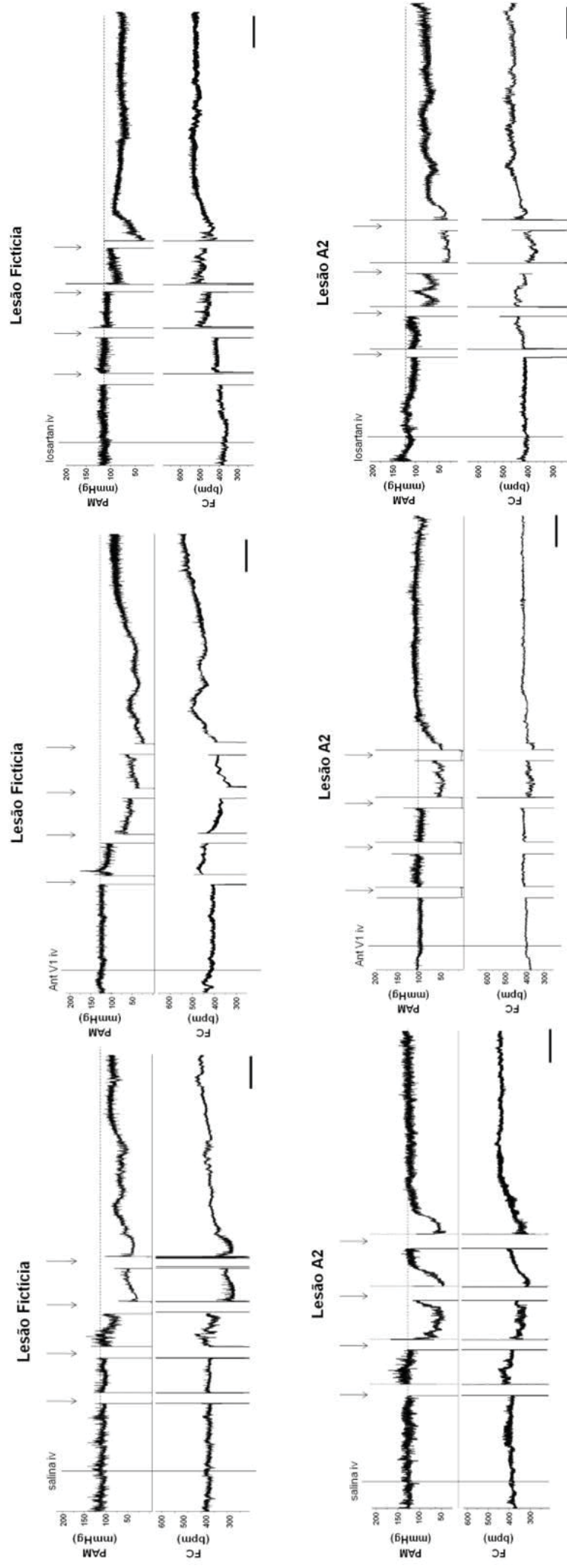


FIGURA 16 – Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos lesão fictícia e lesão A2 que receberam injeções intravenosas de salina (NaCl 0,15 M; 1 ml/kg), antagonista de receptores V1 da vasopressina (10 μ g/kg) ou losartan (10 mg/kg) antes da hemorragia (4 x 2 ml/300 g peso corporal). Setas indicam o momento das retiradas de sangue. Escala = 10 minutos.

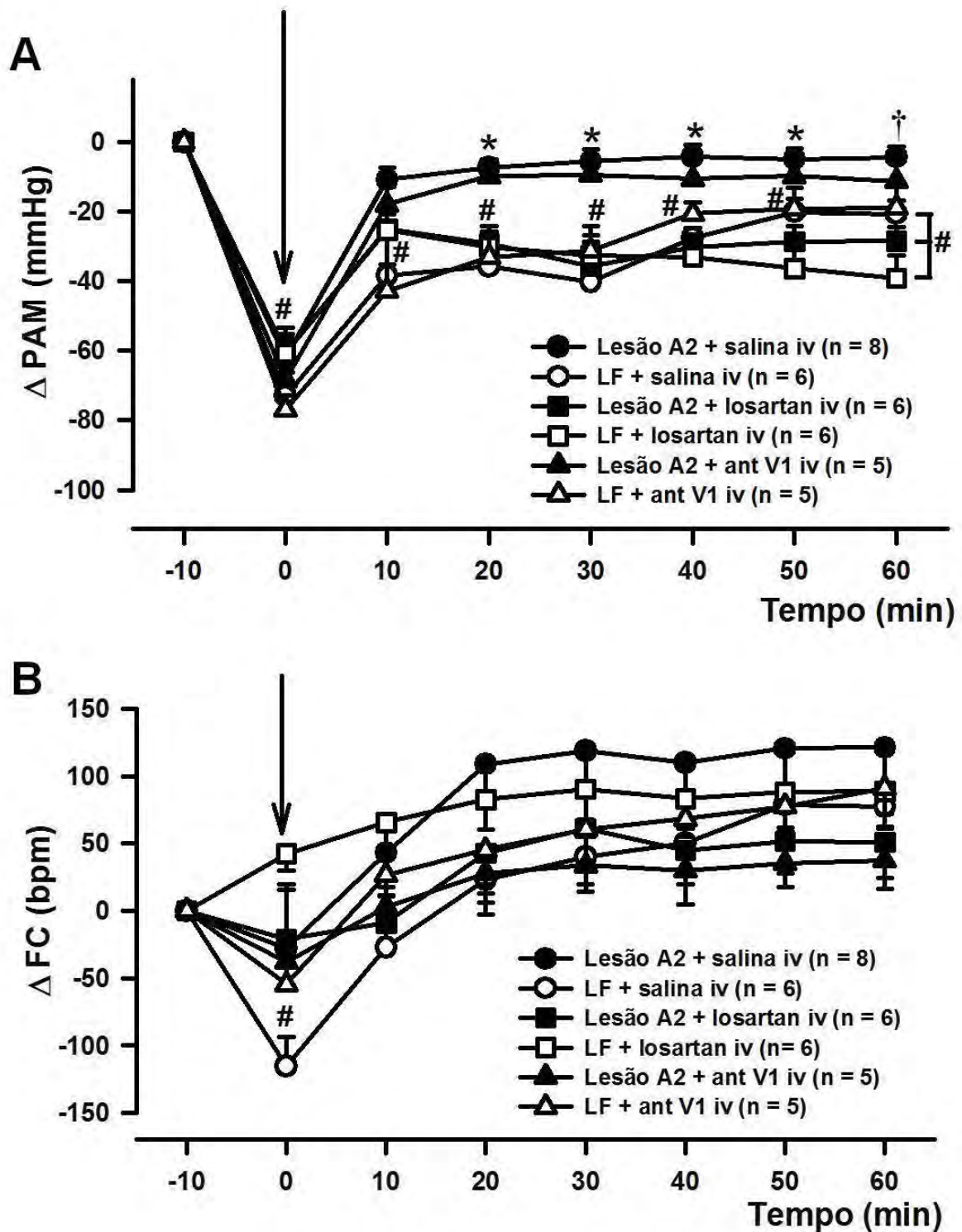


FIGURA 17 – Alterações na (A) pressão arterial média (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão A2 e lesão fictícia (LF) pré-tratados com losartan (antagonista de receptores de angiotensina AT1; 10 mg/kg peso corporal), composto de Manning (antagonista V1, 10 μ g/kg peso corporal) ou NaCl 0,15 M (1 ml/kg) iv após hemorragia (4 retiradas de sangue de 2 ml/300 g peso corporal; seta indica 4^a retirada de sangue). * diferente lesão A2 + salina e lesão A2 + ant V1 vs. lesão A2 + losartan e todos os grupos LF, # diferente do basal (-10 minutos); † diferente lesão A2 + salina vs. lesão A2 + losartan e LF + losartan (Two Way ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais está indicado entre parênteses.

Tabela 4 – Variações (Δ) na pressão arterial média (PAM, mmHg) após injeções de angiotensina II (ANG II, 50 ng/rato, iv) antes, 5 e 105 minutos após NaCl 0,15 M (1 ml/kg, iv) ou losartan (10 mg/kg peso corporal, iv)

Grupos	N	ANG II	Salina ou losartan	ANG II 5'	ANG II 105'
LF + salina	6	48 \pm 6	0 \pm 6	44 \pm 5	45 \pm 3
Lesão A2 + salina	8	50 \pm 5	1 \pm 3	42 \pm 6	44 \pm 2
LF + losartan	6	45 \pm 6	0 \pm 4	-1 \pm 1	3 \pm 1
Lesão A2 + losartan	6	51 \pm 4	-2 \pm 1	-2 \pm -2	1 \pm 2

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N, número de animais.

Tabela 5 – Variações (Δ) na pressão arterial média (PAM) após injeções de vasopressina (AVP, 12,5 ng/rato; iv) antes, 5 e 105 minutos após NaCl 0,15 M (1 ml/kg, iv) ou antagonista V1 da vasopressina (10 μ g/kg peso corporal, iv)

Grupos	N	AVP	Salina ou ant V1	AVP 5'	AVP 105'
LF + salina	6	13 \pm 6	0 \pm 6	11 \pm 4	13 \pm 4
Lesão A2 + salina	8	14 \pm 4	1 \pm 3	14 \pm 2	12 \pm 4
LF + ant V1	5	13 \pm 2	0 \pm 2	-1 \pm 2	0 \pm 2
Lesão A2 + ant V1	5	14 \pm 3	-3 \pm 1	0 \pm 2	2 \pm 2

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N, número de animais.

2 Participação dos neurônios catecolaminérgicos do grupo A2 nos ajustes cardiovasculares induzidos por hemorragia: participação da angiotensina II central

Visto que os mecanismos dependentes de ANGII estão aumentados em animais com lesão A2, promovendo uma melhor recuperação da hipotensão causada pela hemorragia, foi realizado o bloqueio dos receptores centrais da ANGII, com a injeção de losartan (100 µg/1 µl) intracerebroventricularmente (icv) (figura 18). Verificamos que a logo após a 4ª retirada de sangue (final da hemorragia) a hipotensão observada em animais tratados com salina ou losartan icv foi semelhante (figuras 19 e 20A). Entretanto, a recuperação da hipotensão observada em ratos com lesão A2, foi prejudicada até 40 min após o final da hemorragia ($\Delta - 24 \pm 6$ mmHg vs pre-hemorragia). Animais LF com ou sem losartan icv não foram capazes de recuperar da hipotensão causada pela hemorragia até o final do período experimental (LF + salina: -29 ± 3 mmHg e LF + losartan: -31 ± 5 mmHg). A dose de losartan utilizado icv é capaz de bloquear uma dose pressora de ANGII (50 ng/1 µl, icv), em ratos LF ou ratos com lesão A2 (tabela 6). A frequência cardíaca foi muito variável, sem grandes diferenças durante o período experimental (Figuras 19 e 20B)

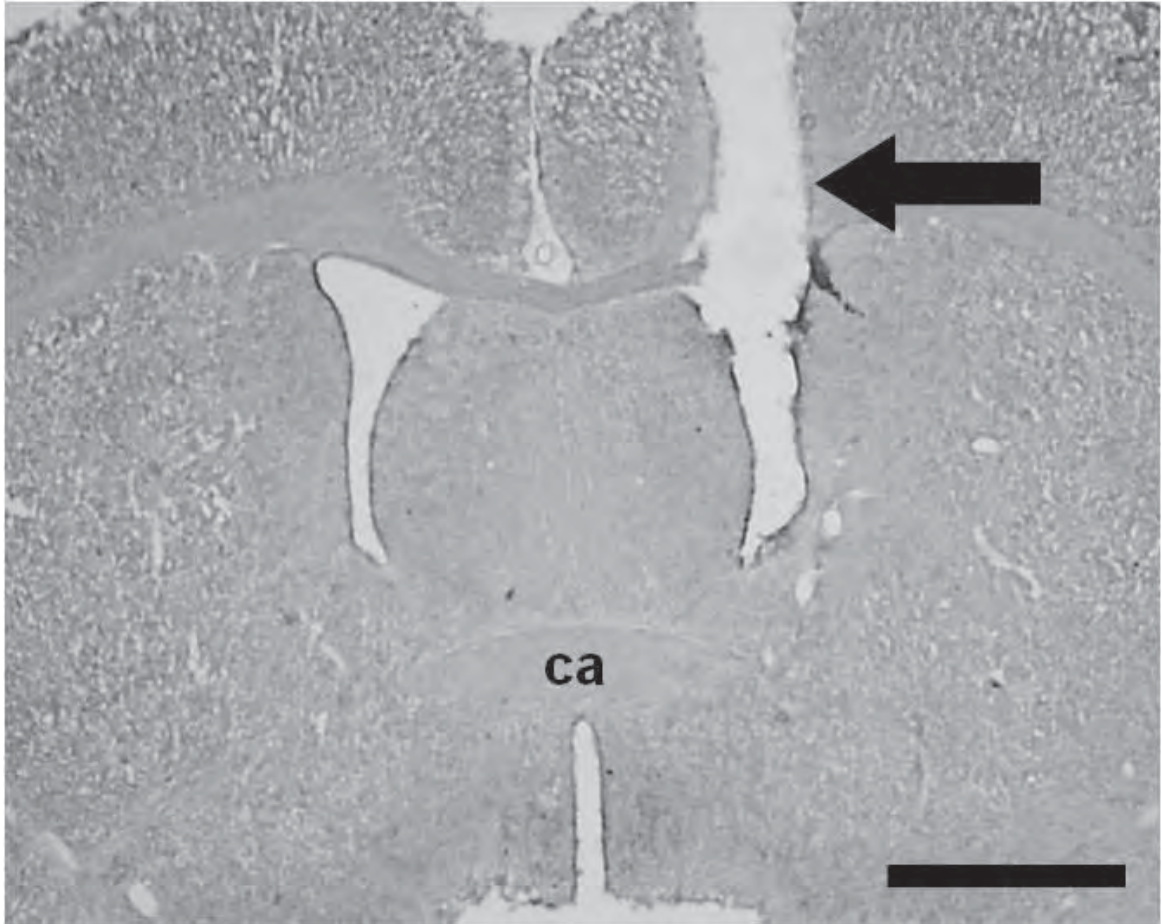


FIGURA 18 – Fotomicrografia de um animal representativo do grupo que recebeu microinjeção no ventrículo lateral (VL). Trajeto da cânula guia em direção ao VL (seta). Comissura anterior, ca. Escala = 2 mm.

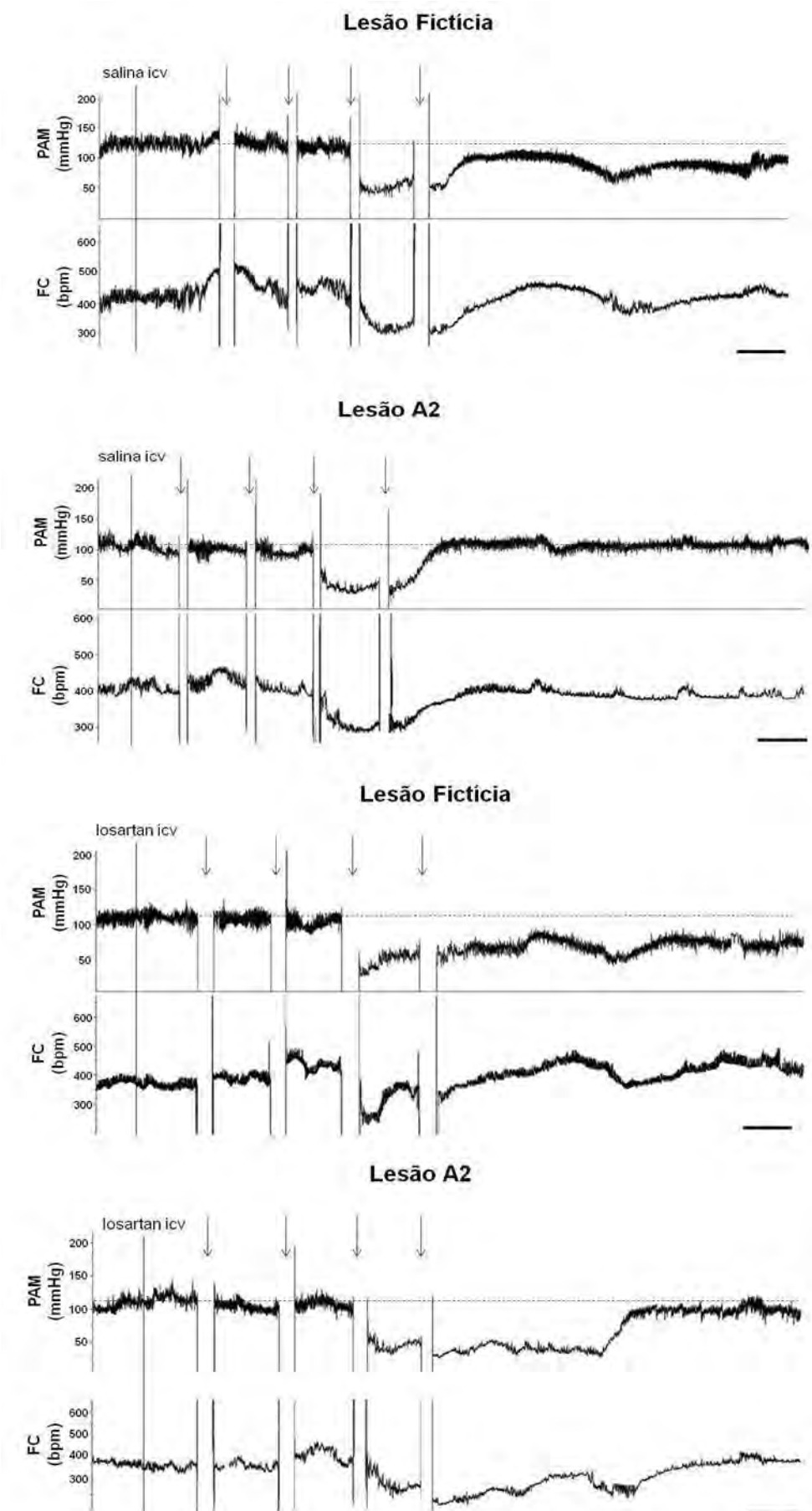


FIGURA 19 – Traçado representativo mostrando pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) dos grupos lesão fictícia e lesão A2 que receberam injeções intracerebroventricular de salina (NaCl 0,15 M; 1 μ l) ou losartan (100 μ g/ μ l) antes da hemorragia (4 x 2 ml/300 g peso corporal). Setas indicam o momento das retiradas de sangue. Escala = 10 minutos.

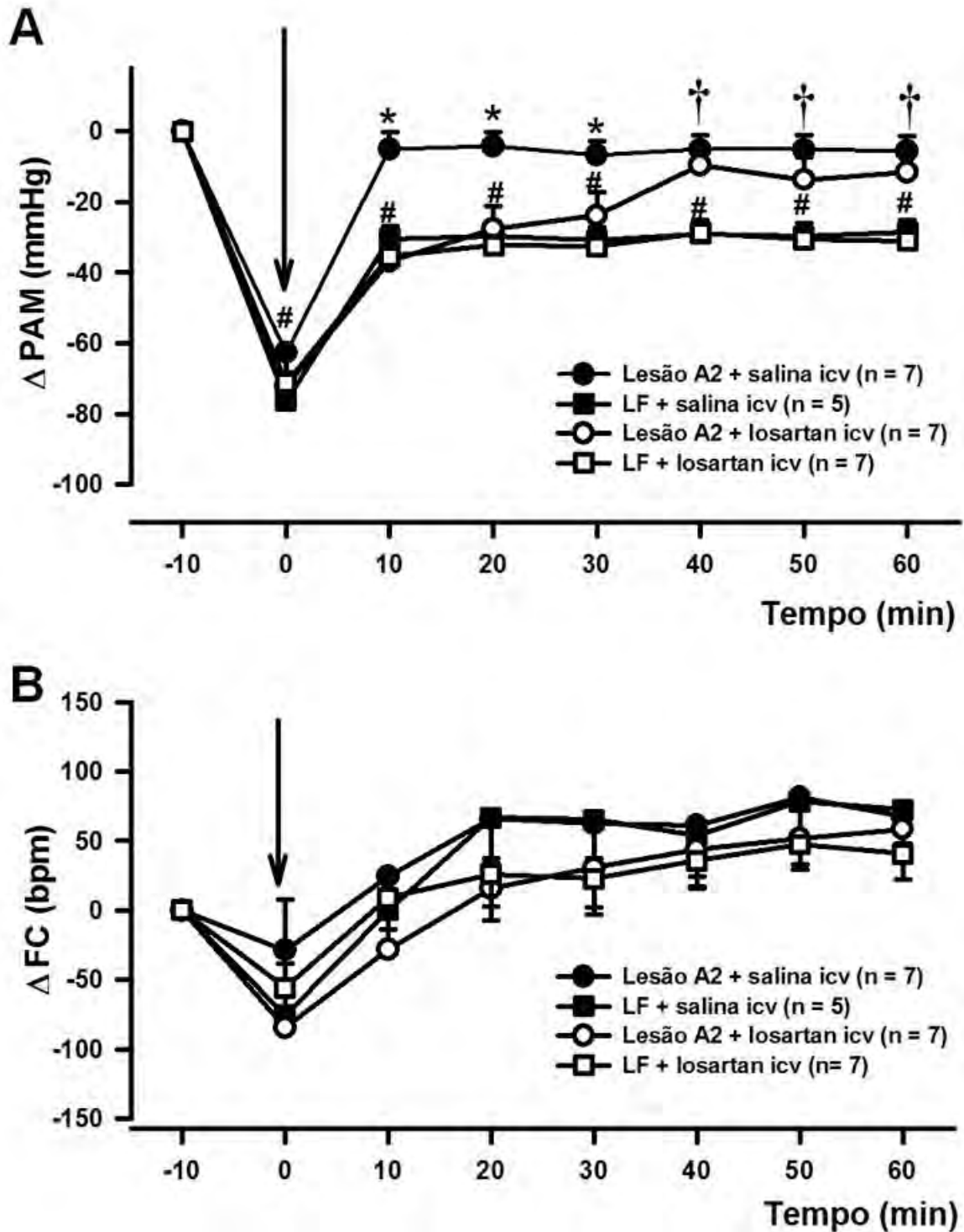


FIGURA 20 – Alterações na (A) pressão arterial média (PAM) e (B) frequência cardíaca (FC) em ratos com lesão A2 e LF pré-tratados intracerebroventricularmente com losartan (100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) ou salina (1 μl) após hemorragia (4 retiradas de sangue de 2 ml/300 g peso corporal; seta indica 4^a retirada de sangue).. * diferente lesão A2 + salina vs. outros grupos, # diferente do basal (-10 minutos); † diferente lesão A2 vs. LF (Two Way ANOVA, seguido de Student-Newman-Keuls, $p < 0,05$). Os resultados estão expressos como média \pm EPM. O número de animais está indicado entre parênteses.

Tabela 6 – Alterações (Δ) na pressão arterial media (PAM) após a microinjeção de ANG II (50 ng/1 μ l) intracerebroventricularmente em animais com lesão fictícia (LF) ou lesão A2 pré tratados com salina ou losartan (100 μ g/ μ l) no ventrículo lateral (VL). A microinjeção de ANG II foi feita no final dos experimentos (105 min após losartan ou salina no VL)

Grupos	N	Δ PAM (mmHg)
<i>LF + salina</i>	5	17 \pm 2
<i>Lesão A2 + salina</i>	7	18 \pm 3
<i>LF + losartan</i>	7	2 \pm 1
<i>Lesão A2 + losartan</i>	7	-3 \pm 1

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. N, número de animais.

3 RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NA PARTE II:

Observamos que a hemorragia promoveu :

- A hemorragia promoveu hipotensão de igual magnitude em animais com lesão fictícia ou lesão dos neurônios noradrenérgicos A2 do NTScom;
- Animais com lesão A2 apresentaram uma melhor recuperação da hipotensão causada pela hemorragia, que não foi dependente de vasopressina, mas foi dependente de angiotensina II, sendo que a resposta inicial desta recuperação é dependente de mecanismos angiotensinérgicos centrais.

DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que em animais com lesão dos neurônios catecolaminérgicos A2 do NTScom a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M foi capaz de promover resposta pressora dependente da secreção de vasopressina, além de uma maior ativação da porção magnocelular do PVN, área responsável pela produção de vasopressina. Esses animais apresentaram também uma potencialização da ingestão de água induzida pela gavagem de NaCl 2 M, sem alterações na excreção urinária. Mostramos também que o estímulo osmótico agudo foi capaz de alterar a expressão do RNAm para dopamina- β -hidroxilase (D β H), da proteína presente na vesícula transportadora de glutamato (VGLUT₂) e do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) no NTS. Já a hipotensão causada pela hemorragia foi de igual magnitude em ambos os grupos, porém os animais com lesão dos neurônios A2 do NTScom apresentaram uma recuperação da hipotensão mais rápida, dependente de mecanismos angiotensinérgicos centrais.

A microinjeção do anticorpo anti-D β H-saporina no NTScom destruiu os neurônios A2 do NTScom (76%), mas não foi capaz de destruir outros neurônios catecolaminérgicos do bulbo, como os grupamentos A1 e C1 localizados na superfície ventral. A redução no número de células adrenérgicas após a injeção de anti-D β H-saporina está de acordo com estudos prévios^{40,98,113}. Embora os neurônios A2 do NTScom não tenham sido completamente destruídos, foi demonstrado anteriormente que lesões de $\geq 70\%$ na região C1 ou A1 são suficientes para prejudicar as respostas fisiológicas observadas nesses estudos^{40,113,114}. A distribuição das células positivas à TH observadas no grupo LF no presente estudo está de acordo com o observado em grupos controles em estudos prévios^{40,98-99,113,131}. De maneira semelhante, os dados apresentados mostram que ratos tratados com anti-IgG-saporina (LF) não mostraram redução no número de neurônios catecolaminérgicos em qualquer região do bulbo examinada^{40,98-99,113,131}.

De maneira semelhante à observada em ratos com lesão eletrolítica do NTScom^{18,42}, nossos dados mostram que a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais não foram diferentes entre os ratos com lesão A2 e LF. A ausência de alteração na PAM e FC era esperada, uma vez que a região A2 do NTScom recebe principalmente aferentes dos quimiorreceptores, em detrimento aos aferentes dos barorreceptores arteriais^{125,153}. De fato, lesões A2 não parecem alterar a PAM e FC basais como também foi demonstrado em outros estudos^{56,137,144}. Entretanto, nesses mesmos estudos, foi observada uma labilidade da pressão arterial após a lesão eletrolítica ou química da região A2 bem como após a inserção nos

neurônios A2 de canais retificadores de $K^{+56,137,144}$. Por outro lado, a lesão específica do NTScom^{18,42,127} ou lesão dos neurônios A2 apenas do NTScom, como mostrado no presente estudo, não induziu labilidade da pressão arterial. A discrepância entre nossos estudos e os outros pode ser devido à diferença no tamanho da lesão ou inativação dos neurônios A2. A lesão do presente estudo foi restrita aos neurônios A2 localizados no NTScom, desta forma, não envolvendo a região barorreceptora do NTS, enquanto nos estudos prévios^{56,137,144} o tamanho da lesão A2 ou inativação da região A2 foi maior, compreendendo também porções intermediárias do NTS que contém neurônios A2.

Observamos também que o quimiorreflexo não foi alterado pela lesão A2 do NTScom, diferente dos dados observados com lesão eletrolítica do NTScom. Diferentes regiões do SNC tem sido implicadas na regulação da resposta pressora (simpatoexcitatória) e/ou bradicárdica (parassimpatoexcitatória) do quimiorreflexo, incluindo o NTScom^{42,126}, o PVN¹¹⁰, o RVL^{70,89} e regiões da ponte^{73,88}. Especificamente, as lesões do NTScom ou do PVN prejudicam a resposta pressora e bradicárdica do quimiorreflexo^{42,110,126}. Mesmo assim, a lesão dos neurônios A2 do NTScom, possivelmente neurônios que se projetam ao PVN, não foram capazes de alterar as respostas pressora e bradicárdica do quimiorreflexo. Desta forma, podemos supor que os neurônios noradrenérgicos do NTScom não participam da resposta do quimiorreflexo, possivelmente outros conjuntos de neurônios do NTScom e outros neurotransmissores no PVN⁴⁶ possam estar envolvidos com essas respostas ao quimiorreflexo. A lesão A2 também não alterou as respostas da ativação do baroreflexo bem como do reflexo cardiopulmonar, o que já era esperado, uma vez que as vias responsáveis por estes reflexos se dirigem para a porção mais intermediária do NTS^{36,55,111}, região que não foi afetada pela nossa lesão.

A administração ig de NaCl 2 M aumentou a PAM apenas em ratos com lesão de A2, e este aumento foi dependente de vasopressina, uma vez que a resposta pressora foi completamente bloqueada em ratos lesados pré-tratados com composto de Manning. Já é bem estabelecido que a administração de salina hipertônica intragastricamente promove secreção de vasopressina^{31,33}. Sabe-se também que a lesão do NTScom induz a um maior aumento de secreção de vasopressina após estímulos que promove secreção de vasopressina, como a oclusão bilateral de carótidas¹²⁷. O presente resultado sugere que os neurônios A2 do NTScom freiam o aumento da pressão arterial durante aumentos da osmolaridade plasmática, por meio de uma ação inibitória da secreção de vasopressina exercida por esses neurônios. Estudos de Carlson et al.³¹ mostraram que animais anestesiados submetidos a infusão intragástrica de NaCl 0,3 M apresentavam um aumento na secreção de vasopressina e

expressão da proteína c-FOS no PVN e no SON. Corroborando esses resultados, demonstramos também que após a administração em ratos acordados de NaCl 2 M ig, há um aumento da expressão de c-FOS no SON e no PVN, nos ratos LF e em ratos com lesão A2. Ainda, nos ratos com lesão A2, na região magnocelular do PVN houve um aumento ainda maior no número de neurônios imunopositivos à c-FOS, e grande parte desses neurônios é vasopressinérgica. Nossos dados sugerem que em ratos lesados há uma maior ativação da região magnocelular do PVN, e, portanto maior secreção de vasopressina. As projeções do NTS, incluindo o NTScom, para o PVN e SON podem constituir a base anatômica para estas respostas neuroendócrinas de inibição da secreção de vasopressina exercida pelos neurônios A2^{49-50,119,124,128}.

O NTScom e os neurônios A2 tem sido implicados no controle do balanço hidroeletrólítico. A resposta dipsogênica induzida pela administração subcutânea de isoproterenol¹⁸ ou por NaCl 2 M ig¹⁶ está aumentada em ratos com lesão eletrolítica do NTScom. A resposta dipsogênica ao NaCl 2 M ig também foi aumentada em ratos com lesão A2, sugerindo um papel inibitório desses neurônios durante aumento na osmolaridade plasmática. Observamos que a sobrecarga de sódio induziu aumentos equivalentes na diurese, natriurese e caliurese antes e durante a ingestão de água em ratos LF e com lesão A2, desta forma, o maior aumento na ingestão de água nos ratos com lesão A2 não é secundário à alterações na diurese. Considerando as projeções dos neurônios A2 com as áreas prosencefálicas envolvidas com a ingestão de água^{119,124,146}, é possível que os neurônios A2 do NTScom tenham uma influência inibitória sobre mecanismos que regulam a ingestão de água, talvez atuando em áreas como na região AV3V ou SFO^{124,146}.

O aumento da osmolaridade plasmática aumenta a concentração plasmática de ocitocina e induz natriurese^{6,78}. Embora, não tenhamos medido a concentração plasmática de ocitocina, houve um aumento significativo no número de células marcadas para c-FOS no PVN e SON, sendo que parte dessas células também apresentou marcação para a ocitocina em ratos LF e ratos com lesão A2. Assim, ratos LF e ratos com lesão A2 podem ter apresentado esse aumento na natriurese devido a secreção de ocitocina. Contudo, diferente do observado em ratos com lesão eletrolítica do NTScom onde há uma potencialização da natriurese induzida pela gavagem com salina hipertônica¹⁶, não houve diferença na natriurese entre os ratos LF e com lesão A2. Uma possível explicação seria de que nos ratos com lesão eletrolítica do NTScom o aumento da PAM após a gavagem foi maior do que o aumento apresentado nos ratos com lesão A2, e desta forma, o maior aumento na pressão arterial, causaria uma maior natriurese, independente da concentração de ocitocina.

Verificamos que os dados anteriores que mostraram os efeitos da lesão eletrolítica do NTScom^{16-17,20} sobre as respostas ao estímulo osmótico agudo, são muito semelhantes aos observados nos animais com lesão específica do grupamento A2 do NTScom. Estes dados nos faz supor que a maior parte dos efeitos inibitórios exercidos pelo NTScom sobre as respostas induzidas por NaCl 2 M são devidos aos neurônios A2 do NTScom.

Gavagem com NaCl 2 M ig, estímulo osmótico capaz de aumentar a osmolaridade plasmática¹¹⁶ utilizado no presente estudo, promoveu um aumento da expressão de RNAm para VGLUT₂ e DβH no NTS. Os dados observados indicam que a hiperosmolaridade é capaz de ativar neurônios glutamatérgicos e noradrenérgicos do NTS corroborando com a nossa hipótese de que esses neurônios tem grande importância para o controle cardiovascular e do balanço hidroeletrólítico. O interessante deste achado é que mudanças no RNAm significam alterações a longo prazo, e não somente uma rápida correção de pequenos desvios, indicando que no NTS existam mecanismos a longo prazo para o controle da hiperosmolaridade. Outro dado interessante foi o aumento do fator inibitório da migração de macrófagos (MIF) no NTS após a gavagem de NaCl hipertônico. O MIF é uma interleucina que já foi demonstrado como tendo efeitos na regulação cardiovascular e também no equilíbrio hidroeletrólítico em mecanismos dependentes da ativação angiotensinérgica central⁹⁴. Dados recentes⁴¹ mostraram que a hiperosmolaridade é também capaz de aumentar a expressão 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 centrais¹⁵⁰.

As figuras abaixo resumem os mecanismos que podem estar envolvidos com as respostas observadas em ratos com lesão dos neurônios A2 do NTScom submetidos à gavagem com NaCl 2 M. Na figura 21 temos uma situação em que os neurônios A2 do NTScom estão intactos. Nessa situação os estímulos osmóticos ativam osmorreceptores, periféricos e centrais. 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 NTScom, que por sua vez ativaria o circuito inibitório 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 prévios^{91,142}. A ativação dos neurônios A2 do NTScom 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 promoveria também

aumento da secreção de vasopressina. Por outro lado, a participação dos osmorreceptores periféricos na regulação da secreção de vasopressina ainda não está bem determinado^{31,33}. 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. A PAM pode também não ter aumentado em ratos com o grupamento A2 intacto devido a ação tamponante dos barorreceptores, os quais ativaram vias neurais reflexas do circuito bulbar para regulação da PAM. A ativação dos barorreceptores além de tamponar o aumento da PAM, poderia também, via NTS inibir a secreção de vasopressina por meio de suas projeções ao PVN. 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 pelos neurônios A2 do NTScom pode ser por meio de ativação de um interneurônio inibitório no prosencéfalo, ou pelo fato desta via ser ela própria inibitória, haja vista que a liberação de noradrenalina em neurônios da região AV3V pode promover hiperpolarização neuronal por meio da ativação de receptores α_2 pós-sinápticos^{9-10,14,122}). Temos também que considerar que a AP pode também constituir uma aferência importante para sinalizar ao NTScom/A2 sobre alterações na osmolaridade plasmática, uma vez que ocorre ativação desta área por ativação de osmorreceptores periféricos³².

Na figura 22, temos uma nova situação, com remoção dos neurônios A2 do NTScom. Agora, não ocorre mais o efeito inibitório dos neurônios A2 do NTScom, sendo assim, ocorre potencialização da resposta dipsogênica e o aparecimento da resposta pressora dependente de vasopressina. Como não há mais mecanismos inibitórios, ocorre uma maior ativação dos neurônios do PVN (magnocelular), conseqüentemente, maior secreção de vasopressina responsável pelo aumento de PAM. Da mesma maneira, há uma redução dos mecanismos inibitórios para a sede, então a mesma é potencializada.

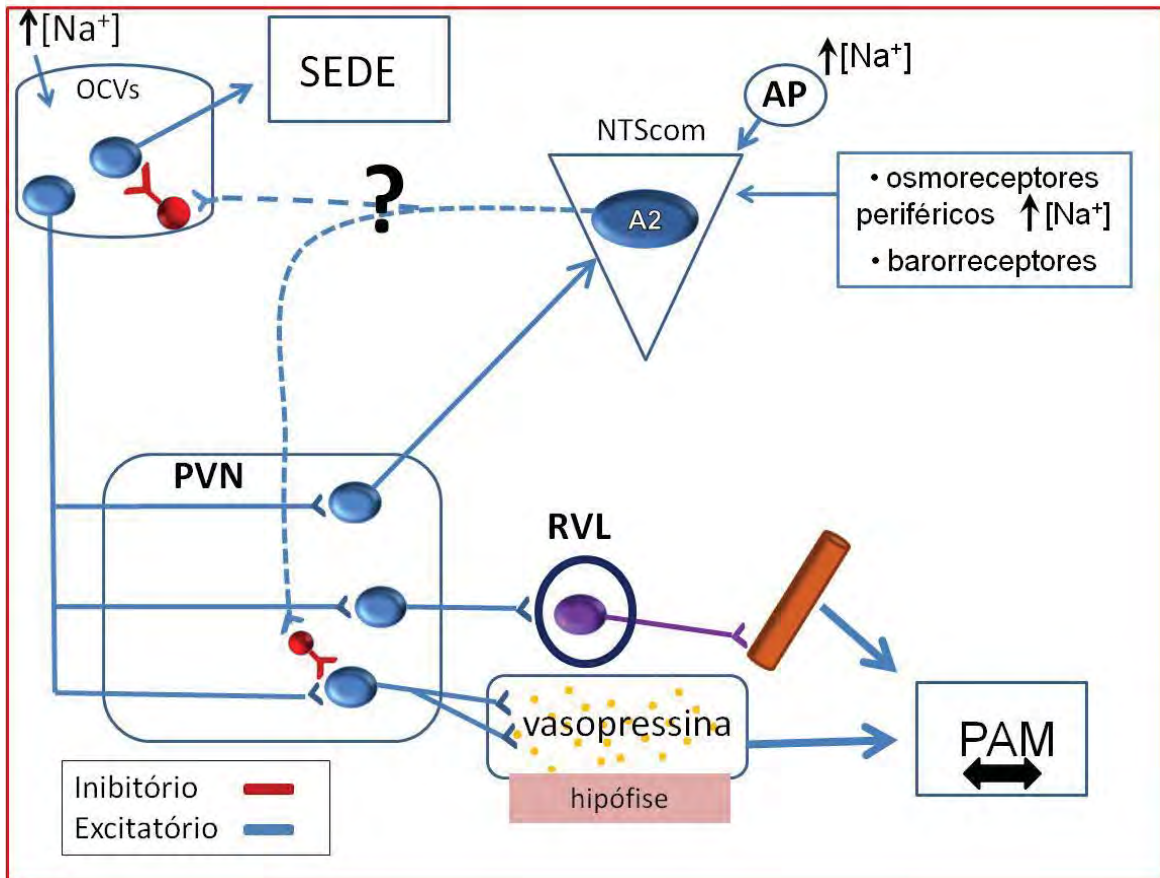


FIGURA 21 – Presença de mecanismos inibitórios.

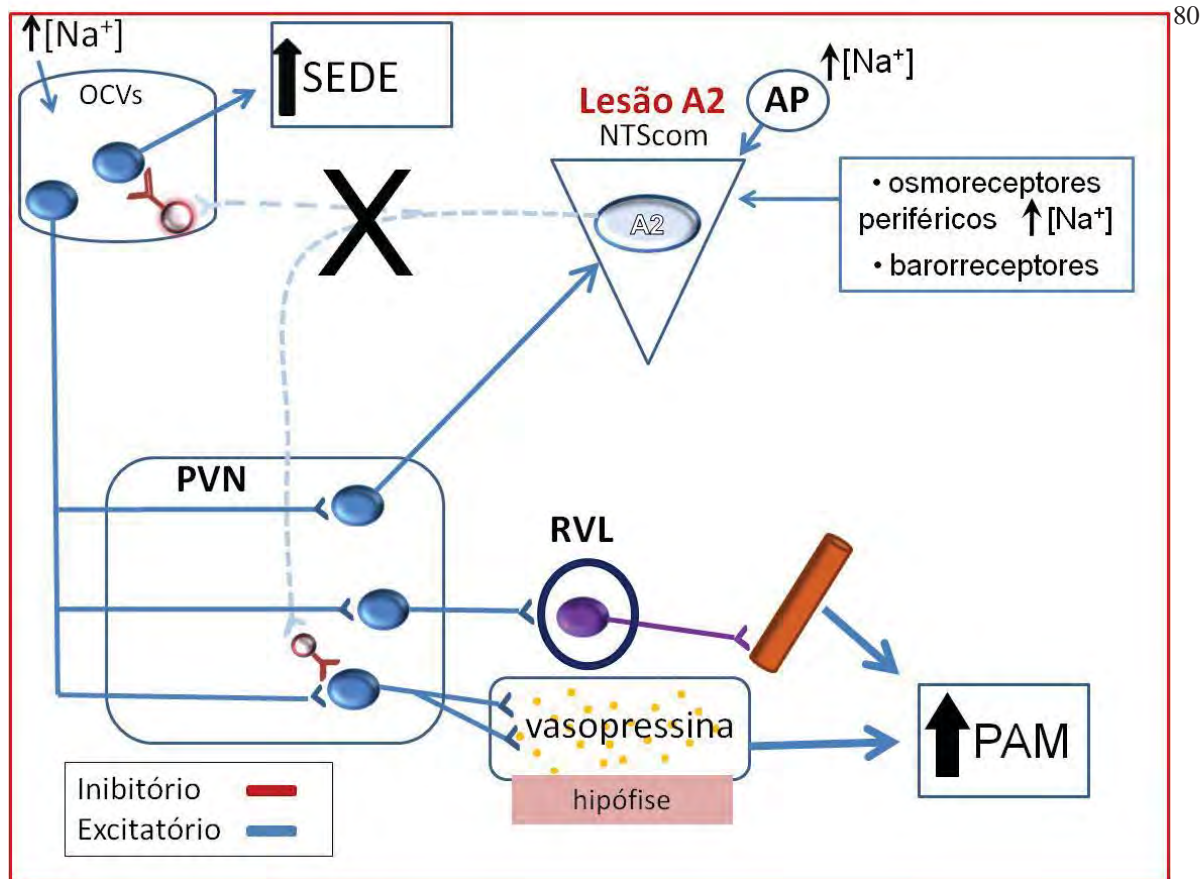


FIGURA 22 - Ausência de mecanismos inibitórios.

Já está bem estabelecido que a hemorragia promove ativação de áreas do sistema nervoso central relacionadas com o controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico, como o PVN e SON, e de áreas bulbares^{7-8,27-28,34}, como também é descrito que a hemorragia promove secreção de vasopressina^{14,37,60,118,120}, ativação do sistema renina-angiotensina^{15,80,82} e aumento da atividade simpática, seguido de redução da atividade simpática caso a hemorragia hipotensiva persista^{72,134}.

Nossos resultados mostraram que a hemorragia, causada por 4 retiradas de sangue em intervalos de 10 minutos, promove uma hipotensão de igual magnitude em animais controle e animais com lesão dos neurônios A2, assim como demonstrado anteriormente com animais com lesão eletrolítica do NTS intermediário¹³². Neste mesmo estudo, foi demonstrado que a lesão eletrolítica do NTS intermediário não foi capaz de alterar a secreção de vasopressina causada pela hemorragia¹³². Outro resultado interessante é que a lesão do feixe ventral contendo fibras dos neurônios A2 e A1 que ascendem para o prosencéfalo (VNAB)¹²⁸ também não altera a secreção de vasopressina induzida pela hemorragia⁹⁵, enquanto a lesão do feixe dorsal contendo fibras de neurônios do locus coeruleus e algumas fibras provenientes do feixe ventral de neurônios A1 (DNAB)¹²⁸ foi capaz de reduzir a secreção de vasopressina induzida pela hemorragia^{60,95}. Estudos⁶⁰ também demonstraram que o bloqueio dos receptores V1 da vasopressina em ratas não interferem na resposta de recuperação da hipotensão causada

pela hemorragia, sugerindo que a vasopressina, pelo menos em fêmeas, não possui um papel tão importante nessa situação. Todos esses resultados corroboram com nossos achados, uma vez que o bloqueio dos receptores de vasopressina não alteram a melhor recuperação da hipotensão causada pela hemorragia apresentada pelos animais com lesão A2, mostrando que os neurônios A2 do NTScom não possuem um papel importante na secreção de vasopressina induzida pela hemorragia. Por outro lado, dados do presente estudo mostraram que a em ratos com lesão dos neurônios A2 do NTScom a resposta pressora observada após estímulo osmótico é decorrente da secreção de vasopressina, sugerindo que esse conjunto de neurônios podem inibir a secreção de vasopressina frente a estímulos específicos.

Em outro trabalho, Lightman et al.⁹⁶ mostraram que a lesão do DNAB (remove axônios de A2 e A1) mas não de VNAB (remove axônios de A1 e do Locus coeruleus) foi capaz de reduzir a atividade da renina plasmática causada pela hemorragia em animais anestesiados, sugerindo que neurônios A6 do locus coeruleus e algumas fibras dos neurônios A1 dirigem-se ao PVN, especificamente para a porção parvocelular do PVN responsável pelo aumento da atividade simpática. Por outro lado, foi demonstrado que a lesão do DNAB foi capaz de potencializar a atividade da renina plasmática após hemorragia em animais não anestesiados⁸². Nossos resultados demonstraram que os mecanismos dependentes da ANG II em uma situação de hemorragia estão potencializados em animais com lesão dos neurônios A2 do NTScom, à semelhança do observado por Jaworski et al.⁸². Na fase inicial da recuperação da hipotensão após a 4ª retirada de sangue, observamos que há atuação central da ANG II, uma vez que o tratamento prévio icv com losartan foi capaz de prejudicar a melhor recuperação dos animais com lesão A2 nos primeiros 30 minutos após a última retirada de sangue. Tanaka et al.¹⁴⁶ mostraram que a hemorragia ativa neurônios do NTS que se projetam para o órgão subfornical (SFO), região rica em receptores para ANG II¹³⁶. É possível, que os a ativação de neurônios A2 do NTScom inibam os neurônios angiotensinérgicos do SFO. Podemos ainda sugerir que os neurônios A2 que se projetam para a porção parvocelular do PVN¹²⁸, inibam estes neurônios, uma vez que a porção parvocelular do PVN que se projeta ao RVL são ativados em situação de hemorragia hipotensiva⁸.

As figuras abaixo resumem os mecanismos que podem estar envolvidos com as respostas observadas em ratos com lesão dos neurônios A2 do NTScom submetidos à hemorragia. Na figura 23 temos uma situação em que os neurônios A2 do NTScom estão intactos. Nessa situação após a hemorragia, há aumento da concentração de ANG II circulantes que ativa vias centrais para recuperação dos níveis de pressão arterial. A ANG II atua em estruturas localizadas centralmente livres de barreira hematoencefálica, como os

órgãos circumventriculares (OVLT, SFO, AP), responsáveis pela ativação simpática e também pela liberação de vasopressina por meio de conexões com o PVN e SON. A ativação dos neurônios A2 do NTScom pela hemorragia^{27-28,145} inibiria regiões prosencefálicas (SFO, PVN), exercendo um efeito inibitório sobre aumentos da PAM induzidos pelas ações da ANG II central. Não podemos descartar também que os neurônios A2 do NTScom sejam capazes de inibir a liberação de renina, inibindo vias centrais responsáveis por aumentar a atividade simpática para a liberação de renina pelas células justaglomerulares renais. Embora este mecanismo dos neurônios A2 durante a hemorragia pareça contraditório, podemos pensar que a função dessa via inibitória do grupamento A2 para o prosencéfalo nos efeitos da ANG II central seria para que pequenas alterações na concentração de ANG II não sejam capazes de promover resposta pressora. Durante a situação de hemorragia, esta via inibitória seria fortemente ativada, por um mecanismo ainda não estudado, mas que pode ser devido as ações da ANG II no SFO/OVL ativando a projeção de PVN ao NTS ou pelas ações da ANG II na AP, que por sua vez ativa o NTS/A2. Então embora durante a hemorragia haja respostas de secreção de vasopressina e aumento da concentração de ANG II circulantes, os mecanismos inibitórios de A2 estão ativados, não permitindo que a PAM tenha uma recuperação total. Neste esquema, a inibição exercida pelos neurônios A2 do NTScom pode ser por meio de ativação de um interneurônio inibitório no prosencéfalo, ou pelo fato desta via ser ela própria inibitória (liberação de noradrenalina, que pode promover hiperpolarização via ativação de receptores a2 pós-sinápticos⁹).

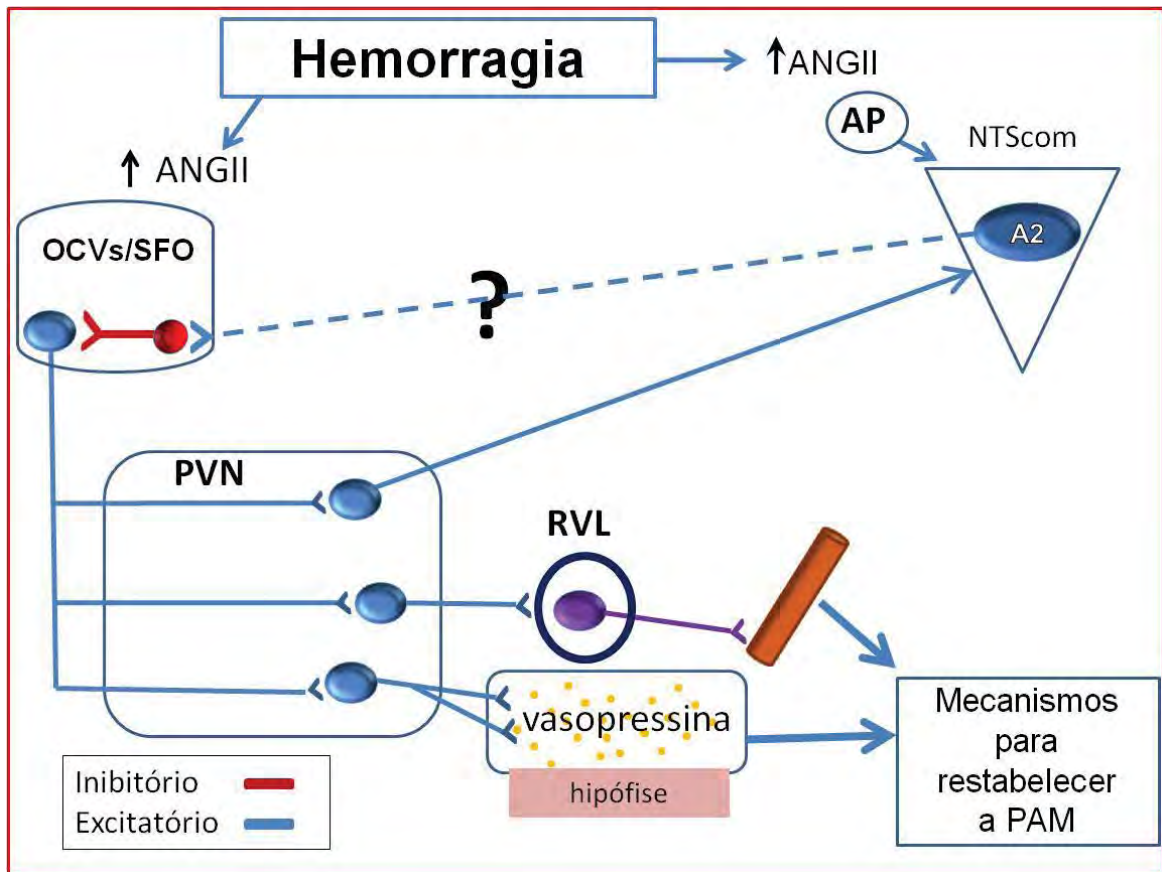


FIGURA 23 – Presença de mecanismos inibitórios.

Na figura 24, temos uma nova situação, com remoção dos neurônios A2 do NTScom. Agora, não ocorre mais o efeito inibitório dos neurônios A2 do NTScom, sendo assim, ocorre uma recuperação total da pressão arterial dependente da ANG II. Sabemos que parte da resposta de recuperação é dependente de mecanismos angiotensinérgicos centrais, pois o bloqueio dos receptores centrais da ANG II foi capaz de bloquear a melhor recuperação da pressão arterial nesses animais.

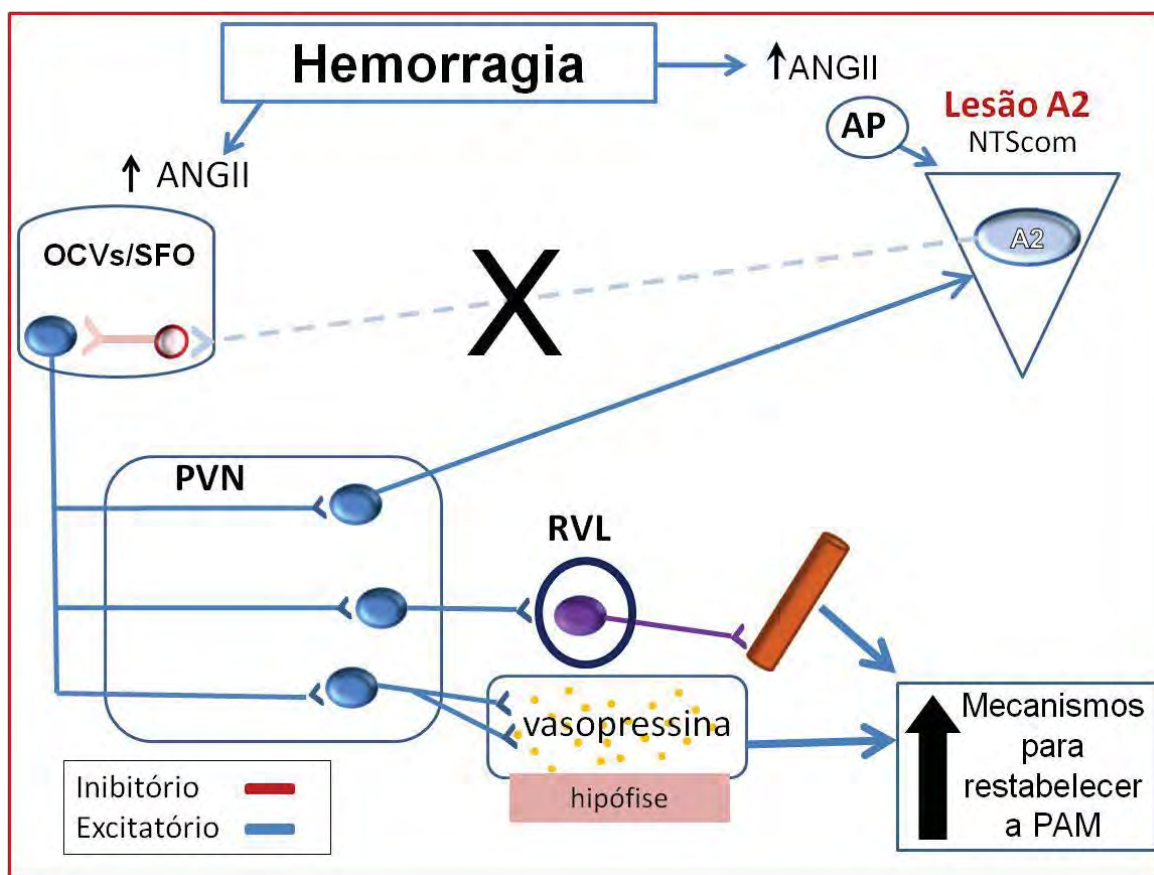


FIGURA 24 – Ausência de mecanismos inibitórios.

CONCLUSÃO

Concluindo, os resultados mostram que a lesão do grupamento A2 do NTScom facilita a ingestão de água e a hipertensão dependente de vasopressina após estímulos osmóticos. Da mesma forma, a lesão dos neurônios A2 do NTScom facilitam mecanismos angiotensinérgicos que contribuem para o aumento da pressão induzida pela hemorragia hipotensiva.

Desta forma, os resultados sugerem que mecanismos inibitórios envolvidos no controle da ingestão de água, pressão arterial e secreção de vasopressina, além dos efeitos inibitório da ação de mecanismos dependentes da angiotensina após a hemorragia dependem da integridade dos neurônios A2 do NTScom.

REFERÊNCIAS*

- 1 Adachi A. Projection of the hepatic vagal nerve in the medulla oblongata. *J Auton Nerv Syst.* 1984; 10: 287-93.
- 2 Alper RH, Jacob HJ, Brody MJ. Regulation of arterial pressure lability in rats with chronic sinoaortic deafferentation. *Am J Physiol.* 1987; 253: H466-74.
- 3 Andersson B, Leksell LG, Rundgren M. Regulation of water intake. *Annu Rev Nutr.* 1982; 2: 73-89.
- 4 Andrade CA, De Luca Jr LA, Colombari DS, Menani JV. Alpha2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. *Neuroscience.* 2006; 142: 21-8.
- 5 Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D, Paton JF. A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J Physiol.* 2006; 576: 569-83.
- 6 Antunes-Rodrigues J, Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev.* 2004; 84: 169-208.
- 7 Badoer E, McKinley MJ, Oldfield BJ, McAllen RM. Distribution of hypothalamic, medullary and lamina terminalis neurons expressing Fos after hemorrhage in conscious rats. *Brain Res.* 1992; 582: 323-8.
- 8 Badoer E, McKinley MJ, Oldfield BJ, McAllen RM. A comparison of hypotensive and non-hypotensive hemorrhage on Fos expression in spinally projecting neurons of the paraventricular nucleus and rostral ventrolateral medulla. *Brain Res.* 1993; 610: 216-23.
- 9 Bai D, Renaud LP. Median preoptic nucleus neurons: an in vitro patch-clamp analysis of their intrinsic properties and noradrenergic receptors in the rat. *Neuroscience.* 1998; 83: 905-16.
- 10 Barker JL, Crayton JW, Nicoll RA. Noradrenaline and acetylcholine responses of supraoptic neurosecretory cells. *J Physiol.* 1971; 218: 19-32.
- 11 Bellini SI, Bhatnagar RK, Johnson AK. Periventricular noradrenergic systems are critical for angiotensin-induced drinking and blood pressure responses. *Brain Res.* 1987; 403: 105-12.

* De acordo com o estilo Vancouver. Disponível no site: <http://www.nlm.nih.gov/bod/uniform.requirements.html>.

- 12 Bellini SI, Landa SK, Johnson AK. Selective catecholamine depletion of estructures along the ventral lamina terminalis: effects on experimentally-induced drinking and pressor responses. *Brain Res.* 1988; 456: 9-16.
- 13 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.
- 14 Bisset GW, Chowdrey HS. Control of release of vasopressin by neuroendocrine reflexes. *Q J Exp Physiol.* 1988; 73: 811-72.
- 15 Blair ML, Hisa H, Sladek CD, Radke KJ, Gengo FM. Dual adrenergic control of renin during nonhypotensive hemorrhage in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1991; 260: E910-9.
- 16 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 induce by hypertonic saline. *Neurosci Abst.* 2004.
- 17 Blanch GT, Freiria-Oliveira A, Menani JV, Colombari E, Murphy D, Colombari DSA. Lesions of the commissural nucleus of tractus solitarii increase osmotic-induced activation of paraventricular and supraoptic hypothalamic nuclei. *Physiol Soc.* 2009.
- 18 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.
- 19 Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Murphy D, Paulin RF, Antunes-Rodrigues J, Colombari E, et al. Lesions of the commissural nucleus of the tract solitary facilitate pressor, dipsogenic and renal responses to hyperosmolality . Submitted to *J Physiol.* 2010.
- 20 Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Colombari E, Menani JV, Colombari DSA. Pressor responses produced by peripheral osmoreceptor activation in commissural nucleus of the solitary tract-lesioned rats. *FASEB J.* 2008; 22: 738.
- 21 Blessing WW, Lappi DA, Wiley RG. Destruction of locus coeruleus neuronal perikarya after injection of anti-dopamine-B-hydroxylase immunotoxin into the olfactory bulb of the rat. *Neurosci Lett.* 1998; 243: 85-8.
- 22 Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci.* 2008; 9: 519-31.
- 23 Bourque CW, Oliet SH. Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59: 601-19.

- 24 Bourque CW, Oliet SH, Richard D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol.* 1994; 15: 231-74.
- 25 Brooks VL, Qi Y, O'Donoghue TL. Increased osmolality of conscious water-deprived rats supports arterial pressure and sympathetic activity via a brain action. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005; 288: R1248-55.
- 26 Buggy J, Johnson AK. Anteroventral third ventricular periventricular ablation: temporary adipsia and persisting thirst deficits. *Neurosci Lett.* 1977; 5: 177-82.
- 27 Buller KM, Smith DW, Day TA. Differential recruitment of hypothalamic neuroendocrine and ventrolateral medulla catecholamine cells by non-hypotensive and hypotensive hemorrhages. *Brain Res.* 1999; 834: 42-54.
- 28 Buller KM, Smith DW, Day TA. NTS catecholamine cell recruitment by hemorrhage and hypoxia. *Neuroreport.* 1999; 10: 3853-6.
- 29 Callera JC, Camargo LAA, De Luca Jr LA, Menani JV, Renzi A, Saad WA. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral preoptic area reduce water intake in dehydrated rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1993; 46: 39-43.
- 30 Callera JC, Oliveira LB, Barbosa SP, Colombari DSA, De Luca Jr LA, Menani JV. GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. *Neuroscience.* 2005; 134: 725-35.
- 31 Carlson SH, Beitz A, Osborn JW. Intra-gastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *Am J Physiol.* 1997; 272: R750-8.
- 32 Carlson SH, Collister JP, Osborn JW. The area postrema modulates hypothalamic Fos responses to intra-gastric hypertonic saline in conscious rats. *Am J Physiol.* 1998; 275: R1921-7.
- 33 Carlson SH, Osborn JW. Splanchnic and vagal denervation attenuate central Fos but not AVP responses to intra-gastric salt in rats. *Am J Physiol.* 1998; 274: R1243-52.
- 34 Chan RK, Sawchenko PE. Spatially and temporally differentiated patterns of c-fos expression in brainstem catecholaminergic cell groups induced by cardiovascular challenges in the rat. *J Comp Neurol.* 1994; 348: 433-60.
- 35 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.
- 36 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.

- 37 Clark BJ, Silva MR. 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.
- 38 Colombari DS, Colombari E, Lopes OU, Cravo SL. Afferent pathways in cardiovascular adjustments induced by volume expansion in anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2000; 279: R884-90.
- 39 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.
- 40 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.
- 41 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.
- 42 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.
- 43 Colombari E, Sato MA, Cravo SL, Bergamaschi CT, Campos Jr RR, Lopes OU. Role of medulla oblongata in hypertension. *Hypertension.* 2001; 38: 549-54.
- 44 Contreras RJ, Stetson PW. Changes in salt intake after lesions of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. *Brain Res.* 1981; 211: 355-66.
- 45 Cottle MA. Degeneration studies of the primary afferents of IXth and Xth cranial nerves in the cat. *J Comp Neurol.* 1964; 122: 329-45.
- 46 Cruz JC, Bonagamba LG, Machado BH, Biancardi VC, Stern JE. Intermittent activation of peripheral chemoreceptors in awake rats induces Fos expression in rostral ventrolateral medulla-projecting neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience.* 2008; 157: 463-72.
- 47 Cunningham JT, Johnson AK. The effects of central norepinephrine infusions on drinking behaviour induced by angiotensin after 6-hydroxydopamine injections into the anteroventral region of the third ventricle. *Brain Res.* 1991; 558: 112-6.
- 48 Dahlstrom A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. *Acta Physiol Scand.* 1964; 62: 1-55.

- 49 Day TA, Sibbald JR. Direct catecholaminergic projection from nucleus tractus solitarius to supraoptic nucleus. *Brain Res.* 1988; 454: 387-92.
- 50 Day TA, Sibbald JR. Solitary nucleus excitation of supraoptic vasopressin cells via adrenergic afferents. *Am J Physiol.* 1988; 254: R711-6.
- 51 Day TA, Sibbald JR. A1 cell group mediates solitary nucleus excitation of supraoptic vasopressin cells. *Am J Physiol.* 1989; 257: R1020-6.
- 52 Dayas CV, Buller KM, Crane JW, Xu Y, Day TA. Stressor categorization: acute physical and psychological stressors elicit distinctive recruitment patterns in the amygdala and in medullary noradrenergic cell groups. *Eur J Neurosci.* 2001; 14: 1143-52.
- 53 De Luca Jr LA, Camargo LAA, Menani JV, Renzi A, Saad WA. On a possible dual role for central noradrenalin in the control of hydromineral fluid intake. *Brazilian J Med Biol Res.* 1994; 27: 905-14.
- 54 De Luca Jr LA, Menani JV. Multifactorial control of water and saline intake: role of α 2-adrenoreceptors. *Brazilian J Med Biol Res.* 1997; 30: 497-502.
- 55 Donald DE, Shepherd JT. Reflexes from the heart and lungs: physiological curiosities or important regulatory mechanisms. *Circ Res.* 1978; 12: 449-69.
- 56 Duale H, Waki H, Howorth P, Kasparov S, Teschemacher AG, Paton JF. Restraining influence of A2 neurons in chronic control of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 2007; 76: 184-93.
- 57 Edwards GL, Beltz TG, Power JD, Johnson AK. Rapid onset "need-free" sodium appetite after lesions of the dorsomedial medula. *Am J Physiol.* 1983; 264: R1242-7.
- 58 Edwards GL, Ritter RC. Area postrema lesions increase drinking to angiotensin and extracellular dehydration. *Physiol Behav.* 1982; 29: 943-7.
- 59 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.
- 60 Fejes-Toth G, Brinck-Johnsen T, Naray-Fejes-Toth A. Cardiovascular and hormonal response to hemorrhage in conscious rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1988; 254: H947-53.
- 61 Ferguson AV, Lowes VL. Functional neural connections of the area postrema. In: Barraco IRA, editor. *Nucleus of the Solitary Tract.* Boca Raton, Florida: CRC Press; 1994. p. 147-57.

- 62 Ferrari AC, Camargo LAA, Saad WA, Renzi A, De Luca Jr LA, Menani JV. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibits water intake in rats. *Brain Res.* 1990; 522: 125-30.
- 63 Fitzsimons JT. The effects of slow infusions of hypertonic solutions on drinking and drinking thresholds in rats. *J Physiol.* 1963; 167: 344-54.
- 64 Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev.* 1998; 78: 585-686.
- 65 Fulwiler CE, Saper BC. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res Rev.* 1984; 7: 229-59.
- 66 Garcia-Estan 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.
- 67 Gilman A. The relation between blood osmotic pressure, fluid distribution and voluntary water intake. *AJP - Legacy.* 1937; 120: 323-8.
- 68 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.
- 69 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.
- 70 Guyenet PG. Neural structures that mediate sympathoexcitation during hypoxia. *Respir Physiol.* 2000; 121: 147-62.
- 71 Haberich FJ. Osmoreceptors in the portal circulation. *Federation Proc.* 1968; 27: 1137-41.
- 72 Haggendal J. On the patterns of blood pressure, heart rate, and blood levels of noradrenaline and adrenaline during haemorrhage in the rat. *Acta Physiol Scand.* 1986; 127: 513-22.
- 73 Haibara AS, Tamashiro E, Olivian MV, Bonagamba LG, Machado BH. Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Auton Neurosci.* 2002; 101: 60-7.
- 74 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.

- 75 Ho JM, Zierath DK, Savos AV, Femiano DJ, Bassett JE, 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.
- 76 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.
- 77 Hosomi H, Morita H. Hepatorenal and hepatointestinal reflexes in sodium homeostasis. *News Physiol Sci.* 1996; 11: 103-7.
- 78 Huang W, Lee SL, Arnason SS, Sjoquist M. Dehydration natriuresis in male rats is mediated by oxytocin. *Am J Physiol.* 1996; 270: R427-33.
- 79 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.
- 80 Hubbard JW, Buchholz RA, Reed K, Nathan MA, Keeton TK. Changes in plasma catecholamines and plasma renin activity during hypotension in conscious rats with lesions of the nucleus tractus solitarii. *J Auton Nerv Syst.* 1988; 22: 97-106.
- 81 Hyde TM, Miselis RR. Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance. *Am J Physiol.* 1984; 247: R173-82.
- 82 Jaworski RL, Blair ML. Lesions of the dorsal noradrenergic bundle augment the renin response to blood loss but do not alter hypothalamic Fos expression. *Brain Res Bull.* 2004; 63: 451-9.
- 83 Jaworski RL, Piekut D, Blair ML. Pregnancy alters lateral parabrachial nucleus but not hypothalamic Fos expression following hypotensive hemorrhage. *Brain Res Bull.* 2002; 57: 595-602.
- 84 Ji LL, Gottlieb HB, Penny ML, Fleming T, Toney GM, Cunningham JT. Differential effects of water deprivation and rehydration on Fos and FosB/DeltaFosB staining in the rat brainstem. *Exp Neurol.* 2007; 203: 445-56.
- 85 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: Springer-Verlag; 1990. p. 149-90.
- 86 Johnson AK, Loewy AD. Circumventricular organs and their role in visceral functions. In: Loewy AD, Spyer KM, editors. *Central regulation of autonomic functions.* New York: Oxford University Press; 1990. p. 247-67.

- 87 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.
- 88 Koshiya N, Guyenet PG. Role of the pons in the carotid sympathetic chemoreflex. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 1994; 267: R508-18.
- 89 Koshiya N, Huangfu D, Guyenet PG. Ventrolateral medulla and sympathetic chemoreflex in the rat. *Brain Res*. 1993; 609: 174-84.
- 90 Kraly FS, Gibbs J, Smith GP. Disordered drinking after abdominal vagotomy in rats. *Nature*. 1975; 258: 226-8.
- 91 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.
- 92 Kraly FS, Kim YM, Tribuzio RA. Renal nerve transection inhibits drinking elicited by eating and by intragastric osmotic loads in rats. *Physiol Behav*. 1995; 58: 1129-36.
- 93 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.
- 94 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.
- 95 Lightman SL, Todd K, Everitt BJ. Ascending noradrenergic projections from the brainstem: evidence for a major role in the regulation of blood pressure and vasopressin secretion. *Exp Brain Res*. 1984; 55: 145-51.
- 96 Lightman SL, Todd K, Everitt BJ, Brown MJ, Causon RC. Ascending brain-stem noradrenergic pathways modulate the renin response to haemorrhage. *Clin Sci*. 1984; 67: 269-72.
- 97 Machado BH. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarius of awake rats. *Ann N Y Acad Sci*. 2001; 940: 179-96.
- 98 Madden CJ, Ito S, Rinaman L, Wiley RG, Sved AF. Lesions of the C1 catecholaminergic neurons of the ventrolateral medulla in rats using anti-D β H-saporin. *Am J Physiol*. 1999; 277: R1063-75.
- 99 Madden CJ, Sved AF. Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 285: H2734-48.

- 100 McKinley MJ, Allen AM, Mathai ML, May C, McAllen RM, Oldfield BJ, Weisinger RS. Brain angiotensin and body fluid homeostasis. *Jpn J Physiol.* 2001; 51: 281-9.
- 101 McKinley MJ, Allen AM, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Sly D, Mendelsohn FA. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2001; 28: 990-2.
- 102 McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci.* 2004; 19: 1-6.
- 103 Menani JV, Colombari DS, Beltz TG, Thunhorst RL, Johnson AK. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. *Brain Res.* 1998; 801: 29-35.
- 104 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.
- 105 Menani JV, Sato MA, Haikel L, Vieira AA, Andrade CAF, da Silva DCF, et al. Central moxonidine on water and NaCl intake. *Brain Res Bull.* 1999; 49: 273-9.
- 106 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.
- 107 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.
- 108 Ohman LE, Johnson AK. Lesions in lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. *Am J Physiol.* 1986; 251: R504-9.
- 109 Ohman LE, Johnson AK. Role of lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake produced by right atrial stretch. *Brain Res.* 1995; 695: 275-8.
- 110 Oliván MV, Bonagamba LGH, Machado BH. Involvement of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. *Brain Res.* 2001; 895: 167-72.
- 111 Palkovits M, Zaborsky L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitary: 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.
- 112 Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* San Diego: Academic Press, Inc; 1986.

- 113 Pedrino GR, Maurino I, de Almeida Colombari DS, Cravo SL. Role of catecholaminergic neurones of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular responses induced by acute changes in circulating volume in rats. *Exp Physiol*. 2006; 91: 995-1005.
- 114 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.
- 115 Pedrino GR, Rosa DA, Korim WS, Cravo SL. Renal sympathoinhibition induced by hyponatremia: involvement of A1 noradrenergic neurons. *Auton Neurosci*. 2008; 142: 55-63.
- 116 Pereira DT, Vendramini RC, David RB, Nozaki PN, Menani JV, De Luca LA Jr. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. *Physiol Behav*. 2002; 76: 501-5.
- 117 Pereira-Derderian DT, Vendramini RC, Menani JV, De Luca Junior LA. Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010.
- 118 Quail AW, Woods RL, Korner PI. Cardiac and arterial baroreceptor influences in release of vasopressin and renin during hemorrhage. *Am J Physiol*. 1987; 252: H1120-6.
- 119 Ricardo JA, Koh ET. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amigdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res*. 1978; 153: 1-26.
- 120 Rocha E Silva, Rosenberg M. The release of vasopressin in response to haemorrhage and its role in the mechanism of blood pressure regulation. *J Physiol*. 1969; 202: 535-57.
- 121 Ruggiero DA, Cravo SL, Arango V, Reis DJ. Central control of the circulation by the rostral ventrolateral reticular nucleus: anatomical substrates. In: Ciriello J, Caverson MM, Polosa C, editors. *Progress in Brain Res*. Elsevier Science Publishers; 1989. p. 49-79.
- 122 Sakai KK, Marks BH, George JM, Koestner A. The isolated organ-cultured supraoptic nucleus as a neuropharmacological test system. *J Pharmacol Exp Ther*. 1974; 190: 482-91.

- 123 Saper BC, 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.
- 124 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.
- 125 Sapru HN. Carotid chemoreflex. Neural pathways and transmitters. *Adv Exp Med Biol.* 1996; 410: 357-64.
- 126 Sato MA, Menani JV, Lopes OU, Colombari E. Commissural NTS lesions and cardiovascular responses in aortic baroreceptor-denervated rats. *Hypertension.* 1999; 34: 739-43.
- 127 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.
- 128 Sawchenko PE, Swanson LW. The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat. *Brain Res.* 1982; 257: 275-325.
- 129 Schreihofner 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.
- 130 Schreihofner AM, Hoffman GE, Sved AF. The kidneys stimulate vasopressin release during hemorrhage in rats with chronic NTS lesions. *Am J Physiol.* 1997; 272: R1540-51.
- 131 Schreihofner AM, Stornetta RL, Guyenet PG. Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat. *J Physiol.* 2000; 529 Pt 1: 221-36.
- 132 Schreihofner AM, Stricker EM, Sved AF. Chronic nucleus tractus solitarius lesions do not prevent hypovolemia-induced vasopressin secretion in rats. *Am J Physiol.* 1994; 267: R965-73.
- 133 Schreihofner AM, Stricker EM, Sved AF. Nucleus of the solitary tract lesions enhance drinking, but not vasopressin release, induced by angiotensin. *Am J Physiol.* 2000; 279: R239-47.

- 134 Scrogin KE. 5-HT_{1A} receptor agonist 8-OH-DPAT acts in the hindbrain to reverse the sympatholytic response to severe hemorrhage. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2003; 284: R782-91.
- 135 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.
- 136 Simpson JB, Epstein AN, Camardo Jr JS. Localization of receptors for the dipsogenic action of angiotensin II in the subfornical organ of rat. *J Comp Physiol Psychol.* 1978; 92: 581-608.
- 137 Snyder DW, Nathan MA, Reis DJ. Chronic lability of arterial pressure produced by selective destruction of the catecholamine innervation of the nucleus tractus solitarii in the rat. *Circ Res.* 1978; 43: 662-71.
- 138 Starbuck EM, Fitts DA. Effects of SFO lesion or captopril on drinking induced by intragastric hypertonic saline. *Brain Res.* 1998; 795: 37-43.
- 139 Stirp F, Barbieri L. Ribosome-inactivating proteins up to date. *FEBS Lett.* 1986; 195: 1-8.
- 140 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.
- 141 Stocker SD, Simmons JR, Stornetta RL, Toney GM, Guyenet PG. Water deprivation activates a glutamatergic projection from the hypothalamic paraventricular nucleus to the rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol.* 2006; 494: 673-85.
- 142 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: R1710-7.
- 143 Stricker EM, Sved AF. Thirst. *Nutrition.* 2000; 16: 821-6.
- 144 Talman WT, Snyder D, Reis DJ. Chronic lability of arterial pressure produced by destruction of A2 catecholaminergic neurons in rat brainstem. *Circ Res.* 1980; 46: 842-53.
- 145 Tanaka J, Miyakubo H, Hayashi Y, Nomura M. Hemorrhage activates catecholaminergic neurons sensitive to GABA in the nucleus of the solitary tract with ascending projections to the subfornical organ in rats. *Auton Neurosci.* 2001; 91: 100-4.

- 146 Tanaka J, Miyakubo H, Nomura S, Sakamaki K, Okumura T, Hayashi Y. GABAergic modulation of neurons in the nucleus of the solitary tract with ascending projections to the subfornical organ in the rat. *Brain Res.* 2001; 888: 184-8.
- 147 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.
- 148 Thunhorst RL, Johnson AK. Effects of arterial pressure on drinking and urinary responses to intracerebroventricular angiotensin II. *Am J Physiol.* 1993; 264: R211-7.
- 149 Thunhorst RL, Johnson AK. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. *Am J Physiol.* 1994; 266: R458-65.
- 150 Toney GM, Chen QH, Cato MJ, Stocker SD. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand.* 2003; 177: 43-55.
- 151 Tucker DC, Saper CB, Ruggiero DA, Reis DJ. Organization of central adrenergic pathways: I. relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J Comp Neurol.* 1987; 259: 591-603.
- 152 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.
- 153 Vardhan A, Kachroo A, Sapru HN. Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1993; 264: R41-50.
- 154 Watson WE. The effect of removing area postrema on the sodium and potassium balances and consumptions in the rat. *Brain Res.* 1985; 359: 224-32.
- 155 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.
- 156 Wrenn CC, Picklo MJ, Lappi DA, Robertson D, Wiley RG. Central noradrenergic lesioning using anti-D β H-saporin: anatomical findings. *Brain Res.* 1996; 740: 175-84.
- 157 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 reservado ao autor)

Araraquara , 13 de agosto de 2010

ANDRE HENRIQUE FREIRIA-OLIVEIRA