NATALIA RIBEIRO

AÇÃO DA VASOPRESSINA NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO SOBRE AS ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE SIMPÁTICA INDUZIDAS POR HIPEROMOLARIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

São Paulo 2013

NATALIA RIBEIRO

AÇÃO DA VASOPRESSINA NO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO SOBRE AS ALTERAÇÕES NA ATIVIDADE SIMPÁTICA INDUZIDAS POR HIPEROMOLARIDADE

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de conhecimento: Fisiologia Humana

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Versão original

São Paulo 2013 DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

reprodução não autorizada pelo autor

Ribeiro, Natalia.

Ação da vasopressina no núcleo paraventricular do hipotálamo sobre as alterações na atividade simpática induzidas por hiperosmolaridade / Natalia Ribeiro. -- São Paulo, 2013.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Fisiologia e Biofísica. Área de concentração: Fisiologia Humana. Linha de pesquisa: Controle central da pressão arterial.

Versão do título para o inglês: Role of vasopressin in the paraventricular hypothalamic nucleus on changes in sympathetic activity induced by hyperosmolality.

 Sistema Nervoso Central
Sistema Cardiovascular
Vasopressinas
Peptídeos
Hipertensão
Antagonistas
Antunes, Prof. Dr. Vagner Roberto II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana
Título.

ICB/SBIB0127/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a):	Natalia Ribeiro.
Título da Disserta	ção: Ação da vasopressina no núcleo paraventricular do hipotálamo sobre as alterações na atividade simpática induzidas por hiperosmolaridade.
Orientador(a):	Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes.
A Comissão Ju em sessão pu	ulgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, ública realizada a/////, considerou
	() Aprovado(a) () Reprovado(a)
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 111 nas fls. 108 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Vagner Roberto Antunes, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "Ação da vasopressina no núcleo paraventricular do hipotálamo nas alterações da atividade simpática induzida por hiperosmolaridade" do qual participam o(s) aluno(s) Natália Ribeiro e o pesquisador Thiago dos Santos Moreira, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 29.08.2011, com validade de 3 anos.

São Paulo, 30 de agosto de 2011.

Prof.Dr.WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador CEUA - ICB/USP

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBE Secretário CEUA – ICB/USP

Dedico este trabalho à minha família, que estiveram ao meu lado em todos os momentos e sempre me incentivaram. Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Universidade de São Paulo pelo suporte aos meus estudos e crescimento profissional, e por ter me proporcionado experiências muito enriquecedoras das quais jamais me esquecerei.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de São Paulo- FAPESP, pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador Prof. Vagner Roberto Antunes por me conduzir através dos meus estudos, pela paciência, dedicação e por dividir comigo seus conhecimentos.

À minhas companheiras de laboratório Izabela, Laís, Helena, Karol, Laiali, por me aguentarem todos os dias, pela valiosa ajuda em diversas ocasiões e por me permitirem crescer profissional e pessoalmente através das experiências vivenciadas com elas.

Um agradecimento especial ao Hidelbrando que foi fundamental no meu período de adaptação ao laboratório e pela dedicação em me ensinar seus conhecimentos e técnicas.

Aos meus pais e irmãos Edson, Claudia, Alexandre e Beatriz pela dedicação, pelo esforço e principalmente por serem uma fonte inesgotável de incentivo e inspiração; sem eles certamente eu não teria chegado até aqui.

Aos meus tios e primos Manoel, Izabel, Izabela e Lucas que me acolheram e possibilitarem que esta experiência fosse uma realidade

Ao meu namorado Rafael por ter tornado essa jornada mais amena, por me incentivar e me aguentar quando tudo dava errado.

Aos meus amigos, novos e antigos; que me acolheram, me ensinaram, me escutaram e tornaram meus dias muito mais animados.

À todos meus colegas do ICB pelas experiências divididas durante as disciplinas e demais momentos.

Enfim, à todos que torceram e torcem por mim.

MUITO OBRIGADA!

RESUMO

Ribeiro N. Ação da vasopressina no núcleo paraventricular do hipotálamo sobre as alterações na atividade simpática induzidas por hiperosmolaridade. [dissertação (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Dentre os diferentes mecanismos que mantém a homeostase biológica, um dos principais é a osmorregulação. Nos mamíferos a osmolaridade deve ser mantida dentro de limites fisiológicos muito estreitos e, desta forma, um sistema de controle refinado é responsável pela manutenção deste parâmetro. O aumento da osmolaridade causa um importante deseguilíbrio hidroeletrolítico capaz de afetar neurovegetativas autônomas e neurohumorais. funcões Diversos estudos demonstram que o aumento da osmolaridade é capaz de causar simpatoexcitação e aumento da pressão arterial, estando o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) envolvido em tal resposta. O PVN caracteriza-se como principal centro integrador das respostas induzidas por estímulos osmóticos. Este núcleo é composto por duas subpopulações de neurônios, os parvocelulares (NPC) envolvidos na regulação da atividade simpática e os neurônios magnocelulares (NMC) que se projetam para a hipófise posterior e são responsáveis pela produção e liberação de vasopressina (VP) tanto sistemicamente como no próprio microambiente neuronal do PVN. Embora o envolvimento do PVN nas respostas hemodinâmicas induzidas pelo aumento da osmolaridade seja amplamente conhecido, os mecanismos pelos quais estas respostas são geradas continuam ainda como objeto de estudo. Neste sentido, estudos apontaram o possível envolvimento da VP com ação neuromoduladora sobre os neurônios do PVN envolvidos com o controle da atividade simpática. Deste modo, o objetivo deste estudo foi investigar o papel da vasopressina, por meio de sua ação no PVN, sobre as alterações na atividade simpática em situações de hiperosmolaridade. Para isso realizamos microinjeções bilaterais de VP no PVN e analisamos as alterações da atividade simpática do nervo lombar (ANSL) por meio do monitoramento dos biopotenciais eletrofisiológicos na preparação in situ de animal decorticado e artificialmente perfundido. Além disso, para investigarmos o papel da VP liberada endogenamente no PVN e seus efeitos na ANSL realizamos microinjeções bilaterais de antagonista de receptores vasopressinérgicos V1a no PVN de ratos submetidos a estímulo hiperosmótico com sobrecarga de sal durante 4 dias. Nossos resultados demonstraram que a VP microinjetada bilateralmente no PVN foi capaz de promover uma aumento significativo na ANSL na dose de 1,0 mM (n=7) (19 \pm 5%). Além disso, os efeitos sistêmicos da adição da mesma dose de VP no perfusato não alterou a ANSL. O antagonismo bilateral dos receptores V1a no PVN em animais submetidos à sobrecarga de sal promoveu uma queda significativa na ANSL, a qual não foi observada em animais normohidratados (n=4) (-20 \pm 6%). O conjunto dos resultados nos permite afirmar que a VP agindo diretamente em neurônios do PVN é capaz de alterar a atividade simpática e, além disso, os receptores V1a deste núcleo desempenham um papel importante na hiperatividade simpática induzida por aumento da osmolaridade e isto pode ter um efeito direto com a hipertensão neurogênica causada por alta ingestão de sal.

Palavras-chave: Vasopressina. PVN. Sistema nervoso central. Hipertensão.

ABSTRACT

Ribeiro N. Role of vasopressin in the paraventricular hypothalamic nucleus on changes in sympathetic activity induced by hyperosmolality. [Masters thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2013.

Among the different mechanisms that maintain the biological homeostasis, osmoregulation is one of the most important. In mammals, osmolarity should be maintained between very close physiological limits: in this way, a very rigid control system is responsible of the maintenance of this parameter. The osmolarity increase is an important hydroelectrolitic unbalance capable of affecting autonomic neurovegetative and neurohumoral functions. Diverse studies demonstrate that osmorality increase is capable of causing simpatoexcitação and increase arterial pressure, being involved the paraventricular hypothalamic nucleus (PVN) in this response. PVN is characterized as the main integrating center of the induced responses by osmotic stimulation. This nucleus is composed of two neuronal subpopulations, the parvocentular neurons (NPC) involved in sympathetic activity regulation and magnocellular neurons (NMC) that are projected to the posterior pituitary and are responsible of production and liberation of vasopressina (VP) peripherally and in the PVN neuronal microenvironment. Although the PVN involvement in the hemodynamic responses induced by the osmorality increase is widely known, the mechanisms by which these responses are generated are still not understood. In this way, studies pointed a possible involvement of the VP in this process, through an neuromodulatory action over the PVN neurons involved with sympathetic activity control. In this way, the aim of this study was to investigate the role of the vasopressina, through its action in the PVN, over the alterations in the sympathetic activity induced by hiperosmolaridade. For this, bilateral VP microinjections were performed in the PVN and the sympathetic activity alterations in the lumbar simpathetic nerve activity nerve (LSNA) were analyzed by monitoring the electro-physiological signs. In addition, to investigate the role of endogenously released VP in PVN and their effects on LSNA, vasopressinérgico V1a antagonist were microinjected into PVN of rats submitted to hyperosmotic stimulation with salt overload for 4 days. The results showed that bilateral micro injected VP in the PVN is able of alter significatevily the ANSL with the 1,0mM dose; also, the systemic effectt of the VP addition into perfusate not seem to affect the ANSL, since its addition to the ACSF did not alter the variable. The bilateral block of the V1a receptors into PVN of animals subjected to osmotic stimulus showed a decrease in sympathetic activity not observed in normohydrated animals. Overall, the results allow to assert that the centrally released VP plays an important role in the development of the simpatoexcitation raised by increased osmolarity, through an action on the PVN neurons themselves.

Keywords: Vasopressin. PVN. Central Nervous System. Hypertension.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Representação esquemática do modelo animal experimental de animal decorticado e artificialmente perfundido (DAP)......22

Figura 5- Efeitos da VP (0,5 mM) injetada bilateralmente no PVN e adicionada a solução de perfusão, sobre a ANSL (**A**) e pressão de perfusão (**B**)......35

Figura 7- Alterações da ANSL (**A**) e da pressão de perfusão (**B**) resultantes da microinjeção bilateral de VP 1,0 mM no PVN e da adição á solução de perfusão....38

Figura 12- Fotomicrografia de uma secção coronal do hipotálamo mostrando o centro da microinjeção bilateral no PVN (cabeça de seta)......43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ACSF- fluido cerebroespinal artificial
- ANOVA- análise de variância
- ANF- atividade nervo frênico
- ANS- atividade nervo simpático
- ANSL- atividade do nervo simpático lombar
- ANSR- atividade do nervo simpático renal
- CIML- coluna intermediolateral da medula espinal
- CVOs- órgãos circunventriculares
- CRH- hormônio liberador de corticotrofina
- **DAP-** preparação de rato decorticado e artificialmente perfundido
- FC- frequência cardíaca
- GABA- ácido gama-aminobutírico
- GLT-1- transportador glutamatérgico subtipo 1
- **L-NAME-** N_{ω} -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride
- NPC- Neurônios parvocelulares
- NMC- Neurônios magnocelulares
- NO- óxido nítrico
- OT- oxitocina
- OVLT- órgão vasculoso da lâmina terminal
- Pper- pressão de perfusão
- PVN- núcleo paraventricular do hipotálamo
- RVLM- bulbo ventrolateral rostral
- SFO- órgão subfornicial
- **SNA-** sistema nervoso autonômico
- SNC- sistema nervoso central
- TRH- hormônio liberador de tirotrofina
- VP- vasopressina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Osmolaridade e sua regulação	13
1.2 Hiperosmolaridade e controle da pressão arterial	16
1.3 O papel do PVN na simpatoexcitação induzida por hiperosmolaridade	17
1.4 Vasopressina como neuromodulador	19
2 HIPÓTESE	22
3 OBJETIVOS	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1 Animais experimentais	24
4.2 Estudos na preparação in situ de rato decorticado e artificialmente perfui (DAP)	n dido 24
4.3 Monitoramento dos sinais eletrofisiológicos	26
4.4 Utilização de L-NAME como agente vasoativo na solução de perfusão	26
4.5 Microinjeções intracerebrais	27
4.6 Relação de fármacos utilizados	28
4.7 Estímulo osmótico crônico com sobrecarga de sal	28
4.8 Análise histológica	28
4.9 Análise dos dados e estatística	29
5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	30
5.1 Validação dos registros eletroneurográficos e padronização do uso de L- N como agente vasoativo na DAP	IAME 30
5.2 Avaliação dos efeitos centrais da microinjeção de VP no PVN sobre a ANSL	30
5.3 Avaliação dos efeitos periféricos da VP sobre a ANSL	31
5.4 Avaliação das alterações na ANSL decorrente do antagonismo dos receptores no PVN de animais submetidos à sobrecarga de sal	s V1a 31
5.5 Avaliação das alterações na ANSL decorrente do antagonismo dos receptores no PVN de animais normohidratados	s V1a 32
6 RESULTADOS	33
6.1 Validação dos registros eletroneurográficos e padronização do uso de L-N como agente vasoativo na DAP	IAME 33
6.2 Efeitos centrais e periféricos da VP (0,5 mM) sobre a ANSL	35
6.3 Efeitos centrais e periféricos da VP (1.0 mM) sobre a ANSL	36
6.4 Comparativo entre as alterações ANSL causadas pela microinjeção de diferences de VP no PVN	entes 38

6.5 Alterações na ANSL decorrentes da microinjeção de antagonista V1a de V de animais submetidos à sobrecarga de sal e normohidratados	VP no PVN 39
6.6 Fotomicrografia do sítio de microinjeção no PVN	42
7 DISCUSSÃO	44
7.1 O L-NAME afeta a ANSL na preparação DAP	44
7.2. A VP é capaz de evocar simpatoexcitação através de sua ação no PVN	46
7.3 O antagonismo de receptores vasopressinergicos V1a diminui a ANSL submetidos a estímulo osmótico	. em ratos 50
8 CONCLUSÃO	52
REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

A homeostase biológica é definida como a capacidade de um organismo regular seu meio interno mantendo uma condição estável mediante o recrutamento de diferentes mecanismos que permitem a eficiência de seu funcionamento (Cannon, 1932). Dentre os diferentes mecanismos que mantém a homeostase, um dos principais é a regulação da quantidade de água e sais minerais no organismo, conhecida como osmorregulação. O aumento da osmolaridade é capaz de afetar funções neurovegetativas autônomas e neurohumorais que, por sua vez, são capazes de desencadear alterações em diversos parâmetros funcionais, dentre eles os níveis de pressão arterial.

1.1 Osmolaridade e sua regulação

Em um organismo composto por aproximadamente 70-75% de água, juntamente com diferentes eletrólitos, é de fundamental importância para o bom funcionamento celular a manutenção de um rígido equilíbrio hidroeletrolítico. A quantidade de partículas osmoticamente ativas, ou soluto, (eletrólitos, proteínas) dissolvidas em um determinado solvente é denominada osmolaridade. Nos mamíferos a osmolaridade deve ser mantida dentro de limites fisiológicos muito estreitos, entre 280–295 mOsmol/L, resultante da ingestão, absorção e excreção de água e eletrólitos.

A importância da manutenção da osmolaridade em seus níveis basais se deve a propriedades ligadas ao conceito osmose. A osmose caracteriza-se como o movimento de água, através de uma membrana semipermeável, entre meios com diferentes concentrações de soluto; sendo este movimento direcionado do meio de menor concentração de soluto (hipotônico) para o meio com maior concentração de soluto (hipertônico). As membranas celulares, que separam o meio intra do meio extracelular são membranas semipermeáveis, ou seja, permitem a livre movimentação de moléculas de água e retêm a passagem de soluto. Desta forma, segundo os princípios da osmose, se houver um aumento da osmolaridade plasmática, por aumento da concentração plasmática de soluto, a água contida no interior das células tenderá a mover-se para o meio hipertônico extracelular, ocasionando a retração do volume celular; por outro lado, a diminuição da osmolaridade plasmática levaria ao movimento de água no sentido contrário, para dentro da célula, gerando aumento do volume celular. Tanto a retração quanto o aumento do volume celular são extremamente prejudiciais e afetam tanto a integridade como as funções celulares. Desta forma, a osmolaridade possui um refinado sistema de controle formado por receptores capazes de reconhecer rapidamente as alterações deste parâmetro e transmitir a informação a centros de controle neuronais responsáveis por gerar respostas que visam redirecioná-la a valores basais.

Uma das alterações da osmolaridade é a hiperosmolaridade; um desequilíbrio hidroelétrolítico no qual se observa elevação da osmolaridade decorrente da concentração aumentada de solutos no plasma. Este desequilíbrio pode ser resultado do déficit de água (por baixa ingestão ou perdas anormais) e/ou do aporte excessivo principalmente de sódio, visto ser este o principal (on envolvido na determinação da osmolaridade plasmática. Esta alteração é rapidamente detectada por células especializadas difusamente distribuídas denominadas osmorreceptors; estas estruturas localizam-se tanto perifericamente, quanto no sistema nervoso central (SNC) e são responsáveis por detectar a osmolaridade do plasma e do líquido cerebrospinal e gerar informações sobre o estado desta variável.

Os osmorreceptores periféricos encontram-se principalmente na região da veia porta hepática; estes receptores são capazes de reconhecer alterações da osmolaridade e enviar aferências ao SNC através, principalmente, do nervo vago (Adachi et al., 1976; Chwalbińska-Moneta, 1979; Xiong et al., 2011). Já os osmorreceptores centrais encontram-se muito próximos às paredes dos ventrículos cerebrais em locais desprovidos de barreira hematoencefálica, denominados órgãos circunventriculares (CVOs) (Bourque, Oliet, 1997; Kizer et al., 1976; Thrasher, 1985; Weindl, 1973). Assim, por estar em contato direto com o líquido cerebrospinal, os osmorreceptores centrais são capazes de detectar alterações da osmolaridade do mesmo. A transdução da informação do aumento da osmolaridade nos osmorreceptores é um processo mecânico no qual a retração do volume celular, ocasionado pela perda de água devido ao aumento da osmolaridade no líquido

cerebroespinal, gera a abertura de canais catiônicos, o que causa despolarização e excitação dos osmorreceptores, alterando seu padrão de disparos (Bourque, 2008). Os "sinais" gerados são então transmitidos para outros sítios do SNC; já sendo bem estabelecido na literatura científica que os CVOs mantêm conexões diretas com diferentes núcleos (Miselis, 1981; Simerly et al., 1988), dentre eles com o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN).

O PVN é uma importante região integradora da função autônoma e neuroendócrina desempenhando um papel fundamental na manutenção da homeostase dos fluidos corporais e sendo, juntamente com o núcleo supraóptico (SON), o local da síntese de vasopressina (VP) e oxitocina (OT). O PVN é composto por duas subpopulações de neurônios: os parvocelulares (NPC) e os magnocelulares (NMC). Os NPC apresentam corpos celulares menores quando comparados aos NMC e concentram-se na região medial do núcleo, mais próximos ao terceiro ventrículo (van den Pol, 1986); são responsáveis pela síntese de hormônios que incluem o hormônio liberador de tirotrofina (TRH) e o hormônio liberador de corticotrofina (CRH) (Ghamari-Langroudi et al., 2010; Lennard et al., 1993), os quais são transportados até a hipófise anterior, através das projeções dos NPC para esta glândula, de onde são liberados para a circulação sistêmica. Além NPC disso. OS possuem projeções e fazem sinapse com neurônios simpatoexcitatórios pré-motores localizados no bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e/ou neurônios do sistema nervoso simpático pré-ganglionares da coluna intermediolateral (CIML) da medula espinhal, duas importantes áreas de regulação da atividade simpática (Cechetto, Saper, 1998; Pyner, Coote, 1999; Stocker et al., 2004a). Já os NMC encontram-se, em sua maioria, distribuídos lateralmente no PVN, e possuem projeções para a hipófise posterior, ou neurohipófise, sendo responsáveis pela síntese e liberação de VP e OT tanto na circulação sistêmica bem como no próprio microambiente neuronal (Bergquist, Ludwig, 2008; Landgraf, Ludwig, 1991; Pow, Morris, 1989).

As alterações da osmolaridade plasmática detectadas pelos neurônios localizados nos CVOs estimulam os NMC do PVN responsáveis pela síntese e liberação da vasopressina. A VP liberada sistemicamente pela hipófise posterior, age nos receptores do subtipo V1 localizados no leito vascular causando

vasoconstricção, com consequente aumento da resistência periférica total e da pressão arterial. Além disso, a VP se liga a receptores renais do subtipo V2 acoplados à adenil ciclase via proteína G, aumentando os níveis intracelulares de AMPc, o que ativa a proteinocinase A e promove a inserção de vesículas contendo aquaporina 2 na membrana apical das células, aumentando a permeabilidade do ducto coletor à água e assim a reabsorção da mesma; visando restabelecer da osmolaridade em seus níveis basais. Além disso, nos rins a VP age também aumentando a permeabilidade da porção medular do ducto coletor à uréia e estimulando a reabsorção de NaCl pelo ramo ascendente espesso da alça de Henle.

Diversas situações são capazes de desestabilizar o equilíbrio hidroeletrolítico e gerar o aumento da osmolaridade. Em todas estas situações o balanço entre a quantidade de água e eletrólitos no organismo encontra-se afetado, com o aumento da concentração dos últimos. A diminuição do volume de água pode ser observada em várias ocasiões que incluem desde a própria privação hídrica, até perdas anormais como durante vômitos e diarréia ou mesmo em alterações renais que diminuam sua recaptação. O diabetes insipidus, por exemplo, é uma condição resultante da deficiência na produção de VP ou da falha de sua ação nos rins, o que leva a incapacidade de concentrar a urina com consequente desenvolvimento de urina hipotônica e aumento de volume de água excretado, levando ao desenvolvimento da hiperosmolaridade plasmática. Já o aumento do aporte de soluto na maioria das vezes se dá por sobrecarga de sal, por seu consumo em excesso; podendo também estar relacionado à retenção do mesmo.

1.2 Hiperosmolaridade e controle da pressão arterial

Está bem estabelecido na literatura científica que distúrbios na osmolaridade são capazes de afetar as funções do sistema nervoso autônomo (SNA). Neste sentido, diversos estudos demonstram uma estreita interação entre o aumento da osmolaridade e a elevação da pressão arterial, com o envolvimento do SNA nesta resposta (Bunag, Miyajima, 1984).

Em 1989 Garcia- Estan e seus colaboradores demonstraram que o aumento da pressão arterial causada pela infusão de salina hipertônica em ratos era apenas parcialmente revertido pela administração sistêmica prévia do antagonista de receptores vasopressinergicos V1; no entanto, a administração prévia deste mesmo antagonista combinado ao antagonista ganglionar hexametônio abolia completamente a resposta pressora gerada pelo estímulo osmótico; apontando, desta forma, que a elevação da pressão arterial seria resultado não somente da vasoconstrição gerada pela VP liberada sistemicamente, como também apresentava um componente simpático associado. Ao encontro destas observações estão os achados de Antunes et al. (2006) que demonstraram, em ratos acordados, que a hipertensão causada pela infusão de salina hipertônica sistêmica foi atenuada pelo prévio antagonismo dos receptores alfa-1 adrenérgicos vasculares, indicando a participação ativa do sistema nervoso simpático na resposta pressora induzida por hiperosmolaridade.

Já o registro da atividade dos nervos simpáticos fornece evidências diretas da simpatoexcitação gerada pelo aumento da osmolaridade. O registro do nervo simpático lombar demonstra que a hiperosmolaridade é capaz de aumentar a atividade deste nervo em ratos submetidos a diferentes tipos de estímulo osmótico como a infusão sistêmica ou intravenosa de solução hiperosmótica ou mesmo a privação hídrica (Antunes et al., 2006; Scrogin et al., 1999; Weiss et al., 1996).

Embora se conheça os efeitos da hiperosmolaridade, o mecanismo pelo qual este desequilíbrio é capaz de afetar a atividade simpática e, consequentemente a pressão arterial, é uma questão que permanece pouco esclarecida. Neste sentido, algumas descobertas apontam o PVN como um importante núcleo envolvido neste processo.

1.3 O papel do PVN na simpatoexcitação induzida por hiperosmolaridade

Como discutido anteriormente, o PVN é um importante núcleo integrador da atividade neuroendócrina e autonômica. Desta forma, este núcleo desempenha um importante papel nas alterações geradas pelo aumento da osmolaridade com diversas evidências apontando seu envolvimento nas respostas simpáticas evocadas frente a este desequilíbrio.

O aumento da osmolaridade é capaz de ativar as células do PVN diretamente ou através dos osmorreceptores localizados nos CVOs. De fato, observa-se que a injeção intravenosa de salina hipertônica é capaz de gerar o aumento da expressão de Fos em neurônios do órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT) e do núcleo subfornicial (SFO) que se projetam para o SON e PVN. Por outro lado, a remoção do SFO e do OVLT diminui a expressão Fos evocada no PVN em resposta ao estímulo hipertônico (Toney et al., 2003). Além disso, em adição a ativação sináptica, os NMC do PVN e SON possuem osmosensibilidade intrínseca (Bourque, 1998); já tendo sido demonstrado, através de tecnicas de patch-clamp, que a estimulação direta dos NPC e NMC com salina hipertônica é capaz excitar diretamente e aumentar a freqüência de disparos de potenciais de ação nestes neurônios (Chu et al., 2010; Qiu et al., 2004).

Uma vez ativados, os neurônios do PVN são capazes de desencadear tanto a liberação de VP, pelos NMC, quanto alterações da atividade simpática, através das projeções dos NPC. Diversos estudos demonstraram claramente o papel fundamental do PVN na simpatoexcitação induzida pelo aumento da osmolaridade. Observou-se que lesões do PVN são capazes de reduzir a resposta pressora evocada pela estimulação do SFO (Ferguson, Renaud, 1984; Gutman et al., 1985). Além disso, a inibição do PVN é capaz de diminuir significantemente o aumento da ANSL e da pressão arterial induzidos por estímulo hiperosmótico (Antunes et al., 2006; Stocker et al., 2004b).

As vias pelas quais o PVN é capaz de alterar a atividade simpática em situações de aumento da osmolaridade parecem envolver as projeções dos NPC para a CIML e o RVLM. Neste sentido, Stocker et al. (2004a) demonstraram que os NPC do PVN com projeções para a CIML e o RVLM, são ativados em resposta a hiperosmolaridade gerada por privação hídrica. Outros estudos demonstraram que a infusão de salina hipertônica intra-carótida gera o aumento do padrão de disparos dos NPC que se projetam para o RVLM (Toney et al., 2003). Já, Antunes et al. (2006), observaram que a simpatoexcitação induzida pelo aumento da osmolaridade depende, em parte, da liberação de VP, através de projeções hipotalâmicas, nos neuronios pré-ganglionares simpáticos da medula espinhal.

Tendo em vista a importância do PVN na regulação da atividade simpática, principalmente frente a alterações na osmolaridade, a integração entre diferentes neurotransmissores/neuromoduladores neste núcleo poderia contribuir para um controle muito refinado da atividade simpática. Neste sentido, evidências recentes indicam a VP como um possível neurotransmissor/neuromodulador envolvido neste controle durante aumento da osmolaridade.

1.4 Vasopressina como neuromodulador

A VP é um neuromodulador e um hormônio peptídeo formada por nove aminoácidos. É sintetizada nos NMC do PVN e do SON como uma molécula muito maior que inclui além do hormônio em si, sua proteína carreadora, neurofisina e uma glicoproteína; sendo seu gene estrutural atribuído ao cromossomo 20 (Riddell et al., 1985). Como hormônio a VP sintetizada é empacotada em vesículas neurosecretórias e então transportada através do axônio dos NMC até a hipófise posterior onde é armazenada ou diretamente secretada na corrente sanguínea. Além disso, a VP é também liberada no próprio microambiente neuronal através da exocitose de vesículas a partir dos dendritos dos NMC (Ludwig, Leng, 2006; Pow, Morris, 1989).

Assim como acontece em sua liberação sistêmica, o aumento da osmolaridade é um importante estímulo para a liberação central de VP (Landgraf, Ludwig, 1991; Ludwig et al., 1994). Embora ambas as liberações sejam desencadeadas pelo aumento da osmolaridade, o controle de cada uma delas parece ser diferenciado. Neste sentido, o estímulo osmótico sistêmico, através de infusão de salina hipertônica, é capaz de desencadear a liberação de VP tanto na circulação sanguínea quanto no SON; no entanto, observou-se que a liberação central apresenta um início muito mais tardio e prolongado quando comparada a liberação na corrente sanguínea (Ludwig et al., 1994).

A VP liberada centralmente é um neuropeptídeo; diferentemente dos neurotransmissores clássicos como GABA e glutamato, que são "empacotados" em pequenas vesículas sinápticas e apresentam uma rápida degradação; os neuropeptídeos são "empacotados" em vesículas maiores e apresentam uma meia-

vida longa, podendo se difundir para outros sítios distantes do local de sua liberação, não sendo limitados espacial ou temporalmente por rápida degradação; o que lhes confere a habilidade de modular a função de grupos neuronais inteiros (Ludwig, Leng, 2006).

No microambiente neuronal a VP age por meio da ativação de receptores metabotrópicos principalmente do subtipo V1a, os receptores vasopressinérgicos deste subtipo são os mais abundantes no cérebro, apresentando uma distribuição bastante difusa (Zing, 1996); contudo, a presença de receptores do subtipo V1b também tem sido descrita em várias estruturas como no, bulbo olfatório, no SON e no hipotálamo (Raggenbass, 2008; Vaccari, 1998). A ligação da VP aos receptores vasopressinérgicos desencadeia a ativação de diferentes vias intracelulares, como a via da fosfolipase C e da adenilato ciclase (Sabatier, 1998).

Uma das funções da liberação dendrítica dos neuropeptídeos parece ser a regulação da função de suas próprias células de origem numa espécie de feedback (Ludwig, Leng, 2006). De fato, a VP apresenta diversos efeitos sobre a atividade dos próprios NMC, sendo capaz de regular o padrão de disparos destas células (Brown, Bourque, 2004; Gouzènes et al., 1998). Além disso, neurônios vasopressinergicos possuem receptores de VP e sua ativação induz a liberação dendrítica de mais VP (Ludwig, Leng, 2006). A VP possui ainda a capacidade de afetar a atividade de outros grupos neuronais causando, por exemplo, a despolarização de neurônios pré-ganglionares simpáticos da medula espinhal e excitação dos neurônios do RVLM (Ma, Dun, 1985; Yang et al., 2001)

Embora a liberação dendrítica de VP no PVN seja largamente conhecida, seu papel funcional sobre os neurônios deste núcleo ainda são pouco compreendidos. Sendo assim, a VP liberada centralmente poderia atuar sobre a atividade dos NPC do PVN e, consequentemente, desempenhar um papel sobre a modulação do controle autônomico. De fato, estudos recentes indicam que esta interação poderia ser um dos mecanismos envolvidos nas alterações do sistema nervoso simpático, geradas pelo PVN durante a hiperosmolaridade.

Um exemplo são os estudos conduzidos por Kato et al. (2009) que investigaram indiretamente , por meio da imunorreatividade da proteína Fos, a ativação neuronal em diferentes subdivisões do PVN frente a um estímulo osmótico central antes e após o tratamento com antagonista de receptores vasopressinergicos V1. Estes autores demonstraram que após o pré- tratamento com antagonista V1, os NPC demonstraram maior reatividade à proteína Fos em resposta estímulo osmótico, enquanto nos NMC esta resposta foi diminuída; sugerindo assim que a VP poderia desempenhar um papel inibitório sobre os NPC e um papel excitatório sobre os NMC em situações de aumento da osmolaridade. Por outro lado, Son et al. (2013) demonstraram resultados opostos aos apresentados por Kato, visto estes autores observaram que a aplicação de VP em neurônios pré-simpático marcados retrogradamente do RVLM para o PVN, foi capaz de causar despolarização da membrana e aumento da frequência de disparos destes neurônios.

Dada a importância das alterações observadas como resultado do desequilíbrio da osmolaridade são grandes os esforços empreendidos no sentido de elucidar como a hiperosmolaridade pode afetar uma variável funcional tão importante como a pressão arterial. Os recentes indícios de que um possível papel da VP sobre a atividade dos NPC do PVN suscitou a questão se não seria este um dos mecanismos envolvidos nas alterações da atividade simpática, promovidas pelo PVN, durante o aumento da osmolaridade, que consequentemente afetariam a pressão arterial.

2 HIPÓTESE

Visto que a atividade simpática deve ser finamente controlada a fim de se manter o funcionamento ideal do organismo, é de extrema importância compreender como a integração neuronal e seus mecanismos podem modulá-la.

Como já está bem estabelecido, a hiperosmolaridade é capaz de elevar a pressão arterial através da simpatoexcitação; e as recentes descobertas da ação direta e indireta da VP sobre os NPC do PVN, indicam ser este um possível mecanismo envolvido no desenvolvimento desta resposta. Sendo assim, nossa hipótese de estudo foi que a vasopressina liberada no PVN poderia agir sobre os neurônios deste mesmo núcleo e desempenhar um papel relevante na modulação do controle autonômico, estando envolvida nas alterações simpáticas observadas em situações de aumento da osmolaridade.

Em face das evidências anteriormente descritas, o presente trabalho teve como objetivos:

- Investigar se a vasopressina exógena aplicada diretamente no PVN exerceria algum papel funcional sobre a atividade basal do nervo simpático lombar;
- Avaliar a possível ação da vasopressina liberada endogenamente, em resposta a estímulo osmótico, sobre as alterações na atividade simpática induzidas pela hiperosmolaridade.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais experimentais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (3-4 semanas de vida) pesando de 60-80 g. Todos os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo. Os mesmos foram mantidos no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP em gaiolas coletivas sob condições favoráveis de temperatura (22±1 °C), umidade relativa do ar (40-50%) e ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso à água e ração (Nuvilab[®]). Os protocolos apresentados neste projeto foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética e Uso Animal (CEUA) do ICB-USP (protocolo #111, pag. 108, vol. 2, 2011).

4.2 Estudos na preparação in situ de rato decorticado e artificialmente perfundido (DAP)

Todos os experimentos foram realizados no modelo de animal decorticado e artificialmente perfundido (DAP, figura 1) em ratos Wistar com 3-4 semanas de vida (~80g). A viabilidade para estudos fisiológicos deste modelo experimental encontram-se em detalhes em Antunes et al. (2006).

Figura 1 - Representação esquemática do modelo animal experimental de animal decorticado e artificialmente perfundido.



ANF: atividade do nervo frênico; ANS: atividade do nervo simpático e pressão de perfusão.

Neste modelo experimental os animais foram anestesiados profundamente com halotano (5%) e o nível de anestesia verificado por meio de pinçamento da pata posterior e reflexo de retirada. Após completa anestesia do animal foi executada uma laparotomia mediana e o estômago, o intestino e o baço foram ligados e removidos. A seguir, a caixa torácica foi aberta para exposição do coração e administração de uma dose de heparina (250 UI/100 µL) no ventrículo cardíaco esquerdo. Logo após, o pericárdio e o timo foram removidos. Na sequência o animal foi submerso em uma solução resfriada de Ringer (em mM: NaCl 125, NaHCO₃ 24, KCl 5, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,25, KH₂PO₄ 1,25, dextrose 10) e os hemisférios cerebrais foram expostos após a remoção dos ossos parietais. O córtex cerebral, o hipocampo e áreas talâmicas foram removidos com cautelosa aspiração por meio de uma bomba de vácuo. A área pré-óptica e seus núcleos septais adjacentes, assim como o hipotálamo, foram mantidos intactos. A pele do animal foi retirada e o mesmo transferido para a câmara de registro. Uma cânula de dois lumens foi introduzida no arco aórtico via uma incisão no ventrículo esquerdo. A preparação foi perfundida com fluxo de 28±2 mL/min usando uma bomba peristáltica (Watson Marlow 505S) com solução de Ringer contendo um agente oncótico (Ficoll 70, 1,25%; Sigma, St Louis, EUA), gaseificada com mistura carbogênica (95% O₂ e 5% CO₂), aquecida a 32°C e filtrada com filtro de nylon (tamanho do poro: 25 µm). Após a recuperação dos movimentos respiratórios, foi adicionado ao perfusato um bloqueador neuromuscular (brometo de vecurônio, 40 µg/mL, Cristália, SP, Brasil) para estabilizar a preparação. O segundo lúmen da cânula estava conectado a um transdutor de pressão e foi usado para monitorar a pressão de perfusão. O nervo frênico foi isolado, cortado e sua atividade registrada na sua extremidade distal usando um eletrodo bipolar de vidro de sucção fixado em um micro-manipulador 3D. O padrão de despolarização em rampa do nervo frênico serviu de índice fisiológico contínuo da viabilidade da preparação. A cadeia simpática lombar (L2-L3) foi visualizada com o auxílio de um estereomicroscópio binocular (Leica MZ6), e a porção pós-ganglionar do ramo simpático foi isolada e seccionada para registro da ANSL na sua extremidade distal por meio de um eletrodo bipolar de vidro de sucção fixado em um micro-manipulador 3D.

4.3 Monitoramento dos sinais eletrofisiológicos

A aquisição dos dados da preparação *in situ* foi feita usando uma interface analógico-digital A/D CED 1401 (CED, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Reino Unido) e armazenados em um computador operando o software Spike 2 (CED) com um *script* padrão para a aquisição dos dados e análises *on-line* e *off-line*. A ANSL foi exibida com uma constante de tempo de 100 milissegundos. Para a padronização e normalização dos dados entre as preparações as alterações na ASNL foram expressas em porcentagem a partir do valor basal. O ruído da linha de base foi determinado pela aplicação de um bloqueador ganglionar (hexametônio) ao final do experimento.

4.4 Utilização de L-NAME como agente vasoativo na solução de perfusão

A preparação DAP exige que um agente vasoativo seja utilizado a fim de manter uma pressão de perfusão ótima que permita a viabilidade do experimento e comumente utiliza-se a vasopressina (5 µM) adicionada ao ACSF como a substância

vasoativa de escolha. Contudo, para afastar a possibilidade de qualquer interferência nos resultados, uma vez que os protocolos envolveriam a microinjeção de agonista e antagonista de VP diretamente no PVN, decidimos testar a possibilidade de utilizar o N_{ω} -Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride (L-NAME) como substância vasoativa. O L-NAME é um inibidor da enzima responsável pela síntese de oxido nítrico (NO) e atua inibindo a vasodilatação e, no caso da preparação DAP, foi utilizado para manter o tônus vascular permitindo que a pressão de perfusão fosse adequada durante todo o experimento. O L-NAME foi utilizado na concentração de 10 mM e adicionado com um volume de 50 μ L ao ACSF, os quais foram padronizados por meio de experimentos de padronização realizados em nosso laboratório.

4.5 Microinjeções intracerebrais

Após a estabilização dos registros eletroneurográficos (frênico e ANSL) a cabeça do animal foi fixada, por meio de barras auriculares e um grampo nasal, a uma câmara acrílica de perfusão pré-fabricada para microinjeções estereotáxicas e adaptada para aplicação desta técnica experimental. Para microinjeções realizadas no PVN, a cabeça foi posicionada de forma que a superfície dorsal do hipotálamo se mantivesse plana durante todo o experimento. As coordenadas estereotáxicas do PVN foram previamente estabelecidas por Antunes et al. (2006) tendo como referências anatômicas o colículo superior (2,7 mm rostral, 0,3 mm lateral à linha mediana) e a superfície cerebral (3,4 mm ventral). Uma micropipeta multi-canal de vidro (diâmetro externo da ponta: 10 a 30 µm) previamente confeccionada com três capilares foi direcionada para o PVN toram bilaterais e sempre no volume de 100 nL (para cada lado) determinado pela observação do movimento do menisco através de um microscópio binocular com um retículo ocular graduado e précalibrado.

4.6 Relação de fármacos utilizados

Os seguintes fármacos foram utilizados neste estudo:

- [Arg⁸]-Vasopressin acetate salt; 5 µM adicionada ao ACSF e 0,5 e 1,0 mM para microinjeções no PVN;
- [(B-mercapto-B, B-cyclopentamethylene-propionlyl1, O-Me-Tyr 2, Arg 8)vasopressin: 1mg/kg; antagonista dos receptores V1a de vasopressina;
- *N*_ω-Nitro-L-arginine methyl ester hydrochloride: 10 mM; inibidor da óxido nítrico sintase;
- Hexamethonium chloride: 30 mg/kg; antagonista dos receptores nicotínicos colinérgicos (bloqueador ganglionar da cadeia paravertebral simpática);

Todos os fármacos foram adquirido da Sigma-Aldrich[©] (St. Louis, MO, EUA) e dissolvidos em solução fisiológica estéril (154 mM) e com pH ajustado para valores próximos de 7,4.

4.7 Estímulo osmótico crônico com sobrecarga de sal

Para realização do protocolo de estímulo osmótico crônico foi oferecido aos animais solução salina NaCl 2,0% em substituição a água de beber, durante 4 (quatro) dias prévios à realização dos experimentos. Os mesmos foram mantidos nas mesmas condições de alojamento no Biotério de Experimentação Animal do Departamento de Fisiologia e Biofísica do ICB-USP em gaiolas coletivas sob condições favoráveis de temperatura (22±1 °C), umidade relativa do ar (40-50%) e ciclo claro-escuro de 12 h, com livre acesso à água e ração (Nuvilab[®]).

4.8 Análise histológica

Ao final de cada experimento de microinjeções no PVN foi aplicado no mesmo sítio de injeção o corante Azul de Evans 2% (Vetec, Química Fina Ltda, RJ, Brasil). O encéfalo do animal foi removido e fixado em solução de paraformaldeído 4% (PFA) em tampão salina-fosfato (PBS) 0,1 M com 20 % de sacarose para procedimento de análise histológica e determinação dos sítios específicos das microinjeções. Apenas os animais que apresentaram marcação (corante e/ou trajeto da microinjetora) no PVN foram considerados na análise dos resultados da microinjeção de VP neste núcleo.

4.9 Análise dos dados e estatística

Para a análise dos sinais biológicos (ANSL e pressão de perfusão) foram utilizados cursores distribuídos ao longo dos registros eletrofisiológicos. O primeiro cursor foi fixado 5 min antes da realização da microinjeção de VP (valor basal controle) e os demais cursores foram distribuídos a cada 5 min no intervalo total de 20 min após a microinjeção. Para a ANSL e pressão de perfusão foram analisadas as médias dos valores (µV e mmHg) e em seguida foram normalizados percentualmente em relação ao basal.

A análise estatística foi avaliada utilizando o programa Statisca 7. Foi aplicada a análise de variância para medidas repetidas de uma via (ANOVA) e quando houve significância estatística utilizou-se o pós-teste de Tukey pareado para múltiplas comparações. Os dados estão representados como média \pm epm (erro padrão da média). O nível de significância foi fixado com *p*≤0,05 e "*n*" é número de preparações utilizadas.

5 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

5.1 Validação dos registros eletroneurográficos e padronização do uso de L-NAME como agente vasoativo na DAP

Este protocolo teve como objetivo avaliar se o L-NAME adicionado à solução de perfusão ACSF poderia ser um agente vasoativo de escolha para ser utilizado na DAP, e se este não causaria alterações no padrão dos biopotenciais, principalmente da ANSL a ser avaliada. Para isso, antes do início da perfusão artificial do animal experimental o L-NAME foi adicionado à solução de ACSF na concentração de 10 mM a um volume de 50 µL. Após completa estabilização dos registros eletroneurográficos (atividade do nervo frênico e atividade simpática lombar) foram coletados os sinais durante pelo menos 30 min e ao final adicionou-se ao ACSF o bloqueador ganglionar hexametônio na dose e concentração de 0,5 mL e 30mg/kg. Para análise da ANSL foram considerados 5 minutos de registro antes (controle basal) e 5 minutos após a adição do hexametônio e as variações na ANSL foram normalizadas percentualmente em relação ao valor basal.

5.2 Avaliação dos efeitos centrais da microinjeção de VP no PVN sobre a ANSL

Após completa estabilização dos registros eletroneurográficos, uma micropipeta foi direcionada até o PVN, seguindo as coordenadas estereotáxicas já descritas. Realizou-se um teste funcional de localização do núcleo em questão com microinjeção de ATP (25 mM, 100 nL), cujos efeitos sobre a ANSL são bem evidentes e já foram padronizados em nosso laboratório. Aos 15 min após a identificação do PVN a VP foi microinjetada no mesmo sítio; em seguida a micropipeta foi deslocada lateralmente e efetuou-se a microinjeção contralateral de VP no PVN com o mesmo volume e concentração. Duas concentrações de VP foram utilizadas neste protocolo; 0,5 e 1,0 mM. Com o intuito de avaliar e validar as possíveis alterações observadas em decorrência da administração de VP; em outro grupo de animais foi realizada a microinjeção de salina no PVN, como controle de veículo, seguindo o mesmo protocolo acima descrito.

As variações na ANSL e na pressão de perfusão foram monitoradas e analisadas aos 5, 10, 15 e 20 minutos subsequentes à segunda microinjeção de VP no PVN. Este protocolo teve por objetivo verificar se a VP exógena agindo diretamente no PVN promoveria alguma alteração na ANSL de animais normohidratados.

5.3 Avaliação dos efeitos periféricos da VP sobre a ANSL

Para a realização deste protocolo experimental, após a estabilização dos registros eletroneurográficos, a VP (0,5 ou 1,0 mM) no volume de 200 nL (mesmo volume total microinjetado no PVN descrito no protocolo anterior) foi adicionada na solução de perfusão, com subseqüente monitoramento da ANSL e pressão de perfusão. Este protocolo teve por objetivo avaliar se um eventual efeito de alteração na ANSL promovido pela microinjeção central de VP no PVN poderia ser decorrente de um extravasamento da mesma para a região do terceiro ventrículo e deste para a solução de perfusão resultando em ações periféricas sobre a ANSL e pressão de perfusão, ou se a VP adicionada ao ACSF poderia ter acesso a seus receptores centrais e assim influenciar os resultados decorrentes de sua microinjeção diretamente no PVN. Todos os parâmetros foram monitorados e analisados no mesmo decurso temporal dos protocolos anteriores.

5.4 Avaliação das alterações na ANSL decorrente do antagonismo dos receptores V1a no PVN de animais submetidos à sobrecarga de sal

Para os protocolos realizados com microinjeções de antagonista de receptores vasopressinérgicos V1a (VPant) os ratos foram submetidos a estímulo hiperosmótico crônico com sobrecarga de sal durante quatro dias, como descritos anteriormente. O objetivo deste protocolo foi investigar se a VP liberada endogenamente em resposta ao *stress* osmótico estaria envolvida nas alterações da atividade simpática observadas nestas situações. Para este protocolo a solução de perfusão ACSF teve sua osmolaridade ajustada para 320 mOsmol/L, afim de simular a osmolaridade plasmática dos animais submetidos à sobrecarga de sal.

Após completa estabilização dos registros eletroneurográficos, uma micropipeta foi direcionada até o PVN, seguindo as coordenadas estereotáxicas já descritas e realizou-se um teste funcional de localização do PVN com microinjeção de ATP (25 mM, 100 nL). Aos 15 min após a identificação do PVN o antagonista de receptor V1a de VP [B-mercapto-B, B-cyclopentamethylene-propionlyl1, O-Me-Tyr 2, Arg 8-vasopressin (1mg/kg)] foi microinjetado bilateralmente no PVN no volume de 100 nL de cada lado. As variações na ANSL e na pressão de perfusão foram monitoradas e analisadas aos 5, 10, 15 e 20 minutos subsequentes à segunda microinjeção do antagonista V1a de VP no PVN.

5.5 Avaliação das alterações na ANSL decorrente do antagonismo dos receptores V1a no PVN de animais normohidratados

Este protocolo teve como objetivo investigar se as alterações da ANSL e da pressão de perfusão observadas após o antagonismo dos receptores V1a no PVN de ratos submetidos a estímulo osmótico, seriam de fato, resultado da ação da VP liberada endogenamente nestes animais em resposta ao estresse osmótico.

Os animais foram mantidos nas mesmas condições de alojamento e oferta hídrica que os animais dos outros grupos experimentais, exceto o grupo que foi submetido ao estímulo osmótico, e perfundidos com uma solução de perfusão ACSF isosmótica.

Após completa estabilização dos registros eletroneurográficos, uma micropipeta foi direcionada até o PVN, seguindo as coordenadas estereotáxicas já descritas e realizou-se um teste funcional de localização do PVN com microinjeção de ATP (25 mM, 100 nL). Aos 15 min após a identificação do PVN o antagonista de receptor V1a de VP [B-mercapto-B, B-cyclopentamethylene-propionlyl1, O-Me-Tyr 2, Arg 8-vasopressin (1mg/kg)] foi microinjetado bilateralmente no PVN no volume de 100 nL de cada lado. As variações na ANSL e na pressão de perfusão foram monitoradas e analisadas no mesmo padrão temporal dos outros protocolos com microinjeções no PVN.

6 RESULTADOS

6.1 Validação dos registros eletroneurográficos e padronização do uso de L-NAME como agente vasoativo na DAP

A figura 3 apresenta o traçado representativo de dois animais com registro da ANSL e pressão de perfusão em preparações nas quais foram utilizados o L-NAME (10 mM, painel A) e VP (5 µM, painel B) como agentes vasoativos. A análise comparativa dos registros demonstra que o uso do L-NAME na solução de perfusão resultou em elevação do tônus do nervo simpático (A) em relação às preparações DAP que utilizaram VP como agente vasoativo. Além disso, podemos observar que após a adição de hexametônio à solução de perfusão a queda da ANSL foi mais proeminente em preparações utilizando-se L-NAME (A) quando comparada com as preparações utilizando-se VP (B).

Figura 2 - Registros representativos da atividade simpática lombar (ANSL, □V) original e integrada (ANSL ∫) e da pressão de perfusão (Pper, mmHg) em preparações com o uso de L-NAME (A) e VP (B) como agentes vasoativos.





A queda dos parâmetros representados pode ser observada após a adição de hexametônio (seta).

A figura 4 demonstra que a variação percentual da ANSL após o bloqueio ganglionar foi significativamente maior (-35,5 \pm 1,4%) em preparações DAP utilizando o L-NAME como agente vasoativo quando comparado à VP (13.2 \pm 2,4%).

Figura 3 - Alterações percentuais na ANSL após adição de hexametônio na solução de perfusão em preparações que utilizaram o L-NAME ou VP como agentes vasoativos.



*Diferente em relação ao basal p<0.05, (n=5).

6.2 Efeitos centrais e periféricos da VP (0,5 mM) sobre a ANSL

Observadas as alterações do tônus simpático causadas pelo uso de L-NAME, optamos por substituir seu uso como droga vasoativa pela VP. Logo, os protocolos de microinjeção bilateral no PVN e adição de VP ao perfusato foram executados com o uso de VP, na concentração de 5 µM como droga vasoativa de escolha.

A figura 5 traz um traçado representativo da ANSL e pressão de perfusão de um animal do grupo de animais que receberam a microinjeção bilateral de VP no PVN na concentração de 0,5 mM (A) (n=5) e um animal em que a mesma dose de VP foi adicionada a solução de perfusão ACSF (B) (n=5).





As setas representam o momento da microinjeção.

Na figura 6 pode-se observar a variação percentual da ANSL (A) e da pressão de perfusão (B) em animais onde a VP (0,5 mM) foi microinjetada bilateralmente no PVN ou adicionada ao ACSF. Observa-se que aos 5 minutos após a injeção

bilateral de VP no PVN (indicada pela flecha) há um aumento da ANSL (8 ± 4%) com consequente queda que se segue até os 15 minutos (-3 ± 1%) e retorno aos valores basais 20 minutos após a microinjeção. Já a adição da VP ao ACSF, na mesma concentração não foi capaz de causar qualquer alteração na ANSL. Em relação a pressão de perfusão, nos experimentos com microinjeção bilateral de VP no PVN a mesma permaneceu estável durante todo o período analisado, enquanto que nos experimentos em que a VP foi adicionada ao ACSF observou-se sua queda, que foi significantivamente diferente a partir dos 15 ($-10 \pm 2\%$) e prosseguindo até os 20 minutos ($-16 \pm 2\%$) após a adição.





O tempo 0 (zero) representa o valor basal e o momento da aplicação de VP (seta). *Diferente em relação ao basal p<0.05.

6.3 Efeitos centrais e periféricos da VP (1.0 mM) sobre a ANSL

Na figura 7 observar-se traçados representativos da ANSL e pressão de perfusão de um animal que recebeu a microinjeção bilateral de VP no PVN (n=7) e um animal experimental em que a VP foi adicionada ao perfusato (n=5), nos dois casos a concentração de VP utilizada foi a de 1,0 mM.

Figura 6 - Registros representativos das alterações promovidas na ANSL original e integrada (ANSL∫) e na pressão perfusão (Pper) após a microinjeção bilateral de VP 1,0 mM no PVN (A) e adição ao ACSF (B).



As setas representam o momento da microinjeção.

A análise percentual das alterações da ANSL e da pressão de perfusão demonstrou que aos 5 minutos após a microinjeção de VP 1,0 mM no PVN teve início um aumento da ANSL que foi significativamente diferente ao basal aos 15 minutos (19 \pm 5%), com consequente queda aos 20 minutos (12 \pm 5%) após a microinjeção; já a adição de VP, na mesma concentração, ao ACSF gerou um aumento menos proeminente e não significante da ANSL a partir dos 15 minutos (4 \pm 3%) após a adição. Por outro lado, a pressão de perfusão demonstrou um comportamento parecido nos dois grupos experimentais com um pico de elevação 10 minutos após a microinjeção de VP no PVN (20 \pm 7%) ou após sua adição ao ACSF (19 \pm 7%).

Figura 7 - Alterações da ANSL (A) e da pressão de perfusão (B) resultantes da microinjeção bilateral de VP 1,0 mM no PVN e da adição á solução de. O tempo 0 (seta) indica o momento da microinjeção e da adição.



*Diferente em relação ao basal p<0.05.

6.4 Comparativo entre as alterações ANSL causadas pela microinjeção de diferentes doses de VP no PVN

A figura 9 apresenta os registros representativos e uma análise comparativa da variação percentual da ANSL em animais que receberam a microinjeção bilateral de VP no PVN na concentração de 0,5mM (n=5) e 1,0 mM (n=7). Em A e B encontra-se traçados da resposta evocada na ANSL após a microinjeção bilateral de VP 0,5 mM e 1 Mm no PVN, respectivamente. Já em C observa-se as alterações no decurso temporal analisado, aonde a VP microinjetada na concentração de 0,5 mM elevou, de forma não significativa, a ANSL aos 5 minutos; enquanto a microinjeção de VP no PVN, na concentração de 1,0 mM, evocou o aumento da variável investigada também a partir dos 5 minutos, porém de forma mais gradual e mantida, tornando-se significativamente diferente ao basal aos 15 minutos após a microinjeção. E em B encontra-se representada a variação percentual no pico máximo de resposta após a microinjeção de VP no PVN nas duas concentrações estudadas.

Figura 8 - Traçados representativos das alterações na ANSL após a microinjeção de VP 0,5 (A) e 1,0 mM (B) e variação percentual no decurso temporal (C) e no pico máximo de resposta (D) da ANSL, resultante da microinjeção bilateral de VP 1,0 mM e 0,5 mM no PVN.



*Diferente em relação ao basal p<0.05. #Diferente em relação a VP 0,5 p<0.05.

6.5 Alterações na ANSL decorrentes da microinjeção de antagonista V1a de VP no PVN de animais submetidos à sobrecarga de sal e normohidratados

A figura 10 apresenta registros representativos das alterações da ANSL e pressão de perfusão decorrentes do antagonismo de receptores vasopressinérgicos V1a no PVN de ratos submetidos ao estímulo osmótico (n=4) (A) e animais normohidratados (n=3) (B).

Figura 9 - Registros representativos das alterações promovidas na ANSL original e integrada (ANSL∫) e na pressão perfusão (Pper) após a microinjeção bilateral de VPant no PVN de animais submetidos a estímulo osmótico(A) e normohidratados (B).



Registros representativos das alterações promovidas na ANSL original e integrada (ANSL^J) e na pressão perfusão (Pper) após a microinjeção bilateral de VPant no PVN de animais submetidos a estímulo osmótico(A) e normohidratados (B). As setas representam o momento da microinjeção. FONTE: RIBEIRO, N. (2013)

A observação das alterações percentuais demonstra que em animais submetidos ao estímulo osmótico, através da oferta exclusiva de salina 2% durante 4 dias, a microinjeção bilateral de VPant no PVN causa a queda da ANSL, com pico de queda aos 15 minutos ($-14 \pm 5\%$) após a microinjeção, enquanto o antagonismo de receptores vasopressinérgicos no PVN de ratos normohidratados desencadeia uma sutil elevação da ANSL, possivelmente decorrente da queda observada na pressão de perfusão destes ratos. Em relação a pressão de perfusão os dois grupos experimentais demonstraram um comportamento parecido, com queda deste parâmetro em todo o decurso temporal analisado.]

Figura 10 - Alterações da ANSL (A) e da pressão de perfusão (B) resultantes da microinjeção bilateral de antagonista V1a de VP no PVN de ratos submetidos a sobrecarga de sal e normohidratados.



O tempo 0 (seta) indica o momento da microinjeção. *Diferente em relação ao basal p<0.05.

Embora em todos os animais submetidos a sobrecarga de sal a microinjeção bilateral de VPant no PVN tenha causado queda da ANSL, o comportamento temporal desta queda diferiu muito em cada um destes animais; alguns animais demonstraram alterações logo nos primeiros 5 minutos após a microinjeção, com retorno aos 20 minutos enquanto outros apresentaram uma queda mais tardia e prolongada da ANSL, com retorno a valores próximos aos basais além dos 25 minutos. Desta forma, na figura 12 encontra-se traçados representativos das alterações na ANSL em ratos que foram submetidos ao estimulo osmótico, após a microinjeção bilateral de VPant no PVN (A) e em ratos normohidratados que receberam a microinjeção (B). Além disso, observa-se as alterações da ANSL antes da microinjeção de VPant no PVN de animais submetidos a estímulo osmótico, no pico da resposta observada (-20 \pm 6%) e no retorno a valores próximos aos basais

Figura 11 - Traçados representativos das alterações na ANSL após a microinjeção de VPant no PVN de ratos submetidos a estimulo osmótico (A) e normohidratados (B) e variação da ANSL após a microinjeção de VPant no PVN no pico máximo de resposta e após o retorno próximos a valores basais, em ratos submetidos a estímulo osmótico (C)



*Diferente em relação ao basal p<0.05. FONTE: RIBEIRO, N. (2013)

6.6 Fotomicrografia do sítio de microinjeção no PVN

A figura 13 apresenta uma fotomicrografia de um corte histológico coronal do encéfalo de um animal mostrando o sítio de microinjeção bilateral no PVN. Foram considerados na análise dos resultados da ação da VP microinjetada no PVN somente os animais que tiveram as injeções localizadas bilateralmente neste núcleo.

Figura 12 - Fotomicrografia de uma secção coronal do hipotálamo mostrando o centro da microinjeção bilateral no PVN



PVN (cabeça de seta). 3V: terceiro ventrículo.

7 DISCUSSÃO

O conjunto de dados apresentado neste trabalho nos permite concluir: 1) O L-NAME utilizado na preparação DAP é capaz de afetar a atividade basal do nervo simpático lombar, inviabilizando o uso desta droga em experimentos que visem investigar o comportamento deste nervo em diferentes situações; 2) a VP microinjetada bilateralmente no PVN é capaz de alterar significantemente a ANSL na dose de 1,0 mM, porém não na menor dose estudada, de 0,5 Mm); 3) os efeitos sistêmicos da adição de VP ao perfusato não alteram a ANSL, visto que sua adição ao ACSF não causou qualquer alteração desta variável; 5) o bloqueio bilateral dos receptores V1a no PVN promoveu alterações da ANSL, em animais submetidos a estímulo osmótico, que demonstraram uma queda na atividade simpática não observada em animais normohidratados.

7.1 O L-NAME afeta a ANSL na preparação DAP

O aprendizado do método experimental de registros eletroneurográficos em preparações DAP foi uma etapa desafiadora deste projeto de pesquisa. A execução perfeita desta técnica compreendeu um passo limitante para o desenvolvimento dos protocolos propostos, visto que somente em condições ideais os mesmos poderiam ser executados. A complexidade do método em questão se deve ao fato de seu sucesso depender de uma série de etapas que necessitam ser minuciosamente executadas a fim de se manter a viabilidade da preparação em condições muito adversas. Tais etapas compreendem cirurgias, decorticação, dissecção de vasos, nervos, manutenção de uma pressão de perfusão ótima, temperatura e oxigenação adequadas e uma série de ajustes necessários para a aquisição de registros eletrofisiológicos de boa qualidade. Sendo assim, foram necessárias diversas tentativas até que cada uma dessas etapas fossem aprendidas e superadas e o experimento pudesse ser desenvolvido integralmente com sucesso. Finalmente, o êxito foi atingido após meses de experimentos e quando os padrão de sinais eletroneurográficos apresentaram uma alta relação sinal-ruído, como observados nas figuras 2B, C e D com resposta típica de simpato-inibição e simpato-excitação decorrente da ativação dos reflexos cardiovasculares, tais como baro e quimiorreflexo, respectivamente.

Vencida a etapa de aprendizado, ao estudar os efeitos centrais da VP microinjetada no PVN optamos por utilizar uma substância vasoativa diferente da VP, que comumente é adicionada à solução de perfusão na preparação DAP, e assim afastarmos a possibilidade de seu uso interferir nos resultados observados. Neste sentido, escolhemos utilizar o L-NAME, um inibidor da enzima óxido nítrico sintase, a fim de manter a pressão de perfusão em níveis ideais para a realização dos experimentos. No entanto, o uso desta droga se mostrou ineficaz para o fim desejado apresentando diversos efeitos sobre os resultados experimentais.

Primeiramente começamos a notar que a ANSL nos parecia com um tônus basal muito exacerbado quando comparada a experimentos realizados em nosso laboratório em que a VP era a droga vasoativa de escolha. Este fenômeno se confirmava quando fazíamos o teste funcional de localização do PVN com microinjeções de ATP ou L-glutamato, cujos efeitos se caracterizam por um aumento rápido e muito aparente da ANSL, fato que não era tão evidente quando a preparação era realizada com L-NAME. Além disso, notamos também que o padrão da ANSL não se mantinha estável durante todo o experimento, ou seja, havia um aumento progressivo e em rampa da ANSL ao longo do tempo. Deste modo, para confirmar nossa hipótese de que a adição de L-NAME no perfusato poderia causar uma alteração na ANSL basal, fizemos a análise comparativa da atividade simpática tônica basal entre preparações de animais no quais foram utilizados L-NAME e vasopressina como agentes vasoativos. O bloqueio ganglionar com hexametônio no grupo de animais com L-NAME no perfusato apresentou uma queda muita mais expressiva na ANSL e estatisticamente diferente da queda ocasionada em preparações onde se utilizou a VP. Desta forma, os resultados confirmaram nossa hipótese de que realmente o fato de utilizar L-NAME na solução de perfusão altera a atividade simpática basal, a qual se mantém elevada em relação às preparações DAP que se utiliza a VP.

Estudos da literatura demonstram que o óxido nítrico (NO), atuando no sistema nervoso central, afeta diretamente a atividade neuronal, principalmente relacionado com as vias do neurotransmissor inibitório GABA, ou seja, facilitando a

liberação deste aminoácido inibitório principalmente em núcleos diretamente envolvidos no controle da atividade simpática (Kishi et al., 2001; Ludwig, 2001; Stern; Li et al., 2003). Desta forma, sugerimos que a inibição na NO sintase, com L-NAME, poderia diminuir a disponibilidade de NO em núcleos relacionados ao controle da atividade simpática, tais como PVN e RVLM e, consequentemente diminuir a neurotransmissão gabaérgica nestes núcleos fazendo com que ANSL basal se elevasse, como observado em nossos experimentos. Estes efeitos do L-NAME na solução de perfusão em aumentar ANSL basal colocou em xeque os protocolos experimentais com utilização desta substância como agente vasoativo nas preparações DAP, visto seu potencial em causar diversas alterações nos circuitos neurais. Além disso, o aumento progressivo da ANSL basal durante o experimento com o uso do L-NAME dificultava a análise das alterações causadas exclusivamente pela microinjeção de VP no PVN. Desta forma optamos por não mais utilizar o L-NAME na realização de experimentos e passamos a utilizar a VP como agente vasoativo. A decisão de se usar VP nos demais protocolos experimentais, a fim de manter a pressão de perfusão e, consequentemente a viabilidade do experimento se deu, como foi descrito, pela necessidade de afastar a possibilidade do L-NAME, por meio de seus efeitos centrais, interferir sobre os efeitos observados na ANSL decorrentes da microinjeção de VP no PVN

7.2 A VP é capaz de evocar simpatoexcitação através de sua ação no PVN

Primeiramente, nos questionamos se o uso da VP como droga vasoativa na preparação DAP poderia exercer algum efeito sobre a atividade simpática e assim, influenciar os resultados observados em decorrência da microinjeção desta mesma droga no PVN. Embora no cérebro a re-entrada da VP secretada no sangue seja limitada pela barreira hematoencefalica (Ludwig, Leng, 2006); não sabíamos ao certo como estaria esta barreira no modelo experimetal utilizado, que apresenta uma alta pressão de perfusão e estresse de cisalhamento. Desta forma, caso a VP tivesse acesso a seus receptores centrais poderia não só afetar a atividade simpática, como dessensibilizar estes receptores, comprometendo nosso estudo. Nossos resultados, no entanto, demonstraram que quando a VP nas duas

concentrações investigadas (0,5 e 1,0 mM) foi adicionda a solução de perfusão ACSF, que já continha essa mesma droga na concentração de 5 µM, para a manutenção da pressão de perfusão; não se observou alterações significativas da ANSL, embora tenha ocorrido um pequeno aumento desta variável quando a concentração adicionada ao ACSF foi a de 1,0Mm (Fig 6A e 8A). Tendo em vista que a adição de VP a solução de perfusão não causou alterações significativas da ANSL e mais, que os efeitos da sua adição foram bastante diferentes aos causados pela microinjeção direta no PVN, pudemos afastar a possibilidadade dos resultados observados serem decorrentes do uso da VP na manutenção da pressão de perfusão. Além disso, uma outra dúvida era se a VP microinjetada no PVN não poderia extravasar através do terceiro ventrículo e exercer efeitos periféricos que afetassem nossas observações; neste sentido, os protocolos de adição ao ACSF também demonstraram não ser este o mecanismo envolvido no aumento da ANSL observada pela microinjeção de VP no PVN.

Para investigar se a VP agindo no PVN poderia alterar a ANSL desenvolvemos um protocolo de microinjeção bilateral desta droga no PVN em duas concentrações: 0,5 mM e 1,0mM, sempre na dose de 200 nL. A primeira concentração utilizada, de 0,5 mM, se mostrou ineficaz em alterar de forma significativa a ANSL, embora tenha causado um pequeno aumento desta atividade aos 5 (8 \pm 4%) minutos após a microinjeção (Fig 6A). A ausência de efeitos sobre a ANSL causada pela microinjeção de VP no PVN na concentração de 0,5 mM pode significar que esta seja uma concentração muito pequena para exercer efeitos suficientes para desencadear alterações na atividade simpática; estudos demonstram que a concentração de VP no fluido extracelular do SON é 100 a 1000 vezes maior que a concentração no sangue, o que sugere que talvez elevadas concentrações de VP sejam requeridas para a ativação neuronal neste núcleo (Ludwig, Leng, 2006). Além disso, a preparação DAP apresenta uma rápida lavagem dos tecidos, o que poderia diminuir o tempo de interação da VP com seus receptores inviabilizando o desencadeamento de qualquer alteração. De fato, estudos no nosso laboratório demonstraram que, em animais acordados, a microinjeção unilateral de VP no PVN é capaz de elevar a pressão arterial em concentrações micromolares.

Já na concentração de 1,0 mM a microinjeção bilateral de VP no PVN foi capaz de gerar alterações significativas da ANSL (Fig 8A). Aos 5 (4 \pm 2%) minutos após a microinjeção observamos um aumento da variável investigada que prosseguiu até os 15 minutos (19 \pm 5%), quando se tornou significativamente diferente da atividade basal, com posterior queda aos 20 (12 \pm 5%) minutos após a microinjeção.

Os resultados encontrados então em consonância com outros achados, que demonstraram o aumento dose-dependente da atividade do nervo simpático renal (ANSR) após a microinjeção de VP no PVN (Son et al., 2013). A elevação da ANSR desencadeada pela microinjeção de VP no PVN já havia sido demonstrada por outros autores; estes, no entanto, observaram uma resposta mais rápida do que a demosntrada no nosso trabalho, com aumento e queda da ANSR logo após a microinjeção (Rossi, Maliszewska, 2008). Os motivos desta diferença podem incluir desde as diferenças na concentração de VP utilizada, como a existência de uma modulação diferenciada para os diferentes territórios simpáticos. Neste sentido, trabalhos de Stocker et al. (2004b) mostraram que a inibição bilateral do PVN por meio de agonista GABAa (muscimol) foi capaz de diminuir a ANSL em ratos privados de água por 24 e 48 horas. Por outro lado, a diminuição da ANSR só ocorreu em ratos desidratados por 48 horas, e apresentou magnitude muito menor do que a observada para o nervo simpático lombar, apontando uma regulação diferenciada do PVN sobre os diferentes territórios simpáticos em resposta a hiperosmolaridade.

Em nossos resultados podemos notar que as alterações da ANSL decorrentes da ação central da VP apresentam um perfil prolongado, o qual difere das respostas rápidas e intensas na atividade simpática quando da microinjeção de agonistas de neurotransmissores excitatórios no PVN (Antunes et al., 2006). Como já descrito, a VP é um neuropeptídeo e sua ação se dá por meio da ativação de receptores metabotrópicos. Além disso, a meia-vida deste neuropeptídeo no cérebro é de aproximadamente 20 minutos; estas características moleculares possibilitam que, assim como outros neuropeptídios, a VP interaja com as sinapses vizinhas (Ludwig, Leng, 2006). De fato, Son et al. (2013), demonstraram que a estimulação de neurônios vasopressinergicos no PVN resulta na despolarização de membrana e aumento dos disparos dos neurônios pré- sinapticos vizinhos.

Visto a capacidade da VP em afetar a atividade simpática através de sua ação no PVN nos perguntamos qual seria a importância fisiológica do aumento da ANSL frente a hiperosmolaridade. A VP pode ser liberada não somente frente ao aumento da osmolaridade como também em resposta a diminuição do volume circulante; neste último caso a simpatoexcitação, com consequente aumento da resistência periférica total, seria benéfica para o reestabelecimento da pressão arterial diminuída pela perda de volume. Contudo; o papel funcional do aumento da ANSL evocado pela hiperosmolaridade não parece claro. Neste sentido, propomos que o aumento da osmolaridade, principalmente crônico, possa gerar a perda do balanço da ação central da VP levando a alterações que desencadeiem a simpatoexcitação.

Diversos estudos suportam a idéia de que a VP pode influenciar as interações neuronais de uma forma muito refinada e complexa. Já é bem estabelecido o papel autorregulador da VP controlando a atividade dos neurônios magnocelulares e até mesmo sua própria liberação por esses neurônios (Gouzènes, 1998; Wotjak et al., 1994). Além disso, estudos evidenciaram que a resposta dos neurônios magnocelulares do núcleo supraóptico frente a estímulo osmótico depende da ativação tanto de vias inibitórias quanto excitatórias (Leng et al., 2001), o que poderia contar com a participação da VP, visto seu papel paradoxal já demonstrado, em inibir por meio de mecanismos de retroalimentação negativa, os neurônios magnocelulares (Brown, Bourque, 2004) e ativar células vasopressinérgicas quiescentes (Gouzènes et al., 1998). Considerando este potencial em promover respostas tanto excitatórias quanto inibitórias, podemos imaginar que a quebra do balanço entre estas respostas poderia desencadear efeitos como o aumento da ANSL.

Toney, Stocker (2010) discutem que nos tempos modernos as dietas ricas em sódio vêm promovendo alterações crônicas da osmolaridade plasmática. Coincidentemente há um aumento dramático da prevalência de doenças salsensíveis, como a hipertensão e a insuficiência cardíaca. Além disso, há evidencias crescentes da associação entre doenças cardiovasculares que levam à retenção de sal e o aumento da atividade simpática (Adams, 2004; Brooks et al. 2005; DiBona, Sawin, 1991; Weinberger, 1996). Desta forma, o aumento mantido da osmolaridade poderia gerar alterações funcionais e/ou estruturais em núcleos centrais envolvidos com o controle da pressão arterial, como o PVN que, neste caso poderiam ser desencadeadas ou mantidas por alterações na liberação e ação da VP.

7.3 O antagonismo de receptores vasopressinergicos V1a diminui a ANSL em ratos submetidos a estímulo osmótico

Já é bem estabelecido na literatura científica que o aumento crônico da osmolaridade é capaz de suportar um aumento mantido da atividade simpática e causar diversas alterações estruturais e sinápticas em núcleos centrais, entre eles os núcleos envolvidos com a produção e liberação de VP (Di, Tasker, 2004; Boudaba et al., 2003; Perlmutter et al., 1985; Toney, Stocker, 2010). Desta forma, propusemos avaliar se em condições em que a homeostase orgânica da osmolaridade fosse desafiada pela sobrecarga de sal, a VP liberada endogenamente no microambiente neuronal do PVN poderia desempenhar um papel expressivo no controle da atividade simpática. Para isso, desenvolvemos um protocolo em que o antagonista de receptores vasopressinérgicos V1a foi injetado bilateralmente no PVN de ratos com sobrecarga de sal durante 4 dias.

A observação de nossos resultados comprova que o antagonismo de receptores vasopressinergicos V1a no PVN de ratos submetidos ao estímulo osmótico diminui significantemente a ANSL no pico máximo da resposta, quando comparada a valores basais (-20 \pm 6%) (Fig 12). Além disso, para testarmos a possibilidade dos efeitos observado pela microinjeção de VPant no PVN não serem causados por alterações centrais promovidas pela VP em decorrência da hiperomosmolaridade e sim um efeito secundário a própria microinjeção do antagosnista; realizamos o mesmo protocolo de antagonismo no PVN de ratos normohidratados, nos quais a microinjeção de VPant não causou alterações significativas da ANSL (Fig 11).

Novamente nossos resultados estão de acordo com os achados de Son et al. (2003) que observaram que a estimulação dos neurônios vasopressinérgicos do PVN desencadeia a liberação de VP e que esta é capaz de se difundir e modular de forma continua os neurônios pré sinápticos deste mesmo núcleo. Estes autores demonstraram ainda, em estudos *in vivo*, que a microinjeção bilateral prévia de antagonista vasopressinérgico no PVN atenuou o aumento da ANSL causado pela infusão intra carotídea de salina hipertônica. Confirmando, desta maneira, o papel simpatoexitatorio central da VP em resposta a estímulos osmóticos.

O fato dos animais submetidos ao estímulo osmótico apresentarem respostas temporais diferenciadas na queda da ANSL pode sugerir diferentes níveis de sensibilidade à hiperosmolaridade nestes animais. A elevação mantida da osmolaridade é capaz de causar diversas alterações centrais, entre elas o aumento dendo-dentritico da superficie de contato das membranas celulares do SON, a facilitação da liberação de glutamato e diminuição da liberação de GABA, e mesmo a alteração da atividade inibitória GABAérgica (Di, Tasker, 2004; Kim et al., 2011; Perlmutter et al., 1985); além disso, como já foi discutido, a própria VP pode interagir com as sinapses e com o comportamento funcional dos neurônios dos núcleos centrais. Desta forma, as respostas diferenciadas podem significar que tais alterações possam ter ocorrido em magnitudes diferentes nos animais submetidos à sobrecarga de sal, porém em todos a VP estaria envolvida na manutenção de um tônus simpático aumentado.

Este último protocolo permite concluir a relevância fisiológica da VP modulando a atividade simpática, visto que sua própria liberação endógena estimulada pela sobrecarga de sal gerou um aumento sustentado da ANSL.

Concluindo, o conjunto de nossos resultados nos permite afirmar que a VP liberada dendriticamente no PVN exerce uma ação sobre neurônios parvocelulares deste núcleo, desempenhando um importante papel na geração da resposta simpatoexcitatoria desencadeada pelo aumento da osmolaridade.

8 CONCLUSÃO

Os nossos resultados demonstram a relevância fisiológica da VP na modulação da atividade simpática, visto que sua própria liberação endógena estimulada pela sobrecarga de sal gerou um aumento sustentado da ANSL. Podemos concluir que a VP, possivelmente liberada dendriticamente no microambiente neuronal do PVN, exerça uma ação modulatória importante sobre neurônios parvocelulares deste núcleo, influenciando a manutenção do tônus simpático que se encontra alterado em condições de aumento da osmolaridade

REFERÊNCIAS^{*}

Adams KF Jr. Pathophysiologic role of the renin-angiotensin-aldosterone and sympathetic nervous systems in heart failure. Am J Health Syst Pharm. 2004;61(Suppl. 2):S4–13.

Adachi A, Niijima A, Jacobs HL.An hepatic osmoreceptor mechanism in the rat: electrophysiological and behavioral studies. Am J Physiol. 1976 Oct;231(4):1043-9.

Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D, Paton JFR. A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality- induced sympathoexcitation. J Physiol. 2006; 576;2:569-83.

Bergquist F, Ludwig M. Dendritic transmitter release: a comparison of two model systems. J Neuroendocrinol. 2008 Jun;20(6):677-86.

Boudaba C, Linn DM, Halmos KC and Tasker JG. Increased tonic activation of presynaptic metabotropic glutamate receptors in the rat supraoptic nucleus following chronic dehydration. J Physiol. 2003;551(3):815–23.

Bourque CW, Oliet SHR. Osmoreceptors in the central nervous system. Annu Rev Physiol. 1997;59:601–19.

Bourque CW. Osmoregulation of vasopressin neurons: a synergy of intrinsic and synaptic processes. Prog Brain Res. 1998;119:59-76.

Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. Nat Rev Neurosci. 2008 Jul;9(7):519-31. doi: 10.1038/nrn2400. Epub 2008 May 29.

Brooks VL, Haywood JR, Johnson AK. Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2005;32:426–32.

Brown CH, Bourque CW. Autocrine feedback inhibition of plateau potentials terminates phasic bursts in magnocellular neurosecretory cells of the rat supraoptic nucleus. J Physiol. 2004 Jun; 15;557(Pt 3):949-60. Epub 2004 Apr 23.

Bunag RD, Miyajima E. Sympathetic hyperactivity elevates blood pressure during acute cerebroventricular infusions of hypertonic salt in rats. J Cardiovasc Pharmacol. 1984;6:844-51.

Cannon WB. **The wisdom of the body**. New York: W.W. Norton & Company, Inc.; 1932.

^{*} De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

Cechetto F, Saper CB. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the Spinal Cord in the rat. J Comp Neurol. 1998;272:579-604.

Chu CP, Kannan H, Qiu DL.Effect of hypertonic saline on rat hypothalamic paraventricular nucleus parvocellular neurons in vitro. Neurosci Lett. 2010 Sep 27;482(2):142-5.

Chwalbińska-Moneta J. Role fof hepatic portal osmoreception in the control of ADH release. Am J Physiol. 1979 Jun;236(6):E603-9.

Di S, Tasker JG. Dehydration induced synaptic plasticity in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic nucleus. Endocrinology. 2004 Nov;145(11):5141-9.

DiBona GF, Sawin LL. Role of renal nerves in sodium retention of cirrhosis and congestive heart failure. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 1991;260:R298–R305

Ferguson AV, Renaud LP. Hypothalamic paraventricular nucleus lesions decrease pressor responses to subfornical organ stimulation. Brain Res. 1984 Jul 9;305(2):361-4.

Garcia-Estan J, Carbonell LF, Garcia-Salom M, Salazar FJ, Quesada T. Hemodynamic effects of hypertonic saline in the conscious rat. Life Sci. 1989;44:1343-1350.

Ghamari-Langroudi M, Vella KR, Srisai D, Sugrue ML, Hollenberg AN, Cone RD. Regulation of thyrotropin-releasing hormone-expressing neurons in paraventricular of the hypothalamus by signals of adiposity. Mol Endocrinol. 2010 Dec;24(12):2366-81.

Gouzènes L, Desarménien MG, Hussy N, Richard P, Moos FC. Vasopressin regularizes the phasic firing pattern of rat hypothalamic magnocellular vasopressin neurons. J Neurosci. 1998 Mar;1;18(5):1879-85.

Gutman MB, Ciriello J, Mogenson GJ. Effect of paraventricular nucleus lesions on cardiovascular responses elicited by stimulation of the subfornical organ in the rat. Can J Physiol Pharmacol. 1985 Jul;63(7):816-24.

Kato K, Kannan H, Ohta H, Kemuriyama T, Maruyama S, Tandai-Hiruma M, Sato Y, Nakazato M, Nishimori T, Ishida Y, Onaka T, Nishida Y. Central Endogenous Vasopressin Induced by Central Salt-Loading Participates in Body Fluid Homeostasis through Modulatory Effects on Neurons of the Paraventricular Nucleus in Conscious Rats. J Comp Neuroendocrinol. 2009;21:921-34.

Kim JS, Kim WB, Kim YB, Lee Y, Kim YS, Shen FY, Lee SW, Park D, Choi HJ, Hur J, Park JJ, Han HC, Colwell CS, Cho YW, Kim YI. Chronic hyperosmotic stress converts GABAergic inhibition into excitation in vasopressin and oxytocin neurons in the rat. J Neurosci. 2011 Sep;14;31(37):13312-22.

Kishi T, Hirooka Y, Sakai K, Shigematsu H, Shimokawa H, Takeshita A. Overexpression of eNOS in the RVLM causes hypotension and bradycardia via GABA release. Hypertension. 2001 Oct;38(4):896-901.

Kizer JS, Palkovits M, Brownstein MJ. Releasing factors in the circumventricular organs in the rat brain. Endocrinol. 1976;98(2):311-7.

Landgraf R, Ludwig M. Vasopressin release within the supraoptic and paraventricular nuclei of the rat brain: osmotic stimulation via microdialysis. Brain Res. 1991 Sep 6;558(2):191-6.

Leng G, Brown CH, Bull PM, Brown D, Scullion S, Currie J, Blackburn-Munro RE, Feng J, Onaka T, Verbalis JG, Russell JA, Ludwig M. Responses of magnocellular neurons to osmotic stimulation involves coactivation of excitatory and inhibitory input: an experimental and theoretical analysis. J Neurosci. 2001 Sep 1;21(17):6967-77.

Lennard DE, Eckert WA, Merchenthaler I. Corticotropinreleasing hormone neurons in the paraventricular nucleus project to the external zone of themedian eminence: a study combining retrograde retrograde labeling with immunocytochemistry. J Neuroendocrinol. 1993 Apr;5(2):175-81

Li Y, Zhang W, Stern JE. Nitric oxide inhibits the firing activity of hypothalamic paraventricular neurons that innervate the medulla oblongata: role of GABA. Neuroscience. 2003;118(3):585-601.

Ludwig M, Callahan MF, Neumann I, Landgraf R, Morris M. Systemic osmotic stimulation increases vasopressin and oxytocin release within the supraoptic nucleus. J Neuroendocrinol. 1994 Aug;6(4):369-73.

Ludwig M, Leng G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours.Nat Rev Neurosci. 2006 Feb;7(2):126-36.

Ma RC, Dun NJ. Vasopressin depolarizes lateral horn cells of the neonatal rat spinal cord in vitro. Brain Res. 1985 Nov 25;348(1):36-43.

Miselis RR. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. Brain Res. 1981;230:1–23.

Perlmutter LS, Tweedle CD, Hatton GI. Neuronal/glial plasticity in the supraoptic dendritic zone in response to acute and chronicde_hydration. Brain Res. 1985 Dec 30;361(1-2):225-32.

Pow CV, Morris JF. Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohipophysial peptides by exocytosis. Neuroscience. 1989;32:435-9.

Pyner S, Coote JH. Identification of an efferent projection from the paraventricular nucleus of the hypothalamus terminating close to spinally projecting rostral ventrolateral medullary neurons. Neuroscience. 1999;88(3):949-57.

Qiu DL, Shirasaka T, Chu CP, Watanabe S, Yu NS, Katoh T, Kannan H. Effect of hypertonic saline on rat hypothalamic paraventricular nucleus magnocellular neurons in vitro. Neurosci Lett. 2004 Jan 23;355(1-2):117-20.

Raggenbass M. Overview of cellular eletrophysiological actions of vasopressin. Eur J Pharmacol. 2008 Apr 7;583(2-3):243-54. doi:10.1016/ j.ejphar.2007.11.074. Epub 2008 Jan 30.

Riddell, D. C., Mallonee, R., Phillips, J. A., Parks, J. S., Sexton, L. A., Hamerton, J. L. Chromosomal assignment of human sequences encoding arginine vasopressinneurophysin II and growth hormone releasing factor. Somat. Cell Molec. Genet. 1985;11:189-95.

Rossi NF, Maliszewska-Scislo M. Role of paraventricular nucleus vasopressin V1A receptors in response to endothelin 1 activation of the subfornical organ in the rat. J Physiol Pharmacol. 2008 Dec;59 Suppl 8:47-59.

Sabatier N, Richard P, Dayanithi G. Activation of multiple intracellular transduction signals by vasopressin in vasopressin-sensitive neurones of the rat supraoptic nucleus. J Physiol. 1998 Dec 15;513(Pt 3):699-710.

Scrogin KE, Grygielko ET, Brooks VL. Osmolality: a physiological longterm regulator of lumbar sympathetic nerve activity and arterial pressure. Am J Physiol. 1999 Jun;276(6 Pt 2):R1579-86.

Simerly RB and Sawnson LW. Projections of the medial preoptic nucleus: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin anterograde tracttracing study in the rat. J Comp Neurol. 1988;270:209–42.

Son SJ, Filosa JA, Potapenko ES, Biancardi VC, Zheng H, Patel KP, Tobin VA, Ludwig M, Stern JE. Dendritic Peptide Release Mediates Interpopulation Crosstalk between Neurosecretory and PreautonomicNetworks. Neuron. 2013 Jun 19;78(6):1036-49. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.025.

Stern JE, Ludwig M. NO inhibits supraoptico oxytocin and vasopressin neurons via activation of GABAergic synaptic inputs. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2001 Jun;280(6):R1815-22.

Stocker SD, Simmons JR, Stornetta RL, Toney GM, Guyenet PG. Water deprivation increases Fos immunoreactivity in PVN autonomic neurons with projections to the spinal cord and rostral ventrolateral medulla. J Comp Neurol. 2004a;494:673-85.

Stocker SD, Hunwick KJ, Toney GM. Hypothalamic paraventricular nucleus differentially supports lumbar and renal sympathetic outflow in water-deprived rats. J Physiol. 2005 Feb 15;563(Pt 1):249-63.

Thrasher TN. Circumventricular organs, thirst and vasopressin secretion. In: Schrier RW. Vasopressin. New York: Raven Press; 1985. p. 311.

Toney GM, Chen QH, Cato MJ, Stocker SD. Central osmotic regulation of sympathetic activity. Acta Physiol Scand. 2003 Jan;177(1):43-55.

Toney GM, Stocker SD.Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: implications for cardiovascular disease. J Physiol. 2010 Sep 15;588(18):3375-84.

van den Pol AN. The magnocellular and parvocellular paraventricular nucleus of rat: intrinsic organization. J Comp Neurol. 1982 Apr 20;206(4):317-45.

Vaccari C, Lolait SJ, Ostrowski NL. Comparative distribution of vasopressin V1b and oxytocin receptor messenger ribonucleic acids in brain. Endocrinology. 1998 Dec;139(12):5015-33.

Xiong Y, Liu R, Xu Y, Duan L, Cao R, Tu L, Li Z, Zhao G, RaoZ. Effects of vagotomy, splanchnic nerve lesion, and fluorocitrate on the transmission of acute hyperosmotic stress signals to the supraoptic nucleus. J Neurosci Res. 2011 Feb;89(2):256-66.

Yang Z, Bertram D, Coote JH.The role of glutamate and vasopressin in the excitation of RVL neurones by paraventricular neurones. Brain Res. 2001 Jul 20;908(1):99-103.

Weinberger MH. Salt sensitivity of blood pressure in humans. Hypertension. 1996;27:481–90.

Weindl, A. Neuroendocrine aspects of circumventricular organs. Front Neuroendoc. 1973;3:3-32.

Weiss ML, Claassen TH, Kenney MJ. Nonuniform sympathetic nerves responses to intravenous hypertonic saline infusion. J Autonom Nerv System. 1996;57:109-15.

Wotjak CT, Ludwig M, Landgraf R. Vasopressin facilitates its own release within the rat supraoptic nucleus in vivo. Neuroreport. 1994 Jun 2;5(10):1181-4.

Zingg HH.Vasopressin and oxytocin receptors. Baillieres Clin Endocrinol Metab. 1996 Jan;10(1):75-96.