

RENATO WILLIAN MARTINS SÁ

Função dos astrócitos e ectonucleotidases na sinalização purinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão induzida por sal

São Paulo

2020

RENATO WILLIAN MARTINS SÁ

Função dos astrócitos e ectonucleotidases na sinalização purinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão induzida por sal

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

São Paulo

2020

RENATO WILLIAN MARTINS SÁ

Função dos astrócitos e ectonucleotidases na sinalização purinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão induzida por sal

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

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Versão Corrigida.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Martins Sá, Renato Willian
FUNÇÃO DOS ASTRÓCITOS E ECTONUCLEOTIDASES NA
SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO NA HIPERTENSÃO INDUZIDA POR SAL / Renato
Willian Martins Sá; orientador Vagner Roberto
Antunes. -- São Paulo, 2020.
79 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. ATP. 2. Astrócitos. 3. Sal. 4. Hipertensão
Arterial . 5. Adenosina. I. Antunes, Vagner Roberto
, orientador. II. Título.

Candidato: Renato Willian Martins Sá

Título da Tese: FUNÇÃO DOS ASTRÓCITOS E ECTONUCLEOTIDASES NA SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO NA HIPERTENSÃO INDUZIDA POR SAL

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado em sessão pública realizada a / / , considerou o(a) candidato(a):

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Examinado(a): Assinatura:

Nome:

Instituição:

Presidente: Assinatura:

Nome:

Instituição:



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Estudo do papel da glia e ectonucleotidases na sinalização purinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamos na hipertensão induzida por sal*", registrado sob o protocolo nº **38/2016**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **10/05/2016** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Vagner Roberto Antunes**

- Departamento: *Fisiologia e Biofísica*

- Membros da Equipe: *Renato Willian Martins Sá (Pós-graduando), Luciene Ribeiro (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico http://www3.icb.usp.br/corpoeditorial/index.php?option=com_content&view=article&id=702. Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Role of glia and ectonucleotidases in the purinergic signaling of the paraventricular nucleus of the hypothalamus in salt-induced hypertension*", protocol nº **38/2016**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **5/10/2016** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Vagner Roberto Antunes**

- Team members: *Renato Willian Martins Sá (Graduate Student), Luciene Ribeiro (Laboratory Technician)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Ratus Novergicus</i>	<i>Wistar</i>	<i>Macho/male</i>	<i>300 g</i>	<i>80</i>

São Paulo, 10 de maio de 2016.

Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle Neural da Circulação do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Código de Financiamento 001) – e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): processo nº 2016/03359-8 (Bolsa-auxílio de doutorado), 2018/11203-3 (Bolsa-BEPE) e 2016/21991-3 (Auxílio Regular de Pesquisa).

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Vagner Roberto Antunes, pela amizade, confiança, oportunidade e por ter sido a principal referência para meu processo de aprendizagem ao longo de todos os anos de trabalho em conjunto.

Ao Professor Dr. Alexander V. Gourine pela oportunidade de desenvolver o doutorado sanduíche em seu laboratório.

Aos meus amigos e colegas de laboratório pela convivência agradável e por contribuírem de forma direta e indireta para realização deste trabalho.

Aos Professores do ICB Ana Carolina Takakura, Thiago dos Santos Moreira, William Tadeu Lara Festuccia, Fabio Bessa Lima, Lisete Compagno Michelini, Maria Oliveira de Souza e Maria Tereza Nunes, pela disponibilização de seus laboratórios para a realização dos experimentos.

Ao biotério de produção de ratos do ICB pelo fornecimento dos animais e aos funcionários do biotério de manutenção e experimentação do Departamento de Fisiologia e Biofísica pelos cuidados diários com o bem-estar dos animais.

RESUMO

Sá, R. W. M. **Função dos astrócitos e ectonucleotidases na sinalização purinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão induzida por sal.** [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

No presente estudo investigamos se a hipertensão neurogênica decorrente da sobrecarga de sal (SS) estimula a liberação de ATP no PVN e quais mecanismos seriam responsáveis por este fenômeno. Duas hipóteses foram levantadas: (1) um maior conteúdo de ATP no PVN durante a SS é resultado de uma falha das ectonucleotidases em metabolizar o ATP; e (2) a SS estimularia os astrócitos do PVN a liberar ATP. Para testar nossas hipóteses utilizamos ratos Wistar pesando entre 290-350 g (n = 12) para estudos *in vivo* de medida de pressão arterial por radiotelemetria e análise de parâmetros da modulação autonômica do sistema cardiovascular e ratos Sprague-Dawley com peso entre 290-350 g (n = 41) para os estudos *in vitro* com utilização de biossensores para detecção de purinas e imunohistoquímica. Ambos grupos foram divididos em um grupo SS que recebeu solução de NaCl 2% em substituição à água da torneira por 4 ou 7 dias e outro grupo controle que recebeu água. A progressão da hipertensão em ratos acordados expostos à SS foi monitorada por radiotelemetria ao longo de sete dias. A expressão do RNAm das ectonucleotidases ecto-nucleotídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPD) 1, 2 e 3 e ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) no PVN foi analisada com a técnica RT- qPCR. Utilizando biossensores amperométricos medimos a liberação de ATP e adenosina, bem como a atividade das ectonucleotidases no PVN em fatias hipotalâmicas. A função dos astrócitos do PVN foi avaliada por meio da interferência gênica com o vetor AVV-sGFAP-dnSNARE-EGFP. Os níveis de pressão arterial média (PAM) dos ratos SS aumentaram progressivamente até ao 7º de exposição ao sal [PAM: 97 ± 4 mmHg (dia 0) vs 129 ± 4 mmHg (dia 7) $p < 0,0001$]. A potência da banda LF aumentou progressivamente do dia 0 ao dia 7 em ratos SS [LF: $1,21 \pm 0,22$ mmHg² (dia 0) vs $5,01 \pm 0,96$ mmHg² (dia 6), $p < 0,0001$]. Apenas o nível de mRNA da E-NTPD3 foi maior no grupo SS do que no controle no dia 7 [$0,99 \pm 0,5 \Delta\Delta Ct$ (controle) vs. $3,09 \pm 0,5 \Delta\Delta Ct$ (SS) $p = 0,0247$]. O grupo de ratos SS apresentou aumento na liberação de ATP

($19,16 \pm 6,9 \mu\text{M}$, $p < 0,0001$) quando comparado ao grupo controle ($1,13 \pm 0,8 \mu\text{M}$), porém não na liberação de adenosina [$1,19 \pm 0,6 \mu\text{M}$ (SS) vs $2,15 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (controle)]. A atividade das ectonucleotidases foi avaliada *in vitro* quantificando a produção máxima de adenosina em resposta à aplicação exógena de ATP ($50\mu\text{M}$). Nenhuma diferença foi detectada comparando as respostas entre os dois grupos. A intensidade da imunofluorescência da proteína glial fibrilar glial (GFAP) foi maior no PVN de ratos SS do que nos controles [$6,9 \pm 1,3$ a.u. (controle) vs $27,2 \pm 6,2$ a.u. (SS)]. A transfecção unilateral do PVN com vetor dnSNARE diminuiu a liberação de ATP nos ratos SS quando comparado com o lado não transfectado como controle [$13,88 \pm 0,07 \mu\text{M}$ (lado não transfectado) vs. $6,64 \pm 1,64 \mu\text{M}$ (lado transfectado)]. Em conclusão, nossos resultados mostram que a sobrecarga de sal com solução hipertônica de NaCl 2% não afeta a atividade das ectonucleotidases, enzimas que degradam o ATP, mas potencialmente estimula os astrócitos do PVN a liberarem o trifosfato de adenosina por via exocitótica. **Palavras-chave:** ATP, adenosina, astrócitos, sal, hipertensão arterial.

ABSTRACT

Sá, R. W. M. **Role of astrocytes and ectonucleotidases in purinergic signaling of the paraventricular nucleus of hypothalamus in salt-induced hypertension.** [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

In the present study we investigated whether salt-load (SS) stimulates the release of ATP in the PVN environment, and which mechanism would be responsible for this phenomenon. Two hypotheses have been raised: (1) a higher content of ATP in PVN during SS is a result of a failure of ectonucleotidases to metabolize ATP; and (2) SS can stimulate PVN astrocytes to release ATP. Male Wistar rats 290-350 g (n = 12) were used for *in vivo* studies and Sprague Dawley rats 290-350 g (n = 41) for *in vitro*. Animals were divided in 2 group: 1) SS: group that received hypertonic saline solution (2% NaCl) in replacement of tap water for 4 or 7 days, and 2) control group. A radiotelemetry system was used to measure the progression of hypertension in SS rats over the seven days of salt loading. mRNA expression of ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPD) 1, 2 and 3 and ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) in PVN was analyzed by RT-qPCR. The release of ATP, adenosine and the activity of ectonucleotidases were measured via amperometric biosensors overlaid on the PVN region of hypothalamic slices. The function of PVN astrocytes was assessed by interference with the AVV-sGFAP-dnSNARE-EGFP vector. Mean arterial pressure (MAP) of SS rats increased progressively from day 2 to 7 [MAP: 97 ± 4 mmHg (day 0) vs 129 ± 4 mmHg (day 7), $p < 0.0001$]. The power of the LF component increased progressively from day 0 to day 7 in SS rats [LF: 1.21 ± 0.22 mmHg² (day 0) vs 5.01 ± 0.96 mmHg² (day 6), $p < 0.0001$]. E-NTPD3 mRNA expression was higher in the SS group than in control [$0.99 \pm 0.5 \Delta\Delta Ct$ (control) vs. $3.09 \pm 0.5 \Delta\Delta Ct$ (SS) $p = 0.0247$]. SS rats showed an increase in ATP release [$1.13 \pm 0.8 \mu M$ (control) vs. $19.16 \pm 6.9 \mu M$ (SS), $p < 0,0001$], but not in adenosine [$2.15 \pm 0.9 \mu M$ (control) vs. $1.19 \pm 0.6 \mu M$ (SS)]. The activity of ectonucleotidases was tested *in vitro* by quantifying the maximum production of adenosine in response to exogenous application of ATP (50 μM). No difference was detected when comparing the responses between the groups. PVN glial fibrillar protein (GFAP) immunofluorescence intensity was higher in SS rats than

in control [6.9 ± 1.3 a.u. (control) vs 27.2 ± 6.2 a.u. (SS)]. PVN unilateral transfection with dn-SNARE vector decreased the release of ATP in SS rats when compared to the non-transfected side as a control [13.88 ± 0.07 μ M (non-transfected side) vs. 6.64 ± 1.64 μ M (transfected side)]. In conclusion, our results showed that SS gradually increases the BP as well as the sympathetic influence on the cardiovascular system and stimulates the glial release of ATP in the PVN by exocytosis. As conclusion, our results show that high salt intake of hypertonic NaCl solution (2%) does not affect ectonucleotidases activity but stimulates PVN astrocytes to release ATP via exocytosis mechanism.

Keywords: ATP, adenosine, astrocytes, salt, hypertension.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Ingestão global de sódio.....	14
Figura 2. Núcleo Paraventricular do Hipotálamo.	20
Figura 3. Papel das E-NTPDs e E-5'-NT na sinalização purinérgica. Erro! Indicador não definido.	
Figura 4. Organização das células da glia..... Erro! Indicador não definido.	
Figura 5. Consumo de líquido e ração.....	41
Figura 6. Conteúdo de Na ⁺ /K ⁺ e hematócrito.....	42
Figura 7. Pressão arterial.	43
Figura 8. Pressão arterial.	44
Figura 9. Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS).	46
Figura 10. Análise espectral da variabilidade do intervalo de pulso (IP)	47
Figura 11. Expressão gênica das ectonucleotidases.....	48
Figura 12. Liberação de ATP e adenosina.	50
Figura 13. Atividade das ectonucleotidases.	51
Figura 14. Imunofluorescência.	52
Figura 15. Liberação glial de ATP por exocitose.	53
Figura 16. Estímulo hiperosmótico no PVN.....	55
Figura 17. Papel dos astrócitos na liberação de ATP no PVN durante a sobrecarga de sal.....	67

LISTAS DE ABREVIações

PA: pressão arterial

HA: hipertensão arterial

SNC: sistema Nervoso Central

Dahl-SS: ratos Dahl-sal sensíveis

Dahl-SR: ratos Dahl-sal resistentes

BHE: barreira hematoencefálica

NANC: Não-adrenérgico não-colinérgico

E-NTPD: ectonucleosídeo trifosfato difosfohidrolase

E-NPP: ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase

E-5'-NT: ecto-5'-nucleotidase

AP: fosfatase alcalina

dn-SNARE: dominante negativa SNARE

SS: sobrecarga de sal

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 SAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL	14
1.1.1 HISTÓRICO.....	15
1.1.2 MECANISMOS FISIOLÓGICOS DA HIPERTENSÃO INDUZIDA DE SAL... 17	
1.1.3 HIPERTENSÃO NEUROGÊNICA	17
1.2 NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN)	19
1.3 NEUROTRANSMISSÃO PURINÉRGICA	21
1.4 NEUROTRANSMISSÃO PURINÉRGICA NO PVN	25
1.5 ECTONUCLEOTIDASES.....	Erro! Indicador não definido.
1.6 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM ASTRÓCITOS	Erro! Indicador não definido.
2. OBJETIVO.....	31
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
3. METODOLOGIA.....	32
3.1 ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	32
3.2 ANIMAIS	32
3.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E DO VOLUME DE INGESTÃO DE LÍQUIDOS. 32	
3.4 RADIOTELEMETRIA	33
3.5 ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E DO INTERVALO DE PULSO	34
3.6 ANÁLISE DO RNAM COM A TÉCNICA DE RT-qPCR	34
3.7 ANÁLISE DE PURINAS COM BIOSSENSORES	36
3.8 ABORDAGENS MOLECULARES PARA BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO ASTROGLIAL	37

3.9 ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE GLIOTRANSMISSORES E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ECTONUCLEOTIDASES.....	38
3.10 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS	39
3.11 PROCEDIMENTOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	39
3.12 ANÁLISE DAS IMAGENS COM MICROSCOPIA	40
3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
4. RESULTADOS	41
4.1 CONSUMO DE LÍQUIDO E RAÇÃO	41
4.2 CONTEÚDO DE Na^+ / K^+ E HEMATÓCRITO	42
4.3 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DECORRENTES DA SOBRECARGA DE SAL.....	43
4.4 ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PAS E IP.....	45
4.5 EXPRESSÃO GÊNICA DAS ECTONUCLEOTIDASES.....	48
4.6 LIBERAÇÃO DE ATP E ADENOSINA	49
4.7 ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES	51
4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA	52
4.9 LIBERAÇÃO GLIAL DE ATP POR EXOCITOSE.....	53
4.10 ESTÍMULO HIPEROSMÓTICO NO PVN	54
5. DISCUSSÃO	56
5.1 HIPERTENSÃO E BALANÇO AUTONÔMICO	56
5.2 A PRESENÇA DE ATP NO PVN NÃO DEPENDE DAS ECTONUCLEOTIDASES OU CONEXINAS	59
5.3 REATIVIDADE ASTROCITÁRIA E TRANSMISSÃO PURINÉRGICA	60
5.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS TRANSLACIONAIS DA SOBRECARGA DE SAL.....	63

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
6. CONCLUSÃO.....	68
REFERÊNCIAS.....	69

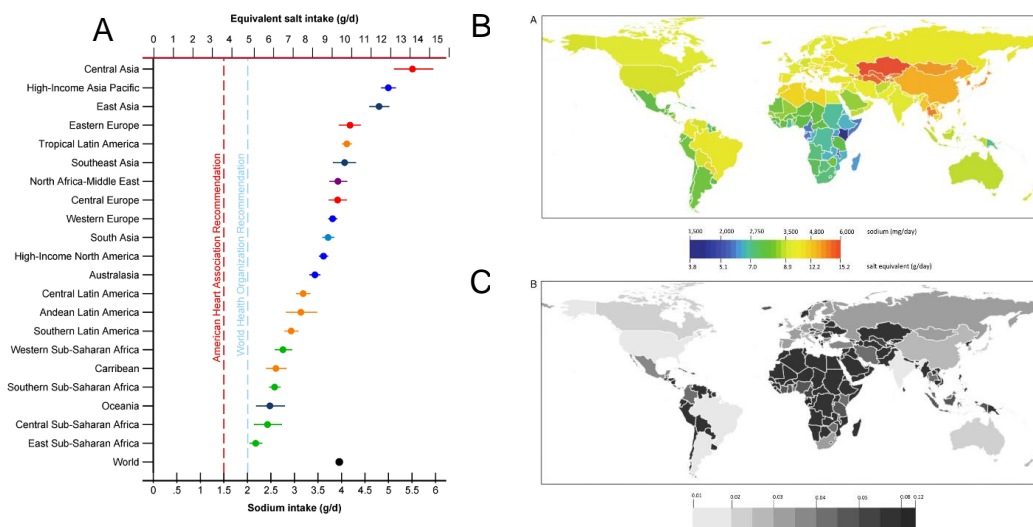
1. INTRODUÇÃO

1.1 SAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL

Os altos níveis de pressão arterial (PA), conhecido, como hipertensão arterial (HA), é a principal causa de doenças cardiovasculares que é responsável por mais de 18 milhões de mortes por ano (Frieden and Jaffe 2018). A HA é degenerativa e de etiologia multifatorial que pode ser agravada pelos maus hábitos alimentares da população em geral, principalmente em grandes centros urbanos onde o consumo de dietas hipercalóricas, ricas em gorduras e carboidratos, é elevado. Associado às dietas hipercalóricas, há também um grande vilão que ainda não aparece como protagonista, mas que oferece sérios transtornos para o controle da pressão arterial: o cloreto de sódio (NaCl), ou mais comumente chamado de sal!

A ingestão de sal excede o nível recomendado em quase todos os países do mundo (Powles, Fahimi et al. 2003). Em 2010, por exemplo, a ingestão média global de sal foi 10 g/dia, ou 4 g/dia de sódio (Na⁺), mais do que o dobro do limite recomendado tanto pela *American Heart Association* quanto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) figura 1A. Na América do Sul, a ingestão média de sal correspondeu a 7 g/dia, enquanto na América do Norte e em países da Europa ocidental, incluindo o Reino Unido, França, Alemanha e Grécia, os valores chegaram a quase 9 g/dia. Na Ásia, o consumo médio foi superior a 13 g/dia, equivalente a mais de 5,5 g/dia de Na⁺.

Figura 1. Ingestão global de sódio.



Em A: ingestão média de sódio em 21 regiões. Em B: ingestão de sódio por país, para maiores de 20 anos, média de ambos os sexos e em C: incerteza relativa. Fonte: Powles et al. 2013.

1.1.1 HISTÓRICO

A hipertensão causada pela alta ingestão de sal foi sistematicamente estudada ao longo do último século, sobretudo a partir dos estudos de Ambard e Beaujard em 1904 que demonstraram pela primeira vez na história que hipertensos tendiam a reter Na^+ quando ingeriam dieta com alto teor sal (*apud* MacGregor e Wardener 1998).

Ambard e Beaujard estudaram 6 pacientes com hipertensão essencial por um período de três semanas, onde a quantidade de sal na dieta variava de 3 g/dia até 14 g/dia. Na primeira circunstância, os pacientes apresentaram uma modesta queda dos níveis de pressão arterial (PA) e a quantidade Na^+ excretada na urina superava a quantidade ingerida, tornando o balanço de Na^+ positivo. Ao aumentarem a ingestão de sal para 14 g/dia, a PA tornou-se ainda maior do que o normal e a quantidade Na^+ excretada na urina era menor do que a ingerida, sugerindo que parte do Na^+ ingerido ficava retido no organismo dos pacientes.

A retenção de sal passou a ser então admitida na comunidade científica como uma das causas de edema e HA, e o consumo de dietas com restrição severa de sal (*rice and fruit diet*) passou a ser estimulado por médicos como tratamento da HA, até a produção dos primeiros diuréticos a partir da década de 1950 (DiNicolantonio and O'Keefe 2017).

Em 1947, o farmacologista britânico Ernest Basil Verney conduziu uma série de experimentos na *University College London* (UCL) demonstrando que a injeção intracarotídea de soluções hipertônicas de cloreto de sódio (NaCl), mas não de uréia, causava inibição da diurese em cachorros, e esta resposta era diminuída em cerca de 90% após a remoção do lobo posterior (Verney 1947). Verney sugeriu então que o sistema circulatório dispunha de “osmossensores” que detectavam alterações na pressão osmótica do sangue e regulavam a secreção do hormônio antidiurético pela neurohipófise, conhecimento que serviu como base para todas as descobertas que viriam adiante sobre a função do sistema nervoso central (SNC) na regulação do balanço hídrico e eletrolítico e subsequentemente no controle da PA.

Quase uma década após a descoberta de Verney, surgiu um dos nomes mais importantes na ciência relacionada aos estudos sobre o sal e seus efeitos no sistema circulatório: Lewis K. Dahl. Médico e pesquisador do Laboratório Nacional

Brookhaven (Upton, NY) Dahl publicou em 1960 o primeiro estudo populacional demonstrando que a incidência da HA variava com a média de consumo diário de NaCl em populações ao redor do mundo (Dahl 1960). Em populações mais primitivas onde o acesso a alimentos com alto teor de sal era limitado, como no Alasca onde vivem os esquimós, raramente se encontrava indivíduos hipertensos. Ao passo que no norte do Japão, onde o consumo de NaCl ultrapassava 25 gramas por dia, cerca de 40% da população apresentava HA.

A metodologia empregada por Dahl em seu estudo foi recebida com certo ceticismo por parte da comunidade acadêmica dada a subjetividade na classificação do consumo diário de NaCl entre as populações estudadas, a propósito, o levantamento preciso destes dados ainda naquela época seria bastante desafiador. Tal desconfiança levou o grupo de estudo INTERSALT a publicar em 1988 uma nova correlação com base em dados de excreção urinária de sódio de 24 horas que reflete uma estimativa mais precisa da ingestão deste íon (Intersalt 1988), já que a capacidade do organismo em retê-lo é definitivamente limitada no longo prazo (De Luca Jr, Menani et al. 2013). No entanto, os resultados confirmaram o que previamente fora demonstrado por Dahl de que em locais onde a excreção urinária de sódio era maior, os níveis de pressão arterial sistólica (PAS) também tendiam a ser maiores.

Dahl também identificou que em todos locais havia indivíduos que consumiam de forma consistente grandes quantidades de sal, mas que não desenvolviam HA, sugerindo que o *background* genético determinava a sensibilidade ao sal. Alguns anos mais tarde, após observar que o mesmo acontecia em roedores, publicou um artigo de duas páginas na renomada revista britânica *Nature*, onde apresentava duas cepas de animais experimentais criadas a partir de endo-cruzamentos de ratos Sprague-Dawley: os ratos Dahl sal-sensíveis (Dahl-SS) que desenvolviam HA após serem submetidos a uma dieta hipersódica (NaCl a 8%) e os ratos Dahl sal-resistentes (Dahl-SR) que permaneciam normotensos quando submetidos à mesma dieta hipersódica (Dahl, Heine et al. 1962). Ambas as linhagens são modelos animais experimentais utilizados até hoje na investigação dos mecanismos envolvidos na sensibilidade genética ou na resistência à hipertensão induzida por sal (Guo, Menga et al. 2015, Hashmat, Rudemiller et al. 2016, Yoshimoto, Onishi et al. 2019).

1.1.2 MECANISMOS FISIOLÓGICOS DA HIPERTENSÃO INDUZIDA DE SAL

A partir da década de 1960 começaram a surgir os primeiros experimentos que examinaram os mecanismos fisiológicos envolvidos com a HA induzida por sal. Dahl et al (1967) uniram um rato Dahl-SR com rato Dahl-SS em experimentos de parabiose e observaram que o rato Dahl-SR desenvolvia rapidamente HA quando era alimentado com uma dieta rica em sal, enquanto que a hipertensão no rato Dahl-SS era moderada, sugerindo que mecanismos humorais contribuía de maneira importante para a hipertensão induzida por sal e poderiam ser transmitidos experimentalmente entre os sistemas circulatórios de ambas cepas (Dahl, Knudsen et al. 1967).

Em estudos subsequentes, Dahl et al (1972) transplantaram os rins de um rato Dahl-SS em um rato Dahl-SR e observaram que cepa receptora desenvolvia HA severa quando era alimentada com dieta hipersódica (NaCl a 8%) e concluíram que o genótipo dos rins também desempenhava uma função decisiva na sensibilidade ao sal (Dahl, Heine et al. 1972).

Estes achados estavam em sinergia com a visão de que um aumento na ingestão de NaCl poderia assim, em um rim susceptível, provocar HA. Os fisiologistas Arthur C. Guyton e Thomas G. Coleman eram os principais apoiadores desta teoria, e na década de 1970 publicaram um modelo matemático onde revisavam alguns princípios do funcionamento do sistema circulatório, e projetavam a curva pressão-natriurese e seu papel no controle a longo prazo da pressão arterial (Guyton 1980).

De acordo com este modelo, a HA pode resultar de um defeito na capacidade renal de excretar Na^+ . Portanto, a PA se eleva para aumentar a taxa de filtração glomerular até que a excreção urinária de Na^+ seja aumentada de forma a reequilibrar o balanço entre a ingesta e a excreção. A sensibilidade ao sal conferiria a esta curva um descolamento para esquerda, enquanto a resistência ao sal a deslocaria para a direita.

1.1.3 HIPERTENSÃO NEUROGÊNICA

Ao final da década de 1970 surgiam os primeiros relatos contrapondo a visão de que os rins exerciam de fato o protagonismo na gênese da HA induzida por sal, já que a dieta hipersódica aumentava o débito cardíaco nas linhagens Dahl-SS e Dahl-

SR, mas produzia vasodilatação nos ratos Dahl-SR e vasoconstrição nos ratos Dahl-SS (Ganguli, Tobian et al. 1979).

Estudos subsequentes demonstraram que a simpatectomia química com 6-hidroxidopamina ou a denervação da cadeia simpática lombar minimizava o desenvolvimento da hipertensão induzida por sal na cepa Dahl-SS (Takeshita, Mark et al. 1979). Friedman et al 1979 demonstraram que a interrupção da função adrenérgica periférica com injeções subcutâneas de guanetidina evitou o desenvolvimento da HA em ratos Dahl-SS (Friedman, Tassinari et al. 1979).

Seguindo a mesma linha de evidências, Gordon et al., 1981 demonstraram que ratos Dahl-SS apresentavam uma ligeira diminuição na sensibilidade do barorreflexo e o bloqueio ganglionar da cadeia simpática promovido pela infusão intravenosa de 20 mg/kg de clorisdamina normalizava a pressão arterial de ratos Dahl-SS e Dahl-SR, sustentando a visão que distúrbios no sistema nervoso autônomo, sobretudo na subdivisão simpática, estariam diretamente envolvidos na gênese da HA durante a alta ingestão de sal (Gordon, Matsuguchi et al. 1981).

Ainda no final da década de 1970, outros estudos foram além ao demonstrar a importância de algumas regiões cerebrais na regulação das respostas cardiovasculares induzidas pela alta ingestão de sal. Lesões eletrolíticas na região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) hipotalâmico (Brody and Johnson 1979), no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Goto, Ikeda et al. 1981) ou no hipotálamo anteromedial (Azar, Ernsberger et al. 1981) impediam ou minimizavam a hipertensão induzida por sal em ratos Dahl-SS.

A região AV3V compreende duas estruturas interligadas: o núcleo preóptico mediano (MnPO) que apresenta formação completa de barreira hematoencefálica (BHE), e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), onde essa estrutura é fragmentada. A presença de capilares fenestrados nesta última estrutura bem como no órgão subfornicial (SFO), localizado na porção dorsal da lâmina terminal, tornam a BHE altamente permeável ao íon Na^+ e expõe as membranas dos neurônios e astrócitos às variações de pressão osmótica sanguínea (Kinsman, Nation et al. 2017, Nomura, Hiyama et al. 2019). Portanto, o OVLT e o SFO são denominados órgãos circumventriculares (CVOs) devido a localização periventricular e funcionam como duas estações sensoriais primárias do SNC que enviam os sinais decorrentes das

alterações de osmolaridade sanguínea e outros fatores humorais (como angiotensina-II circulante) para outros núcleos hipotalâmicos que controlam a atividade do sistema nervoso autônomo, dentre eles o PVN.

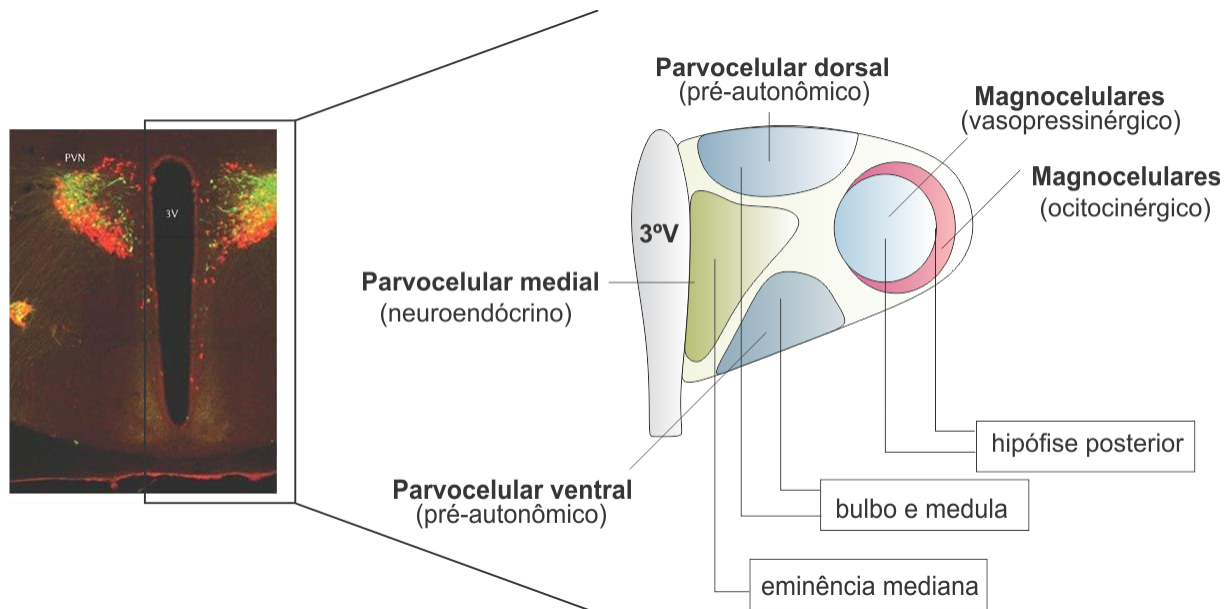
1.2 NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN)

Atualmente já é bem compreendido que a alta ingestão de sal pode aumentar tanto a osmolaridade quanto o conteúdo de Na^+ plasmático (hipernatremia) e desencadear resposta de sede, redução do apetite ao Na^+ e secreção de arginina vasopressina (AVP) na corrente sanguínea, aumentando a PA e produzindo efeito antiurético (Gizowski and Bourque 2018). Também estimula uma reação não uniforme do sistema nervoso simpático, definida como uma simpatoexcitação lombar e adrenal e simpatoinibição renal, que em conjunto tendem a redistribuir o fluxo sanguíneo da circulação sistêmica para os rins, produzindo efeito natriurético como *feedback* negativo e aumento da resistência vascular periférica e da PA (Weiss, Claassen et al. 1996, Kinsman, Browning et al. 2017). Uma parcela importante dessas reações é regulada por grupamentos neuronais do PVN que desempenham funções essenciais no contexto fisiológico de integração e processamento de informações neuroendócrinas e autonômicas.

Situado na porção ventral do diencefalo e adjacente ao terceiro ventrículo, o PVN é composto de duas classes principais de neurônios: os magnocelulares e parvocelulares. Morfologicamente, os magnocelulares apresentam corpo celular maior comparativamente aos parvocelulares e estão localizados na porção lateral do PVN. Constituem o eixo hipotálamo-neurohipofisário e seus fenótipos podem ser vasopressinérgicos ou oxitonérgicos. Suas terminações axonais se projetam para a hipófise posterior e são responsáveis pela secreção de AVP e oxitocina (OT) na corrente sanguínea. Uma subpopulação de neurônios parvocelulares localizados na porção medial do PVN, paralelamente à borda do terceiro ventrículo, se projeta para eminência mediana e são responsáveis pela liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio liberador de tireotrofina (TRH). Estimulam a hipófise a secretar corticotrofina (ACTH) e tireotrofina (TSH), respectivamente (Benarroch 2005).

Já os neurônios parvocelulares pré-autonômicos localizados na porção ventral e dorsal do PVN se projetam para uma série de regiões no tronco cerebral e na medula espinhal que exercem uma importante função no controle neural da circulação, via sistema nervoso autônomo. Tais regiões incluem o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e caudal (CVLM), onde se localizam os neurônios catecolaminérgicos C1 e A1, a porção compacta do núcleo ambíguo (NAc), o núcleo do trato solitário (NTS), a área pressora caudal (APC) e a coluna intermediolateral (IML) da medula espinhal (Geerling, Shin et al. 2010). São neurônios imunorreativos a AVP, OT, CRH, Tirosina Hidroxilase (TH), angiotensina, entre outros (Geerling, Shin et al. 2010).

Figura 2. Núcleo Paraventricular do Hipotálamo.



À esquerda: imunofluorescência de neurônios vasopressinérgicos (verde) e ocitocinérgicos (vermelho) do PVN. À direita: representação esquemática das subpopulações neuronais do PVN, adaptado de Kandel, Schwartz et al. 2000 e Ludwig e Leng, 2006.

Em um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que a integridade do PVN bem como das aferências que partem dos CVOs tem um papel importante na resposta simpatoexcitória durante elevação da osmolaridade plasmática (Antunes, Yao et al. 2006). Subsequentemente foi avaliado a importância das projeções vasopressinérgicas do PVN para a medula espinhal. Os resultados demonstraram que a injeção intratecal de um antagonista do receptor V1a para vasopressina deprimiu aproximadamente 25% a resposta de simpatoexcitatória do

nervo lombar estimulado por solução hipertônica de NaCl, indicando que a simpático-excitação causada pela hiperosmolaridade é mediada, em parte, por vias neuronais vasopressinérgicas entre o PVN e a medula espinal.

Ao nível sináptico o microambiente neuronal do PVN é controlado por uma série de *inputs* interoceptivos, humorais, límbicos e intrahipotalâmicos que foram sistemicamente revisados na literatura (Benarroch 2005). No que se refere aos neurotransmissores e neuromoduladores que são liberados no PVN durante a hiperosmolaridade pode-se destacar a angiotensina-II (Chen and Toney 2001), o glutamato (Antunes, Yao et al. 2006) e AVP (Ribeiro, Panizza et al. 2015). Mais recentemente, estudos do nosso laboratório identificou um novo candidato como potencial neurotransmissor: o trifosfato de adenosina (ATP) (Ferreira-Neto, Ribeiro et al. 2017)

1.3 NEUROTRANSMISSÃO PURINÉRGICA

O ATP é uma molécula constituída por uma purina, a adenina, ligada a um açúcar, a ribose, conjugada com três radicais fosfato. A hidrólise da ligação do último radical fosfato libera cerca de 7 Kcal/mol de substância que é então usado pela células para o cumprimento de suas funções vitais. No entanto, além de ser fonte primária de energia o ATP e seus derivados também foram identificados como importantes moléculas de sinalização extracelular. Essa conclusão partiu de estudos demonstrando que o nucleotídeo monofosfato de adenosina (AMP) e o nucleosídeo adenosina exerciam efeito cronotrópico negativo no coração e dilatador em vasos coronarianos (Drury and Szent-Györgyi 1929). Anos mais tarde, Pamela Horton demonstrou que o ATP era liberado por nervos sensoriais na orelha de coelhos ao serem estimulados de forma antidrômica (Holton 1959).

Mas somente alguns anos mais tarde que a ideia do ATP como neurotransmissor começou a ser disseminada na literatura, sobretudo a partir das publicações do neurocientista britânico Geoffrey Burnstock que foi presidente do Centro de Neurociência Autônoma da Faculdade de Medicina da *University College London* (UCL).

Em suas primeiras publicações, Burnstock observou por meio de uma preparação de músculo liso intestinal *-taenia coli-* que o estímulo elétrico transmural

provocava hiperpolarização e relaxamento do músculo liso. Além disso, notava-se que a hiperpolarização se cessava com a tetrodotoxina (TTX) que é uma neurotoxina que bloqueia canais de Na^+ dependentes de voltagem e inibe a condução nervosa sem afetar a atividade muscular lisa. Portanto, sugeria que o estímulo transmural ativava potenciais juncionais inibitórios de nervos que não eram nem adrenérgicos nem colinérgicos (NANC), já que o tecido tinha sido previamente incubado com 6-hidroxi-dopamina e atropina (Burnstock, Campbell et al. 1963).

Em uma série de trabalhos subsequentes, Burnstock e seu grupo de pesquisa observaram que o ATP satisfazia todos os critérios moleculares para a definição desta purina como neurotransmissor, uma vez que era sintetizado e armazenado nos terminais dos nervos NANC e sua liberação ocorria durante a estimulação nervosa por um mecanismo dependente de Ca^{2+} . Além disso, o ATP era inativado por ectoenzimas e tinha sua sinalização bloqueada por um antagonista e, portanto, estes foram critérios que levaram Burnstock a cunhar o termo “sinalização purinérgica” (Burnstock, Campbell et al. 1970, Burnstock 1972). O grupo também demonstrou que o ATP não era apenas liberado pelos nervos NANC, mas também pelos terminais dos nervos simpáticos que inervavam o músculo liso da *taenia coli*. Assim, foi estabelecido que o ATP era co-liberado com a noradrenalina pelos nervos simpáticos (Burnstock 1990).

Ao longo dos anos vários estudos mostraram que diversos estímulos levam a liberação de ATP por células de mamíferos, inclusive alterações no volume celular (Hazama, Shimizu et al. 1999), estresse mecânico (Grygorczyk and Hanrahan 1997), hipóxia/hipercapnia (Marina, Turovsky et al. 2017) ou em resposta ao cAMP (Schwiebert, Egan et al. 1995). Uma vez liberado, o ATP interage com duas classes principais de receptores purinérgicos: os ionotrópicos P2X que apresentam dois domínios transmembranares e os metabotrópicos P2Y com 7 domínios transmembranares (Stojilkovic 2009). Os primeiros são canais iônicos permeáveis ao Na^+ , K^+ e Ca^{2+} e formam sete diferentes subtipos de receptores: P2X₁ ao P2X₇. Os metabotrópicos formam 8 subtipos: P2Y₁, P2Y₂, P2Y₄, P2Y₆, P2Y₁₁, P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄, sendo que os quatro primeiros estão acoplados à proteína Gq e, portanto, quando estimulados ativam fosfolipase C (PLC) para produzirem inositol-trifosfato (IP3) e mobilizar Ca^{2+} a partir dos retículos, e os P2Y₁₂, P2Y₁₃, P2Y₁₄ se acoplam a

diferentes proteínas G, incluindo a Gs, a Gi e a Gi/o, que ativam distintas cascatas de sinalização intracelular (Stojilkovic 2009).

O ATP extracelular também pode ser metabolizado pelas ectonucleotidases podendo levar em última instância à formação do nucleosídeo adenosina. A adenosina também influencia a atividade celular por meio da sinalização a receptores purinérgicos P1. Estes se apresentam em quatro subtipos: A₁, A_{2A}, A_{2B} e A₃. Os receptores A₁ e A₃ estão acoplados à proteína Gi/o e exercem efeito inibitório, enquanto os receptores A_{2A} e A_{2B} estão acoplados à proteína Gs e, portanto, são excitatórios (Stojilkovic 2009). A adenosina no eixo hipotálamo-neurohipofisário parece exercer majoritariamente efeito inibitório por meio da sinalização de receptores A₁ (Stojilkovic 2009).

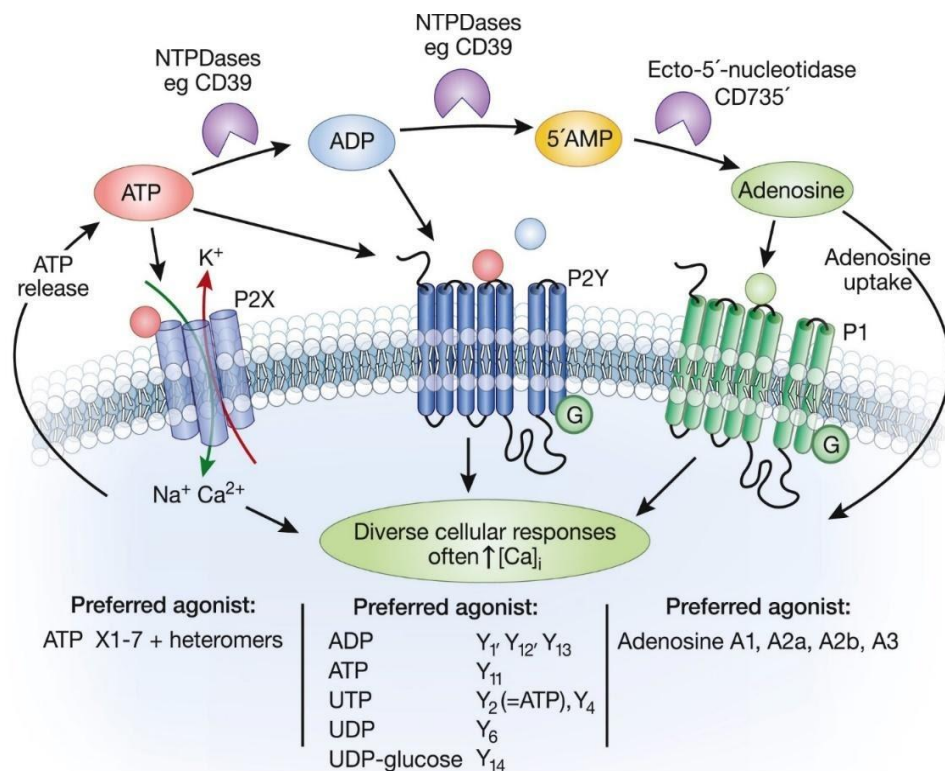
Tabela 1. Ectonucleotidases.

Família	Enzimas/gene	Características	Localização no SNC	Substratos	Afinidade (Km, μ M)	Produtos
E-NTPDases	E-NTPDase 1 (CD39)	Ancorada à	Córtex Cerebral;	NTP e NDP	ATP: 17	NMP + Pi
	E-NTPDase 2 (CD39/L1)	membrana por	Hipotálamo; Bulbo	NTP e NDP	ATP: 70	
	E-NTPDase 3 (CD39/L3)	domínios C	Olfativo; Bulbo (porção	NTP e NDP	ATP: 75	
	E-NTPDase 8	(COOH) e N	ventral e dorsal);		ATP: 81-226	
	E-NTPDase 4 (UDPase -hIALP70)		Membrana Plasmática	NTP e NDP,	UDP, GDP: 200-500	
	E-NTPDase 5 (CD39/L4)	Intracelular	da Microglia;	mas pouco	GDP: 130	
	E-NTPDase 6 (CD39/L2)		Microvasos Cerebrais;	ATP e ADP	-	
E-NTPDase 7 (LALP1)		Parede Lateral do		-		
E-NPPs	E-NPP 1 (PC-1)	Ancorada à	Córtex Cerebral;	NTP e NDP	ATP: 50-500	NMP + Pi + PPI
	E-NPP 2 (Autotaxina)	membrana por	Hipotálamo; Bulbo	ADP-ribose	100	AMP + ribose-5-fosfato
	E-NPP 3 (Gp130 ^{RB13-6})	Domínio N-	Olfativo; Bulbo (porção	Lisofosfatidilc	200	Ácido lisofosfatídico
	E-NPP 4	Terminal	ventral e dorsal);	olina		
	E-NPP 5		?	-	-	-
	E-NPP 6					
	E-NPP 7					
Prostatic acid phosphatase	TM-PAP (ACPP isoforma 1)	Transmembrana	Não expressada no	ATP-AMP	?	ADP-Adenosina
	sPAP (ACPP isoforma 2)	Secretada	SNC	ATP-AMP		
Fosfatase Alcalina (AP)	TNAP (Tecido não-específico AP)	Glicofosfatidilino sitol	Hipotálamo; Tálamo;	NTP, NDP, NMP	ATP: 40	Nucleosídeo + Pi
			Bulbo Olfativo; Bulbo (porção ventral e dorsal); Córtex Cerebral;			
-	Ecto-5'-Nucleotidase (CD73)	Glicofosfatidilino sitol	Hipocampo; córtex cingular; cerebelo	NMP	AMP: 1-50	Nucleosídeo + Pi

NMP: Nucleosídeo Monofosfato; NDP: Nucleosídeo Difosfato; NTP: Nucleosídeo Trifosfato; Pi: Fosfato inorgânico; PPI: Pirofosfato inorgânico. Referências: Langer et al. (2008); Zimmermann et al. (2009); Zimmermann et al. (2012); Mathieu (2012); Morandini et al. (2014).

Como é apresentado na tabela 1, as ectonucleotidasas abrangem várias famílias de enzimas que metabolizam o ATP em outros nucleotídeos, como ADP e AMP, e a adenosina. Existem ectonucleotidasas pertencentes às famílias ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPD), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), além da fosfatase alcalina (AP) e da ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) (Langer, Hammer et al. 2008). Alguns subtipos dentro das famílias E-NTPDases (NTPDase_{1,2,3 e 8}) e E-NPP (E-NPP_{1 e 3}) hidrolisam moléculas de ATP e adenosina difosfato (ADP) em moléculas de adenosina monofosfato (AMP) resultando em aumento da concentração extracelular de AMP e fosfato inorgânico (Zimmermann, Zebisch et al. 2012). A fosfatases alcalina e a ecto-5'-nucleotidase catalisam as reações de degradação de AMP em adenosina e ambas são ancoradas à membrana celular por meio do glicosilfosfatidilinositol (Zimmermann, Zebisch et al. 2012).

Figura 3. Papel das E-NTPDs e E-5'-NT na sinalização purinérgica.



O ATP extracelular pode ser metabolizado pelas NTPDases (ou CD39) levando a formação dos nucleotídeos ADP e AMP. O AMP, por sua vez, pode ser transformado em adenosina pela Ecto-5'-nucleotidase (ou CD735). O ATP e ADP interagem com receptores P2X e P2Y que são essencialmente excitatórios, enquanto a adenosina interage com receptores pré-sinápticos que podem ser tanto excitatórios (A2A e A2B) quanto inibitórios (A1 e A3). Fonte: Menzies et al. (2017)

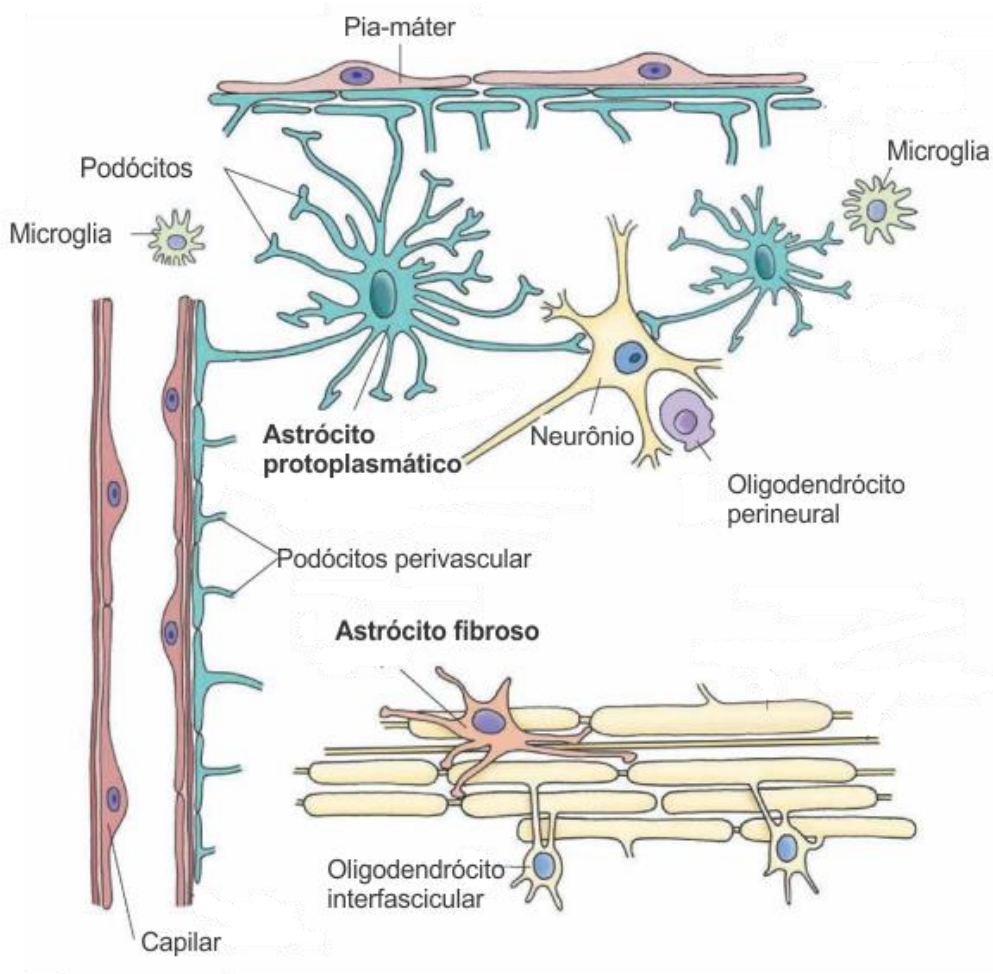
Um outro componente importante que participa da sinalização purinérgica são as células da glia e várias linhas de pesquisa sugerem que os astrócitos podem ser a principal fonte de ATP no SNC (Anderson, Bergher et al. 2003, Coco, Calegari et al. 2003, Hamilton and Attwell 2010, Bohmbach, Schwarz et al. 2018). Este consenso teve como base experimentos iniciais demonstrando que os astrócitos requerem ATP não apenas como substrato energético, mas também como um mensageiro parácrino para a propagação das ondas de Ca^{2+} intracelular (Guthrie, Knappenberger et al. 1999). Nesse contexto, um mecanismo provável para a propagação intercelular de Ca^{2+} nos astrócitos seria a liberação de ATP através das conexinas ou hemicanais (Stout, Costantin et al. 2002).

1.6 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM ASTRÓCITOS

Os astrócitos formam a maioria das células da glia no SNC e de acordo com suas características morfológicas e localização podem ser classificados em duas classes principais: os astrócitos protoplasmáticos, cujos processos citoplasmáticos são mais espessos e numerosos e estão localizados na substância cinzenta, e os astrócitos fibrosos, que apresentam processos citoplasmáticos longos e estreitos e são encontrados principalmente na substância branca. Contudo, vários outros subtipos foram identificados de acordo com a especificidade da região cerebral, incluindo glia de *Bergmann*, glia ependimária, glia marginal, glia radial, glia perivascular, glia velada e tanicitos (Kim, Park et al. 2019).

Estas células desempenham uma função central na homeostase cerebral pois estão envolvidas com a regulação do fluxo sanguíneo local, na constituição da barreira hematoencefálica, dão suporte estrutural e metabólico aos neurônios e também são responsáveis pela captação de glutamato e potássio (K^+) extracelular (Franke, Verkhratsky et al. 2012, Yang, Gao et al. 2013). Além de estabelecerem um ambiente neuroquímico apropriado, os astrócitos podem modular a atividade neuronal por um mecanismo que se inicia com deflagração de ondas de Ca^{2+} intracelular acarretando na liberação de gliotransmissores (Hamilton and Attwell 2010).

Figura 4. Características morfológicas e localização dos astrócitos protoplasmáticos e fibrosos.



Os astrócitos protoplasmáticos, cujos processos citoplasmáticos são mais espessos e numerosos e estão localizados na substância cinzenta, e os astrócitos fibrosos, que apresentam processos citoplasmáticos longos e estreitos e são encontrados principalmente na substância branca. Disponível em: <http://what-when-how.com/neuroscience/histology-of-the-nervous-system-the-neuron-part-2/>.

Os astrócitos estão ativamente envolvidos na modulação de sinalização neuronal. Essas células juntamente com os neurônios formam a sinapse tripartite, sendo que um único astrócito no cérebro humano pode, dentro de seu domínio, acomodar até 2 milhões de sinapses (Hol and Pekny 2015). A função dos astrócitos na liberação de gliotransmissores emergiu a partir de estudos demonstrando que o glutamato podia evocar ondas de Ca^{2+} intracelular em cultura in vitro de astrócitos (Cornell-Bell, Finkbeiner et al. 1990) e que estas ondas podiam ser propagadas entre os astrócitos por meio de junções comunicantes, elevando inclusive a concentração intracelular de Ca^{2+} em neurônios adjacentes (Nedergaard 1994).

Estudos subsequentes demonstraram que o glutamato liberado por terminais neuronais também evocava ondas de Ca^{2+} em astrócitos que, por sua vez, estimulava a liberação glial de glutamato, como uma alça de *feedback* positivo que potencializa o efeito excitatório deste transmissor (Porter and McCarthy 1996). Outros gliotransmissores foram identificados ao longo dos anos incluindo a D-serina (Mothet, Pollegioni et al. 2005), a taurina (Kimmelberg, Goderie et al. 1990), o lactato (Tang, Lane et al. 2014), o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Kozlov, Angulo et al. 2006), e o ATP (Guthrie, Knappenberger et al. 1999).

Os mecanismos da liberação glial de ATP bem como de outros gliotransmissores podem ser classificados em dois grupos: (1) mecanismos não-exocitóticos, que envolvem difusão através de canais iônicos regulados por volume (VRAC), por hemicanais, através do receptor purinérgico P2X_7 e por meio de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs); e (2) exocitótico, o qual envolve o acúmulo de ATP nas vesículas sinápticas e subsequente inserção na membrana plasmática guiada pelas proteínas que formam o complexo SNARE (Hamilton and Attwell 2010).

Um importante avanço nos estudos sobre a interação entre os neurônios e a glia no SNC ocorreu a partir da criação do modelo animal experimental com camundongos transgênicos que expressam proteína vesicular SNARE dominante negativa (dn-SNARE) (Pascual, Casper et al. 2005). Neste modelo experimental a proteína dn-SNARE é expressa no citosol dos astrócitos e interfere na formação do complexo SNARE entre a proteína sinaptobrevina (VAMP3), presente na membrana vesicular, com as proteínas associadas à membrana plasmática - sintaxina e sinaptosomal (SNAP-23). A dn-SNARE se liga à sintaxina e a SNAP-23 competindo o sítio de ligação com a VAMP3, impedindo a ancoragem e a fusão de vesículas carregadas com gliotransmissores na membrana plasmática dos astrócitos.

A interferência na formação do complexo SNARE e na fusão de vesículas na membrana plasmática de astrócitos passou a ser possível inclusive em estudos realizados em ratos (Sheikhabaei, Turovsky et al. 2018). A possibilidade é dada pela microinjeção de vetores virais no SNC que direcionam a expressão da proteína dn-SNARE sobre o sítio promotor GFAP, tornando a expressão seletiva em astrócitos. Esta abordagem, por sua vez, exerce uma vantagem sobre à transgenia por

possibilitar o estudo da gliotransmissão em regiões cerebrais específicas, e não no SNC em sua totalidade. Este método foi utilizado recentemente em dois estudos que demonstraram pela primeira vez que os astrócitos localizados na superfície ventral do bulbo liberam gliotransmissores, sobretudo o ATP, que exercem um papel importante no controle da respiração (Sheikhabahaei, Turovsky et al. 2018), bem como na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (Marina, Christie et al. 2020).

1.4 NEUROTRANSMISSÃO PURINÉRGICA NO PVN

Nas últimas cinco décadas a sinalização purinérgica se tornou um aspecto importante na neurotransmissão em muitos núcleos encefálicos envolvidos em diferentes condições fisiopatológicas (Burnstock 2007), influenciando inclusive respostas autonômicas e neuroendócrinas ao nível do PVN (Knott, Marrero et al. 2008, Cruz, Bonagamba et al. 2010, Ferreira-Neto, Yao et al. 2013).

A contribuição do nosso laboratório começou a partir de 2013 quando foi demonstrado que a administração exógena de ATP no PVN promovia aumento dose-dependente da atividade do nervo simpático lombar em ratos (Ferreira-Neto, Yao et al. 2013). Curiosamente, o antagonismo local de tanto dos receptores purinérgicos do tipo P2 (com administração de PPADS) bem como dos receptores não-NMDA (AMPA/Kainato) para glutamato (com CNQX) atenuaram a simpato-excitação, sugerindo, portanto, a existência de uma interação purino-glutamatérgica (Ferreira-Neto, Yao et al. 2013).

Posteriormente, estudos mais detalhados dos mecanismos ao nível sináptico por meio da técnica de eletrofisiologia de registro neuronal *whole-cell patch clamp* foi demonstrado que o ATP exógeno elevava a frequência de potenciais de ação dos neurônios do PVN que se projetavam para o RVLM e, além disso, aumentava as correntes de entrada mediadas via ativação dos receptores AMPA por um mecanismo que dependia de Ca^{2+} intracelular (Ferreira-Neto, Antunes et al. 2015). Contudo, havia ainda uma questão importante a ser respondida sobre em qual condição fisiológica poderia envolver a liberação endógena do ATP no microambiente neuronal do PVN?

Os autores notaram que os neurônios do PVN identificados com projeção direta ao RVLM, ao serem expostos em meio com solução hipertônica (manitol 1%) exibiam um aumento similar da amplitude das correntes de entrada via ativação dos receptores

AMPA, e o PPADS normalizava este efeito (Ferreira-Neto, Antunes et al. 2015). Surgia-se então o primeiro indicativo que o ATP poderia ser liberado no PVN durante um desafio hiperosmótico e mais ainda, que esses neurônios hipotalâmicos tinham conexões diretas com o tronco-encefálico, como parte de uma via integrativa neuronal autonômica.

Na sequência dos estudos, experimentos mais recentes demonstraram que o estímulo hiperosmótico agudo com solução hipertônica de NaCl (3M) ou manitol (10%), injetadas intravenosamente em animais experimentais, promoveu uma intensa ativação em neurônios do PVN, identificados pela imunomarcagem da proteína FOS e grande parte desses neurônios eram purinérgicos, pois expressavam receptores P2X₂. Além disso, no mesmo conjunto de experimentos foi demonstrado que a simpatoexcitação decorrente do estímulo hiperosmótico foi significativamente atenuada pelo antagonismo dos receptores P2 do PVN com o uso de PPADS (Ferreira-Neto, Ribeiro et al. 2017).

Embora os estudos acima conectam diretamente a hiperosmolaridade com ativação de vias purinérgicas em neurônios do PVN e respostas simpatoexcitórias, é importante destacar que todos os experimentos até então foram feitos com desafio osmótico agudo, mas nenhum, que seja do nosso conhecimento, havia ainda demonstrado se a sobrecarga de sal ao longo do tempo induziria de fato a liberação de ATP no PVN e se essa purina teria alguma função importante na hipertensão induzida por sal. Ademais, uma pergunta relevante que norteou o desenvolvimento do presente estudo foi sobre a origem e qual(s) mecanismo(s) envolvido(s) na liberação de ATP no ambiente neuronal do PVN na hipertensão induzida por sobrecarga de sal.

Dessa forma, aventamos em primeiro lugar a hipótese de que a sobrecarga de sal poderia estimular o acúmulo de ATP no PVN como resultado de uma falha das ectonucleotidases em hidrolisar o ATP em adenosina. No entanto, alternativamente seria possível que a sobrecarga de sal também estimulasse os astrócitos do PVN a liberarem ATP, levando como consequência a ativação dos neurônios do PVN.

Para responder tais questões, foi concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) uma Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) que nos possibilitou trabalhar em parceria com o Professor Alexander V. Gourine, em seu laboratório no Departamento de Neurociência, Fisiologia e

Farmacologia da *University College London* (UCL) entre outubro de 2018 à outubro de 2019. Avaliamos em primeiro lugar a liberação glial de ATP e adenosina utilizando biossensores que detectam em tempo real a presença destas purinas em fatias coronais do hipotálamo incluindo o PVN. Numa etapa subsequente investigamos se a sobrecarga de sal ativaria os astrócitos do PVN bem como de outras regiões cerebrais, como no córtex e no hipocampo. Por fim, também exploramos se as vias não-excitóticas astrocíticas (como conexinas e receptores P2X7) bem como excitóticas, por meio da expressão viral da proteína SNARE dominante negativa (dn-SNARE) no citosol dos astrócitos do PVN, poderiam estar envolvidas com a liberação glial de ATP nesse microambiente neuronal.

2. OBJETIVO

Avaliar a participação da glia e das ectonucleotidases na regulação do ATP no microambiente neuronal do PVN em resposta ao estímulo hiperosmótico com sobrecarga de sal.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Monitorar os parâmetros cardiovasculares durante a sobrecarga de sal;
- Quantificar a liberação de ATP e adenosina no PVN em animais com sobrecarga de sal e respectivos controles;
- Avaliar a função da glia do PVN na liberação de ATP em resposta à sobrecarga de sal;
- Avaliar a expressão gênica bem como a atividade das ectonucleotidases no PVN de animais com sobrecarga de sal e controles;

3. METODOLOGIA

3.1 ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Todos os procedimentos experimentais realizados no Brasil estiveram de acordo com os Princípios Éticos em Pesquisa Animal, exigidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB / USP) sob o protocolo 111-108/2011. Os procedimentos realizados no Reino Unido também estiveram de acordo com a Diretrizes da Comissão Europeia 2010/63/UE (*European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes*) e com UK Home Office (*Scientific Procedures*) Act (1986) com a aprovação do projeto pelo Comitê Institucional de Cuidado e Uso de Animais da UCL.

3.2 ANIMAIS

Ratos Wistar 290-350 g (n = 12) foram utilizados nos experimentos conduzidos no Brasil e Sprague Dawley 200-250 g (n = 41) para os experimentos realizados no Reino Unido. Os ratos Wistar foram alocados em gaiolas individuais e distribuídos aleatoriamente em: 1) grupo controle, mantido com dieta padrão e recebendo água da torneira; e 2) grupo com sobrecarga de sal (SS) que foi mantido em dieta padrão e recebeu solução de NaCl a 2% no lugar da água da torneira por 7 dias. Uma parcela destes animais foi direcionada para os experimentos com ciclos invertidos, em que as luzes eram apagadas às 7:00 da manhã. No Reino Unido, separamos os animais em grupos controle e SS com 4 dias de exposição à solução de NaCl a 2%. Os ratos foram mantidos a uma temperatura constante de 22-24 °C a uma umidade relativa de 50-60% sob um ciclo claro-escuro controlado (12:12 h; luzes acesas às 7:00 da manhã) com ração normal e água potável (ou solução de NaCl 2%) *ad libitum*.

3.3 ANÁLISE HEMATOLÓGICA E DO VOLUME DE INGESTÃO DE LÍQUIDOS

O consumo de líquidos (água ou solução de NaCl 2%) e alimentar foi monitorado diariamente de forma não cumulativa utilizando uma proveta e uma balança para pesagem dos pellets de ração, respectivamente. Em animais

profundamente anestesiados com overdose de anestésico (pentobarbital sódico, 200 mg kg⁻¹, i.p.) amostras do líquido cefalorraquidiano foram obtidas a partir da sucção do conteúdo da cisterna magna e amostras de sangue (por punção intracardíaca), as quais foram centrifugadas e congeladas a -20°C para posterior análise da concentração de Na⁺ e K⁺ por um fotômetro de chama. Amostras de sangue também foram coletadas por capilares de vidro e centrifugados para análise imediata do hematócrito sanguíneo.

3.4 RADIOTELEMETRIA

Os telêmetros para monitoramento da PA e FC foram implantados entre 5 a 7 dias antes do início do registro dos parâmetros cardiovasculares. Para os procedimentos cirúrgicos de implante dos telêmetros os animais foram anestesiados com isoflurano (5% para indução e 2,5 % para manutenção) (Cristália, São Paulo, SP, Brasil) inspirado em O₂ medicinal (Oxilumen, São Paulo, SP, Brasil). O nível de anestesia foi verificado com frequência, avaliando os reflexos de retirada dos membros inferiores com pinçamento interdigital.

Os animais foram posicionados supinamente em uma mesa cirúrgica e uma incisão foi realizada na linha média da parede abdominal com bisturi cirúrgico. Cerca de 2 centímetros do fio do transmissor TRM54P (KAHA Science Ltd. Auckland, Nova Zelândia) foi introduzido na aorta, caudal à raiz da artéria renal esquerda e fixado com cola superbonder (Henkel Ltda., São Paulo, SP, Brasil). O telémetro foi posicionado dentro da cavidade abdominal e suturado à parede ventral do músculo abdominal. Todos os animais receberam antibiótico profilático (penicilina/estreptomicina 1.200.000 UI/mL, Fort Dodge, Brasil) e cetoprofeno (Biofen 1% - BiofarmaLtda, Brasil) por via subcutânea por 3 dias após a cirurgia.

O programa de aquisição de dados (LabChart v.8, PowerLab, ADInstruments, Austrália) foi ajustado para realizar registros diários de pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC) com duração de 20 minutos, com uma frequência de amostragem de 2 KHz. Os registros foram agendados para os seguintes horários: 9:00h, 13:00h, 17:00h, 21:00h, 1:00h e 5:00h.

3.5 ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PRESSÃO ARTERIAL SISTÓLICA E DO INTERVALO DE PULSO

Para a análise espectral da pressão arterial sistólica (PAS) e do intervalo de pulso (IP), sequências de valores consecutivos de ambos parâmetros foram extraídos de dois segmentos de no máximo 5 minutos cada do registro da PAP em cada dia (um seguimento de 5 minutos do registro realizado às 09:00h e outro do registro realizado às 21:00h) foram analisados pelo software CardioSeries v2., gentilmente concedido por Daniel Penteadó (disponível em <http://www.danielpenteadó.com/cardioseries>). Séries temporais foram redimensionadas para 10 Hz, divididas em segmentos contínuos de 512 valores e sobrepostos a 50%. Os espectros da PAS e do IP foram calculados usando o algoritmo transformada rápida de Fourier (FFT). Dois componentes oscilatórios majoritários foram observados a partir do espectro: bandas de baixa frequência (LF; 0,20 a 0,75 Hz) referente a modulação simpática para o coração (quando a análise é do IP) ou para os vasos sanguíneos (quando a análise é da PAS) e de alta frequência (HF; 0,75 a 3,00 Hz) referente a modulação parassimpática para o coração (apenas análise do IP foi considerada). As potências das bandas LF e HF foram calculadas pela área sob a curva e comparadas entre os grupos SS e controle (Gomes, Sá et al. 2017, Sá, Haibara et al. 2017).

3.6 ANÁLISE DO RNAm COM A TÉCNICA DE RT-qPCR

Iniciamos os estudos das ectonucleotidases a partir da investigação da expressão gênica das isoformas E-NTPD 1, 2 e 3 no PVN que de acordo com a literatura são amplamente expressas no SNC (tabela 1), incluindo no hipotálamo, e apresentam alta afinidade ao ATP, além de serem típicas enzimas localizadas na membrana celular e, portanto, presumivelmente regulam o ATP extracelular que atua como transmissor. Também estudamos a E-5'-NT que está envolvida com a produção de adenosina a partir da catálise de AMP. Como ilustrado na figura 2, as E-NTPDs convertem ATP em ADP e ADP em AMP, enquanto a E-5'-NT converte AMP em adenosina.

Para tanto, findado os sete dias de ingestão de solução de NaCl 2%, os animais foram rapidamente decapitados sem uso de anestésico, os cérebros foram removidos do crânio e colocados em uma matriz cerebral (Stainless Steel Rodent Brain Matrix,

Adult Rat, Coronal Sections, Slice Width 1.0 mm, ASI Instruments® Inc., MI, USA) previamente imersa em gelo. Em seguida foi feita uma secção coronal de 1 mm de espessura do hipotálamo, contendo o PVN, e depositadas em uma placa de petri resfriada. Os núcleos bilaterais do PVN foram cuidadosamente dissecados com a ajuda visual de um estereomicroscópio (Leica, Alemanha) e um microbisturi (Fine Science Tools, CA, USA). Para coleta do PVN utilizamos como referência neuroanatômica visual o quiasma óptico. Os tecidos coletados foram mantidos em tubos de centrifugação para subseqüentes procedimentos de extração de RNAm. Coletamos também amostras do tecido renal que foram armazenadas em freezer -80°C para posterior quantificação em tempo real (RT-qPCR) para controle positivo da expressão gênica das ectonucleotidases.

O RNA total destas amostras foi extraído utilizando o kit Illustra RNAspin Mini Kit da General Electric seguindo as instruções do fabricante. As amostras foram quantificadas em espectrofotômetro (“Nanodrop 3300” - Thermo scientific, Bremen, Alemanha). A síntese de cDNA foi realizada com o kit da SuperScript® III Reverse Transcriptase (Invitrogen™) a partir de 1 µg de RNA total.

A reação de amplificação foi realizada no Rotor Gene Q (Qiagen®) utilizando o kit SYBR Green Jump Start Taq Ready Mix sem MgCl₂ # S5193 400 RXN (Sigma-Aldrich Co.®). Os valores de threshold (ΔC_t) e de $\Delta\Delta C_t$ foram determinados a partir dos genes de referência 36B4 e HPRT. Sequências oligonucleotídicas (primers) para *rattus norvegicus* foram construídas a partir do banco de dados GenBank (NLM/NCBI) disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>. Os primers *forward* (F) e *reverse* (R) utilizados estão listados na tabela 2 (Exxtend Cia; Campinas, São Paulo, Brasil).

Tabela 2. Primers *forward* (F) e *reverse* (R) para ectonucleotidases.

Genes	Primers (5'→3')	
ENTPD1 (CD39)	AGTATGGGATTGTGCTGGATG (F)	TCTGAGCGTATTTTGAGATTCCG (R)
ENTPD2 (CD39/L1)	GATCCAGGCAACGAGGTTCA (F)	GAAGCGATGGATCTGGAGGG (R)
ENTPD3 (CD39/L3)	AGATAGGGCCCCACTCAACT (F)	TCTCCCTCCGTATTCCTCCT (R)
E-5'-5NTE (CD73)	CATTCGTGAAGATGCAGCCAT (F)	GCGGAGCCATTCAGGTAGAC (R)

3.7 ANÁLISE DE PURINAS COM BIOSSENSORES

A partir deste tópico, os procedimentos descritos foram em sua maioria conduzidos nos animais que ingeriram solução de NaCl a 2% por 4 dias, com exceção os experimentos descritos no quinto parágrafo deste tópico em que os animais não ingeriram solução de NaCl a 2%. Portanto, findado os quatro dias de ingestão de NaCl foi dado início a análise da liberação de ATP e adenosina. Para este procedimento, ratos SS foram anestesiados profundamente com overdose de isoflurano e imediatamente decapitados. Os cérebros foram removidos e colocados em líquido cefalorraquidiano artificial gelado (aCSF) contendo NaCl 120 mM, KCl 3 mM, NaH_2PO_4 1 mM, NaHCO_3 22 mM, MgCl_2 1 mM, CaCl_2 2 mM e glicose 10 mM saturado com 95% O_2 / 5% CO_2 . Fatias coronais hipotalâmicas contendo PVN foram cortadas com espessura de 350 μm usando um vibrátomo (Campden Instruments 7000 smz; Loughborough, Reino Unido) para posterior registro da liberação de ATP e adenosina com biossensores.

Os biossensores de ATP e adenosina (Sarissa Biomedical Limited, Coventry, Inglaterra) foram conectados a um potenciostato de dois canais (Whistonbrook Technologies Ltd. Bedfordshire, Reino Unido) que permitiu o registro simultâneo de da liberação de ambas purinas. Para este fim, as fatias coronais hipotalâmicas contendo PVN foram imediatamente transferidas para a câmara de registro, submersas em aCSF e perfundidas a 6 ml/min (32°C). No início do experimento, a ponta do biossensor foi dobrada e posicionada verticalmente na superfície de cada lado do PVN, como demonstrado na figura 12 A. Em alguns experimentos, uma sonda chamada de “nula” sem bicamada enzimática foi usada para controlar interferentes eletroativos inespecíficos.

O biossensor de ATP é um microeletrodo de platina coberto com uma bicamada ultrafina contendo duas enzimas, a glicerol quinase e a glicerol-3-fosfato oxidase. A primeira enzima converte o ATP (na presença de glicerol) em ADP e glicerol-3-fosfato; esses produtos são subsequentemente convertidos em fosfato de glicerona e H_2O_2 pela última enzima e o H_2O_2 é detectado por oxidação do eletrodo.

O sensor de adenosina é composto por três enzimas: 1) adenosina desaminase que converte adenosina em inosina; 2) nucleosídeo fosforilase que converte inosina em hipoxantina e 3) xantina oxidase que converte hipoxantina em urato e H_2O_2 . Da mesma forma, o H_2O_2 é detectado por meio da oxidação do eletrodo.

Em um grupo adicional de ratos Sprague-Dawley de 60 a 80g (n=5), em condição de normohidratação, também analisamos os efeitos do estímulo hiperosmótico agudo adicionando 25 mM NaCl à solução aCSF (elevando a osmolaridade de 306 para 356 mOsmol/L) e avaliando a liberação de lactato. Este último sensor é formado por apenas uma enzima: a L-lactato oxidase que converte L-lactato em piruvato + H_2O_2 .

Os biossensores eram sempre calibrados para concentrações conhecidas de ATP, adenosina e lactato em aCSF antes de cada experimento. Para aumentar a sensibilidade, os biossensores eram alternados de -500 mV a +500 mV a uma taxa de 100 mV/s por 10 ciclos. Os sensores foram polarizados a +600 mV em relação a um eletrodo de referência de potenciostato Ag/AgCl que foi colocado no banho.

3.8 ABORDAGENS MOLECULARES PARA BLOQUEIO DA SINALIZAÇÃO ASTROGLIAL

Para o estudo das vias excitóticas de liberação glial de ATP utilizamos a ferramenta de interferência gênica com o vetor adenoviral associado (AVV-sGFAP-dnSNARE-EGFP; titulação 3×10^{10}) para direcionar a expressão da proteína SNARE dominante negativa (dnSnare) no citosol de astrócitos do PVN de ratos SS. Para tanto, os animais foram anestesiados com uma mistura de cetamina (60 mg/kg, intramuscular, i.m.) e medetomidina (250 μ g/kg, i.m.) e colocados no aparelho estereotáxico. Os astrócitos do PVN foram transfectados unilateralmente com o adenovírus para direcionar a expressão da dn-SNARE sob o controle de um promotor GFAP. A injeção do adenovírus foi realizada através de uma única microinjeção de 250 nl no lado direito do PVN, usando as seguintes coordenadas: anteroposterior -1,8 mm (em relação ao bregma); lateral \pm 0,3 mm (em relação ao seio venoso) e dorsoventral -7,5 mm (em relação à superfície craniana). Após as microinjeções, a pele foi suturada e a anestesia foi revertida com atipamezol (1 mg/kg, i.m.). Para

analgesia pós-operatória, os animais receberam buprenorfina (0,05 mg/kg, subcutânea) por 2 dias.

Após 3 dias de recuperação do procedimento cirúrgico, os animais receberam por quatro dias solução de NaCl 2% para que pudéssemos, ao final deste protocolo, preparar fatias hipotalâmicas e registrar a liberação de ATP. Neste experimento, utilizamos dois biossensores para ATP, cada um posicionado verticalmente na superfície de cada lado do PVN. A liberação de ATP foi comparada do lado transfectado com dn-Snare vs. lado não transfectado (controle).

As vias não-excitóticas foram testadas farmacologicamente durante o registro da liberação de ATP superfundindo os slices com o bloqueador de conexinas (NPPB, 50 μ M, por 10 minutos), bem como o aCSF livre de Ca^{2+} que estimula a abertura das mesmas (também por 10 minutos). Também superfundimos as fatias com o antagonista do receptor P2X₇, o AZ10606120 na concentração de 1 μ M por 10 minutos.

3.9 ANÁLISE DA LIBERAÇÃO DE GLIOTRANSMISSORES E DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ECTONUCLEOTIDASES

A liberação de ATP, de adenosina e de lactato foi investigada quantificando a resposta máxima da corrente (nA) a partir do momento em que as pontas dos biossensores foram levemente tocadas na superfície do PVN. A concentração de cada substância em μ M foi derivada da calibração inicial, quando os sensores foram estimulados com uma concentração conhecida de ATP, adenosina e lactato. As respostas aos fármacos ou soluções foram quantificadas pela variação da corrente imediatamente antes e logo após os fármacos atingirem a fatia, somados à concentração inicial. Essa análise nos permitiu eliminar o declínio natural da corrente ao longo do tempo.

Para a avaliação da atividade enzimática das ectonucleotidases mantivemos a ponta do biossensor de adenosina em contato com a superfície do PVN e superfundimos os slices com ATP nas concentrações de 10 e 50 μ M. Assim, a resposta máxima causada na concentração de adenosina em decorrência da aplicação exógena de ATP foi utilizada neste estudo como estimativa da atividade das ectonucleotidases no PVN.

3.10 FÁRMACOS E REAGENTES UTILIZADOS

Todos os fármacos utilizados nos protocolos experimentais foram diluídos em aCSF e com pH ajustado. Utilizamos os seguintes fármacos:

- 5-nitro-2-(3-fenil-propilamino) ácido benzóico (NPPB) (50 μ M): bloqueador de conexinas (Merck KGaA).
- AZ 10606120 di-hidroclorato (1 μ M): antagonista dos receptores purinérgicos P2X₇ (Tocris Bioscience).
- Adenosina 5'-trifosfato (ATP) hidrato de sal dissódico (10 e 50 μ M) (Merck KGaA).
- Adenosina (5 μ M) (Merck KGaA).
- L-lactato de sódio (50 μ M) (Merck KGaA).

3.11 PROCEDIMENTOS DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A proteína ácida fibrilar glial (GFAP) foi detectada pelo método de imunofluorescência. Para esse fim, os ratos receberam uma overdose de anestésico (pentobarbital sódico, 200 mg kg⁻¹, i.p.) e imediatamente perfundidos através do ventrículo cardíaco esquerdo com tampão fosfato (pH 7,4). Os cérebros foram removidos e pós-fixados em paraformaldeído a 4% por 24 h e posteriormente crioprotetidos em sacarose a 30% por mais 24 h. A região hipotalâmica foi cortada em seções transversais seriais (40 μ m) utilizando um criostato (Bright Instruments Ltd, UK). As fatias cerebrais foram lavadas 3 vezes por 5 min em solução salina tamponada com fosfato 0,1 M (PBS). Em seguida foram incubadas em tampão de bloqueio (caseína 0,25% em Triton 0,1% em PBS) por 1 h, para minimizar a ligação não específica do anticorpo e para a permeabilização da membrana celular. O tecido foi incubado em anticorpos primários (rabbit anti-GFAP; 1:500; DAKO), lavado 3 vezes com PBS e subsequentemente incubado no anticorpo secundário durante 2h (Alexa Fluor 488 Donkey anti-rabbit, 1:500 DAKO). Após 3 lavagens finais em PBS, o tecido foi montado em lâminas de vidro e cobertos com lamínula para posterior análise de microscopia.

3.12 ANÁLISE DAS IMAGENS COM MICROSCOPIA

As imagens digitais foram capturadas usando um microscópio de fluorescência Leica DM2000 (Leica Microsystems, Alemanha) acoplado a uma câmera Retiga 3000C (Q Imaging, Canadá). As imagens foram capturadas com a objetiva de 10X. Todas as imagens foram capturadas pelo mesmo investigador durante a mesma sessão e usando as mesmas configurações da câmera. As imagens foram analisadas pela intensidade média do valor de cinza no software WCIF ImageJ.,

3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A ingestão de líquido (ml) e ração (g); a pressão arterial (mmHg) e frequência cardíaca (bpm) e os componentes espectrais LF da PAS (mmHg²) e LF e HF do IP (ms²) foram comparados entre o grupo controle e SS por ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Holm-Sidak.

A expressão gênica relativa ($\Delta\Delta C_t$) das ectonucleotidases no PVN e a intensidade da imunofluorescência (a.u.) da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) foram comparados entre o grupo controle e SS por ANOVA de uma via.

A concentração de Na⁺ e K⁺ (mmol/L), o hematócrito (%) e a liberação de ATP e adenosina (μM) foram comparados entre o grupo controle e SS por teste t-Student.

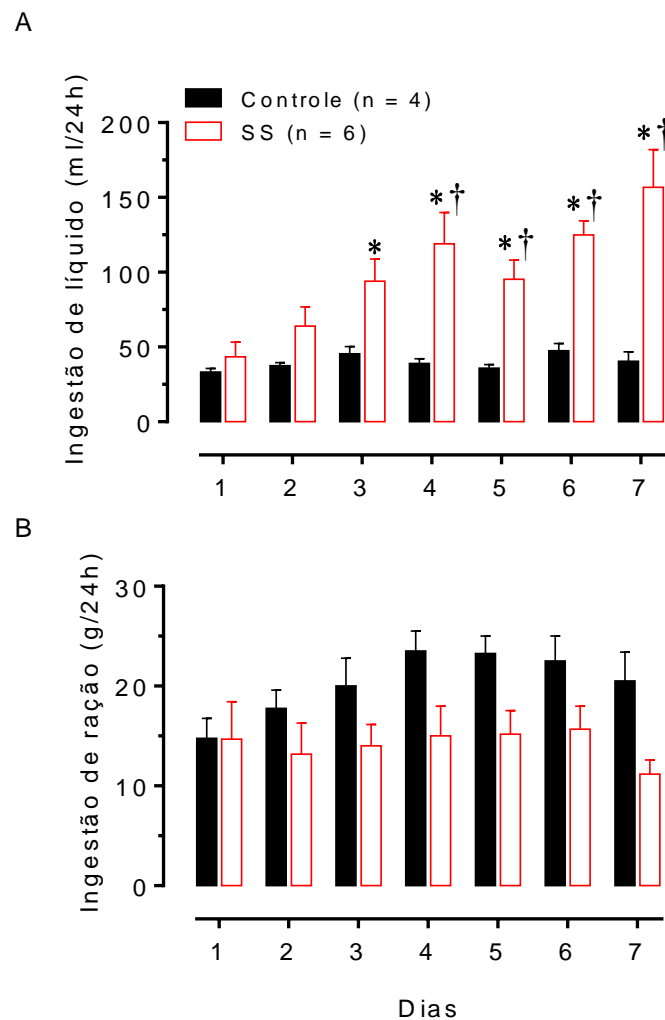
As análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism 6.01 for Windows. Os resultados foram representados como média \pm desvio padrão (SE). Diferenças entre pares de médias foram considerados estatisticamente significativas quando valores de “p” foram menores do que 5% ($p < 0.05$).

4. RESULTADOS

4.1 CONSUMO DE LÍQUIDO E RAÇÃO

Os resultados apresentados na figura 5 A demonstram que a quantidade diária de solução hipertônica de NaCl (2%) ingerida pelos ratos SS foi maior que quantidade de água consumida pelo grupo controle entre o 3º e o 7º dia. Contudo, não foi observado diferença significativa na quantidade de ração consumida entre os dois grupos (figura 5 B). A maior diferença no perfil de consumo hídrico entre os dois grupos foi observada no dia 7 (controle: $40,5 \pm 6,2$ ml/24h vs SS: $156,8 \pm 25$ ml/24h de solução de NaCl 2%; $p < 0,05$).

Figura 5. Consumo de líquido e ração.

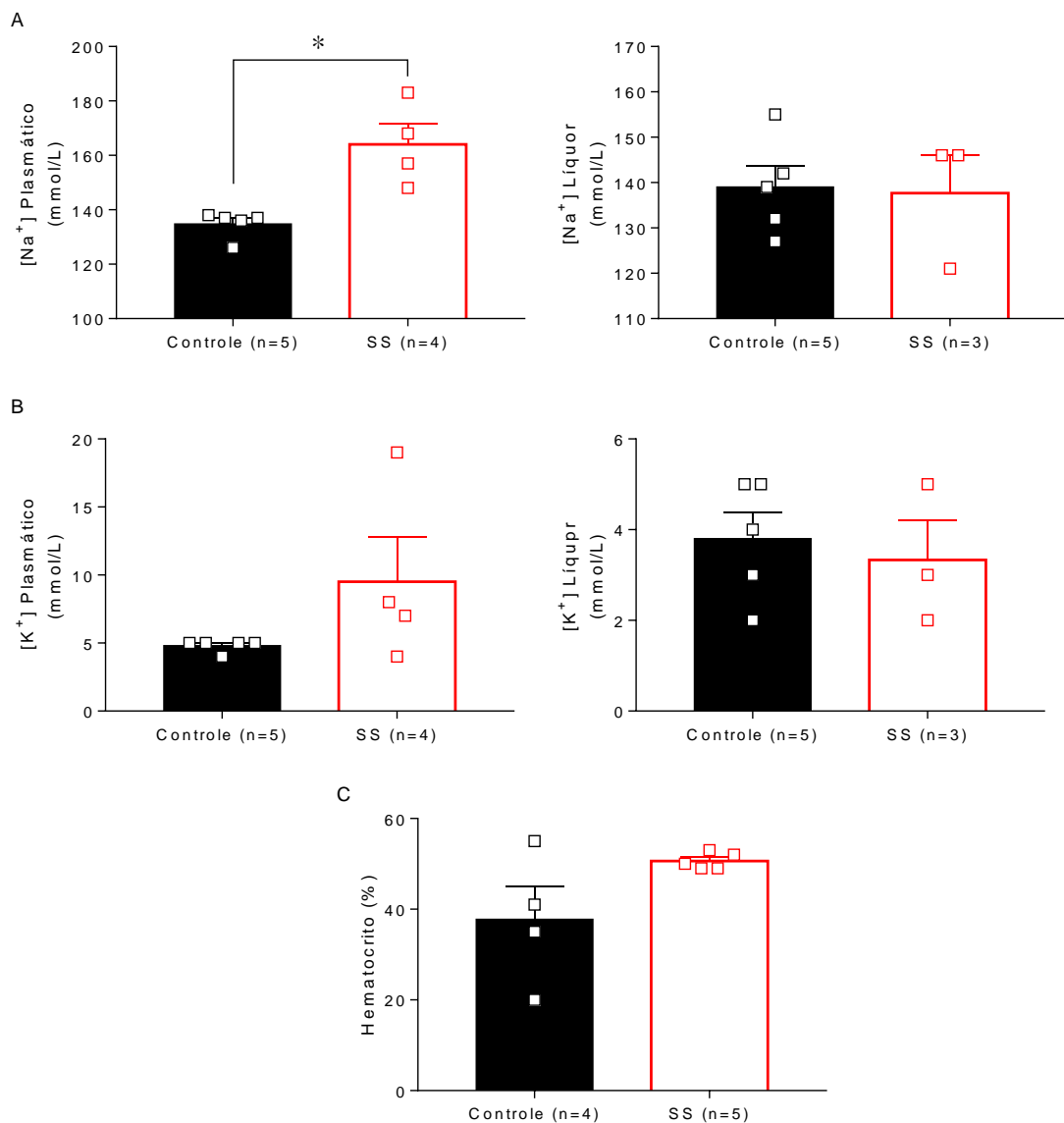


* $P < 0,05$ comparado com dia 1; † $P < 0,05$ comparado com grupo controle. ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Holm-Sidak.

4.2 CONTEÚDO DE Na^+ / K^+ e HEMATÓCRITO

Amostras do plasma e líquido cefalorraquidiano foram coletadas ao final do sétimo dia de ingestão de solução de NaCl 2% para análise do conteúdo de Na^+ e K^+ e hematócrito. Como é demonstrado na figura 6, diferença significativa foi observada apenas na concentração de Na^+ plasmático no grupo SS em relação ao grupo controle [134 ± 2 mmol/L (controle) e 164 ± 7 mmol/L (SS); $P < 0,05$]. Experimentos anteriores do nosso laboratório já demonstraram que 4 dias de SS foram suficientes para aumentar a osmolaridade do plasma em 39 ± 7 mOsmol/L (Ribeiro, Panizza et al. 2015).

Figura 6. Conteúdo de Na^+ / K^+ e hematócrito.



* $P < 0,05$ comparado com controle por teste t de Student.

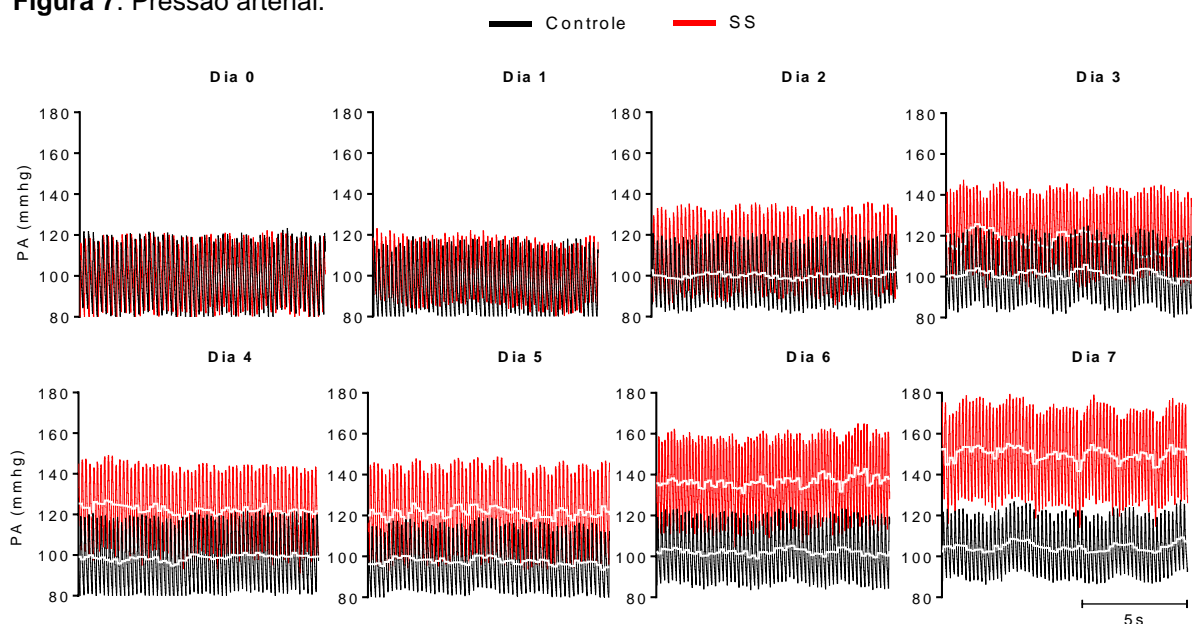
4.3 PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA DECORRENTES DA SOBRECARGA DE SAL

Um sistema de radiotelemetria foi utilizado para determinar a progressão da hipertensão em ratos SS ao longo dos sete dias. Os traçados mesclados de pressão arterial pulsátil (PAP) na figura 7 são representativos de um animal controle e outro do grupo SS. Os dados médios estão representados na figura 8.

Os níveis de pressão arterial média (PAM) dos ratos SS aumentaram progressivamente do dia 2 ao 7 (figura 8). A diferença máxima foi observada na comparação entre o dia 7 e o dia 0: [PAM: 97 ± 4 mmHg (dia 0) vs 129 ± 4 mmHg (dia 7) $p < 0,0001$]. Comparando com o controle: [PAM: 104 ± 3 mmHg (controle, dia 7) vs 129 ± 4 mmHg (SS, dia 7) $p < 0,0001$].

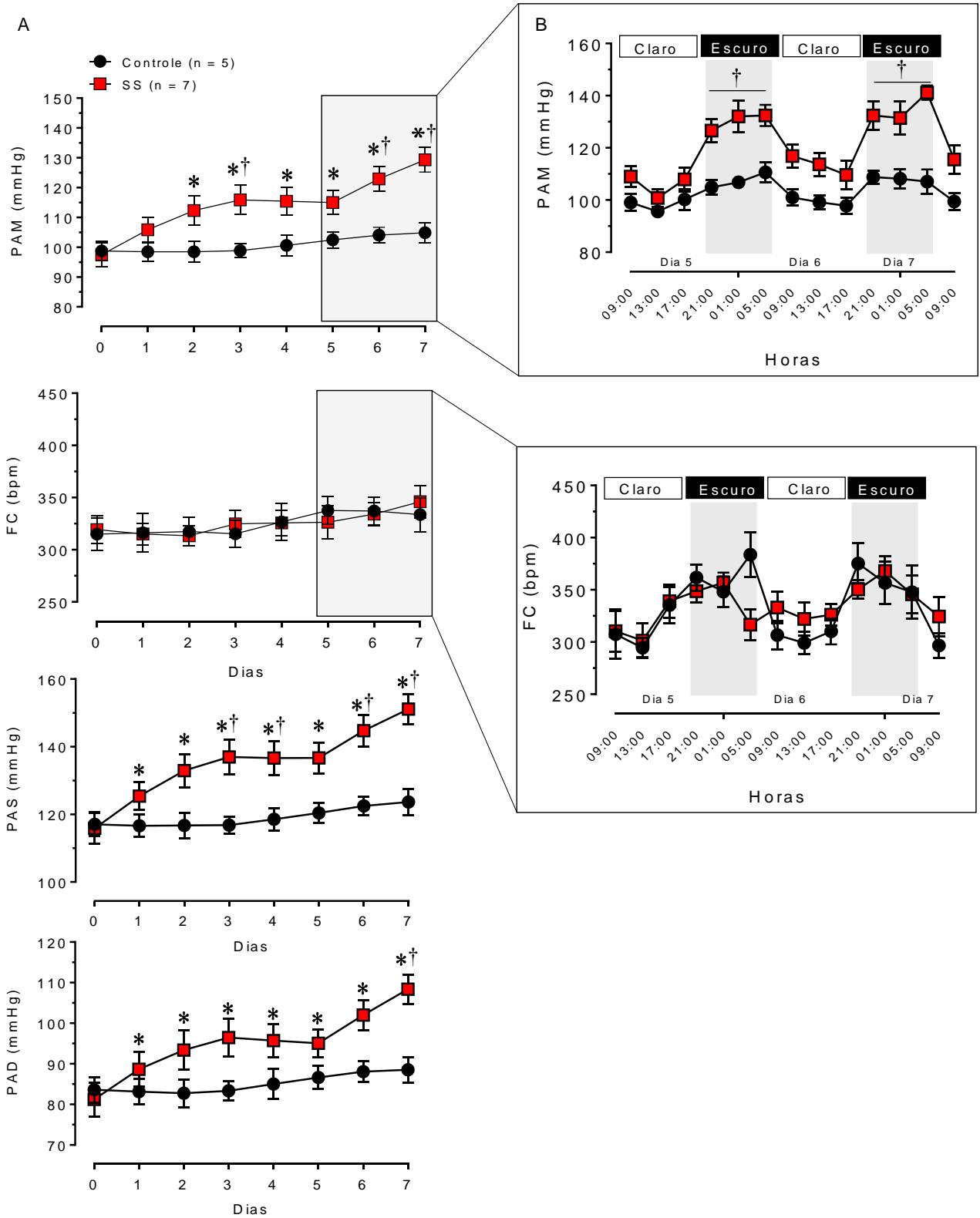
A mesma observação pode ser feita para a pressão arterial sistólica (PAS): [PAS 115 ± 4 mmHg (dia 0) vs 151 ± 4 mmHg (dia 7) $p < 0,0001$]; vs controle: [PAS: 123 ± 3 mmHg (controle, dia 7) vs 151 ± 4 mmHg (SS, dia 7) $p < 0,0001$] e para pressão arterial diastólica (PAD) [DBP 81 ± 4 mmHg (dia 0) vs 108 ± 3 mmHg (dia 7) $p < 0,0001$]; vs controle: [PAD: 88 ± 3 mmHg (controle, dia 7) vs 108 ± 3 mmHg (SS, dia 7) $p < 0,0001$]. A figura 8B mostra que a PAM do SS é maior na fase escura em comparação com a fase clara [PAM: 109 ± 5 mmHg (SS, 17:00 h - dia 6) vs 141 ± 2 mmHg (SS, 05: 00h - dia 7)]. Nenhuma mudança foi observada no controle.

Figura 7. Pressão arterial.



Traçados representativos da pressão arterial pulsátil (PA) de um animal do grupo SS (vermelho) e de um animal controle (preto). Linhas brancas representam a pressão arterial média (PAM).

Figura 8. Pressão arterial.



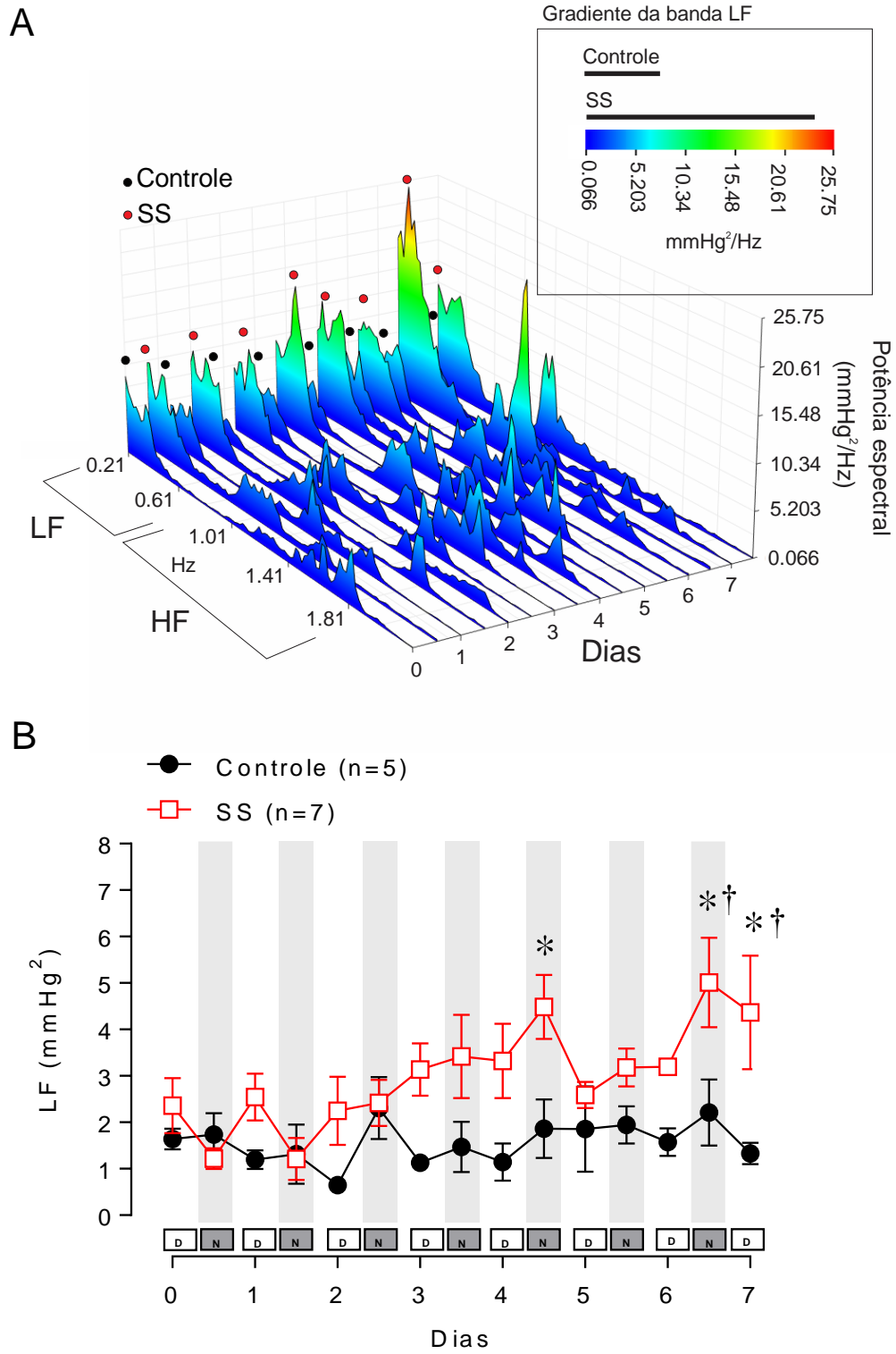
*P < 0,05 comparado com dia 0; †P < 0,05 comparado com grupo controle e ciclo claro. ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Holm-Sidak.

4.4 ANÁLISE ESPECTRAL DA VARIABILIDADE DA PAS E IP

O espectro da PAS na figura 9A demonstra que a potência da banda LF aumentou progressivamente do dia 0 ao dia 7 em ratos SS. Diferenças significativas foram observadas nos dias 4, 6 e 7 (figura 9B). A diferença máxima ocorreu entre os dias 6 e 0, no período noturno: [LF: $1,21 \pm 0,22$ mmHg² (dia 0) vs $5,01 \pm 0,96$ mmHg² (dia 6), $p < 0,0001$]. Comparando com o controle, as diferenças foram observadas apenas nos dias 6 e 7: [LF: $2,20 \pm 0,71$ mmHg² (controle, dia 6 N) vs $5,01 \pm 0,96$ mmHg² (SS, dia 6 N), $p < 0,0001$].

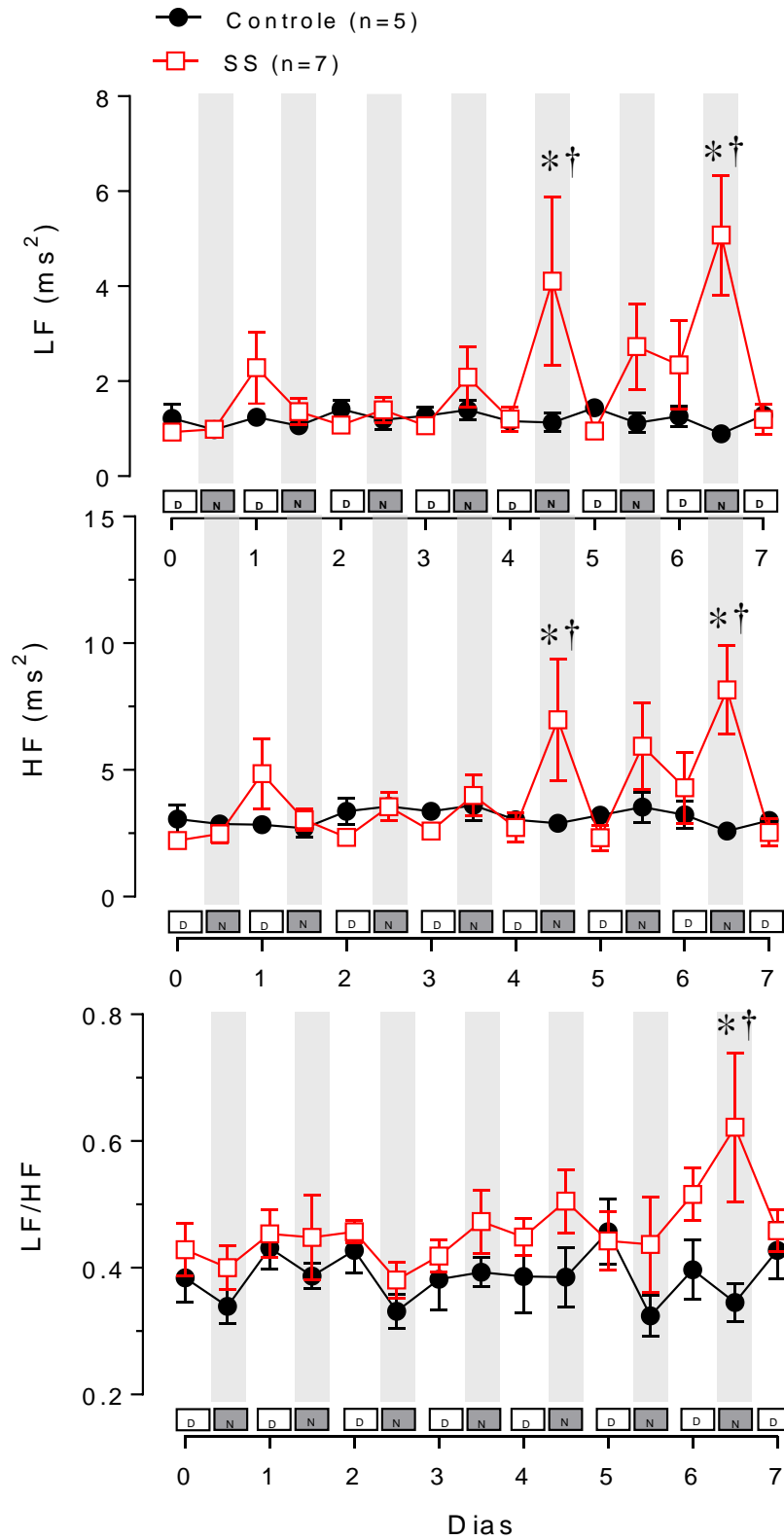
Ao contrário do que é observado na variabilidade da PAS, a variabilidade do IP é fortemente influenciada pelo ritmo circadiano em seus componentes LF e HF (figura 10). Diferenças significativas foram observadas nos dias 4 e 6: [LF: $0,89 \pm 0,10$ ms² (controle, dia 6 N) vs $5,07 \pm 1,26$ ms² (SS, dia 6 N); $p < 0,0001$] e [HF: $2,58 \pm 0,24$ ms² (controle, dia 6 N) vs $8,16 \pm 1,75$ ms² (SS, dia 6 N); $p < 0,0001$]. O balanço autonômico cardíaco, dado pela razão entre LF/HF, foi maior no grupo SS que no controle apenas no dia 6: [$0,34 \pm 0,02$ (controle) vs $0,62 \pm 0,11$ (SS); $p = 0,002$].

Figura 9. Análise espectral da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS).



Em A: espectro da PAS; em B: área sob a curva da banda LF durante o dia (D) e a noite (N). * P <0.05 comparado com dia 0 em seu respectivo ciclo; † P <0.05 vs. controle. ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Holm-Sidak.

Figura 10. Análise espectral da variabilidade do intervalo de pulso (IP)

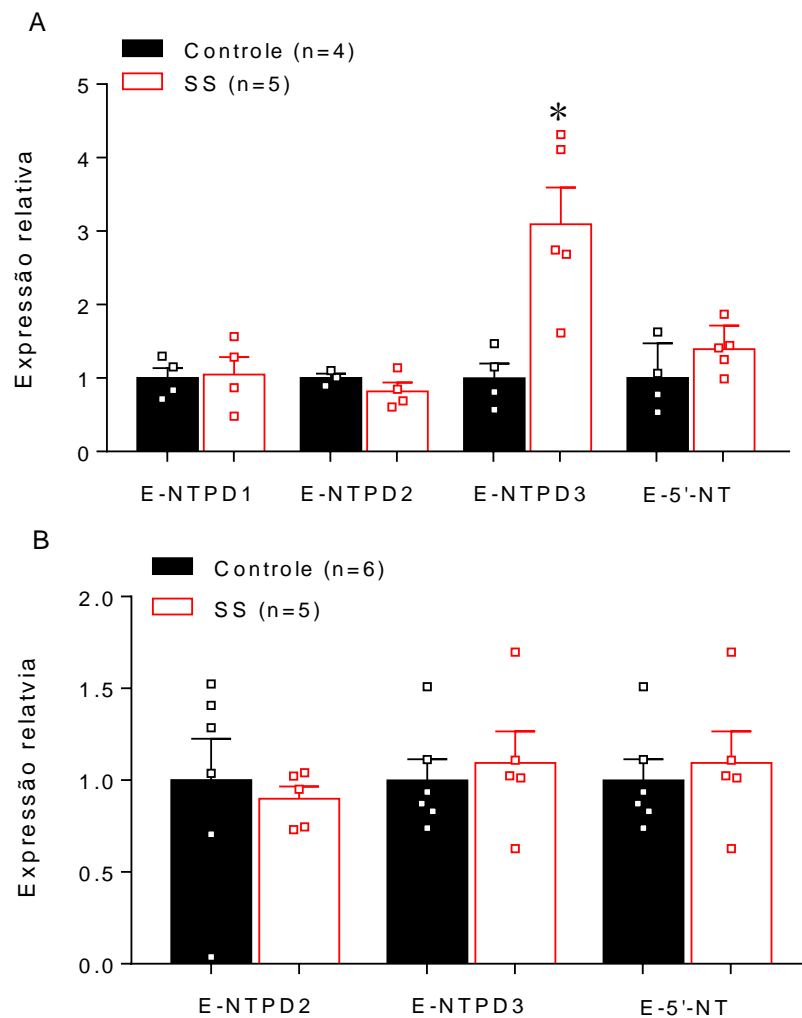


Área sob a curva da banda LF, HF e balanço autonômico (LF/HF) durante o dia (D) e a noite (N). * $P < 0.05$ comparado com dia 0 em seu respectivo ciclo; † $P < 0.05$ vs. controle. ANOVA de duas vias seguida do teste post-hoc de Holm-Sidak.

4.5 EXPRESSÃO GÊNICA DAS ECTONUCLEOTIDASES

Os resultados da figura 11 mostram que o nível de mRNA da E-NTPD3 é maior no SS do que no controle no dia 7 durante o ciclo escuro [0,99 ± 0,5 ΔΔCt (controle) vs. 3,09 ± 0,5ΔCt (SS) p = 0,0247], mas não durante o ciclo noturno [1 ± 0,1 ΔΔCt (controle) vs. 1,09 ± 0,2 ΔΔCt (SS)]. Os níveis de mRNA da E-NTPD1, E-NTPD2 e E-5'-NT não foram diferentes entre os grupos.

Figura 11. Expressão gênica das ectonucleotidases

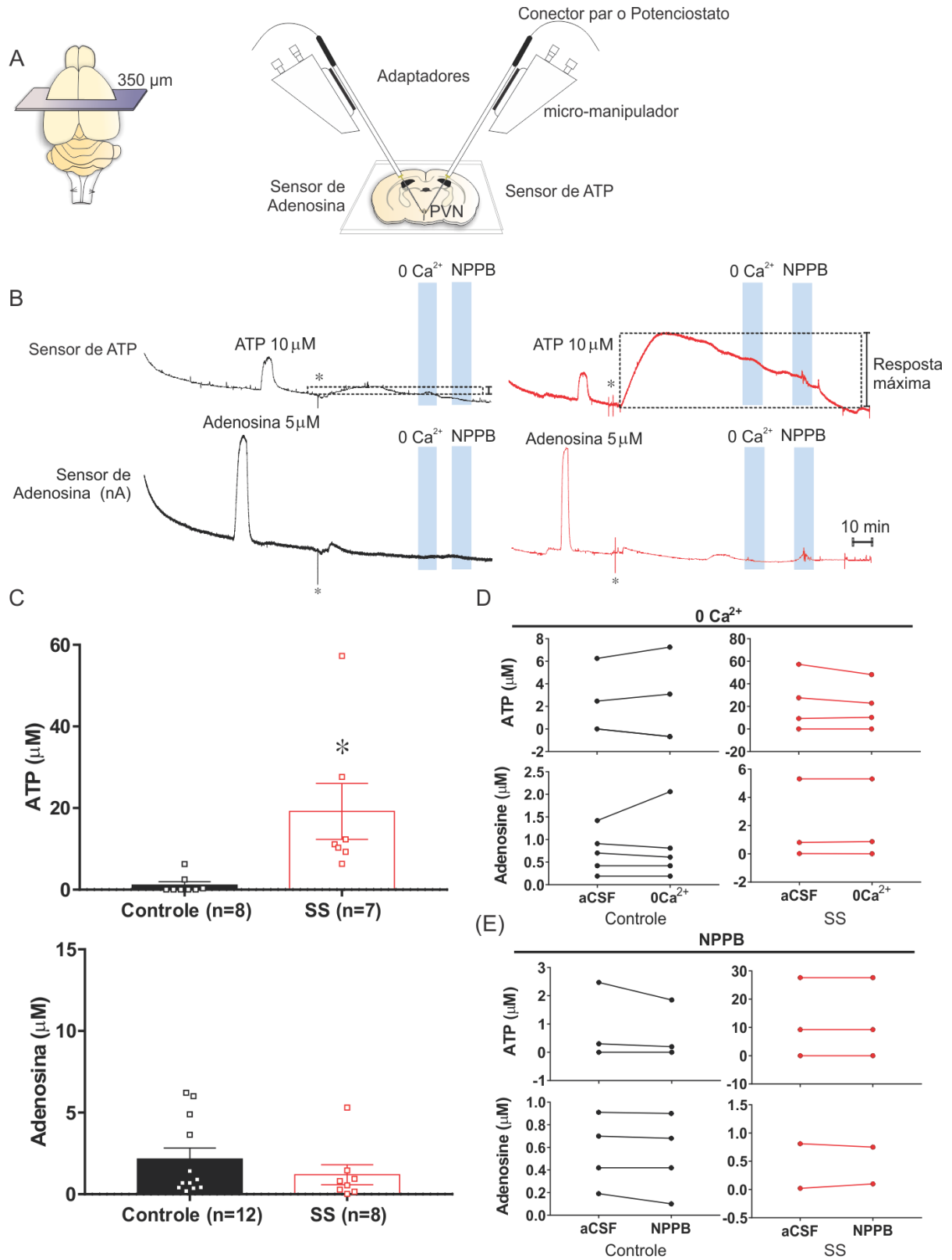


Níveis de RNAm das ectonucleotidases no ciclo claro (A) e escuro (B). * P < 0.05 vs controle. ANOVA de uma via.

4.6 LIBERAÇÃO DE ATP E ADENOSINA

Os dados da figura 12 mostram a liberação máxima de ATP e adenosina no PVN de ratos SS após 4 dias de ingestão de solução de NaCl 2%. Foi encontrada diferença no pico de liberação de ATP [$1,13 \pm 0,8 \mu\text{M}$ (controle) vs. $19,16 \pm 6,9 \mu\text{M}$ (SS) $p < 0,0001$], mas não na liberação de adenosina [$2,15 \pm 0,9 \mu\text{M}$ (controle) vs. $1,19 \pm 0,6 \mu\text{M}$ (SS)]. A liberação de ATP e adenosina também foi analisada após aumentar e diminuir a permeabilidade dos astrócitos com os seguintes moduladores de conexinas: aCSF 0 Ca^{2+} (que estimula a abertura das conexinas) e NPPB (50 μM) (que produz o bloqueio das mesmas) (figura 12 D e E), mas nenhuma diferença foi detectada.

Figura 12. Liberação de ATP e adenosina.

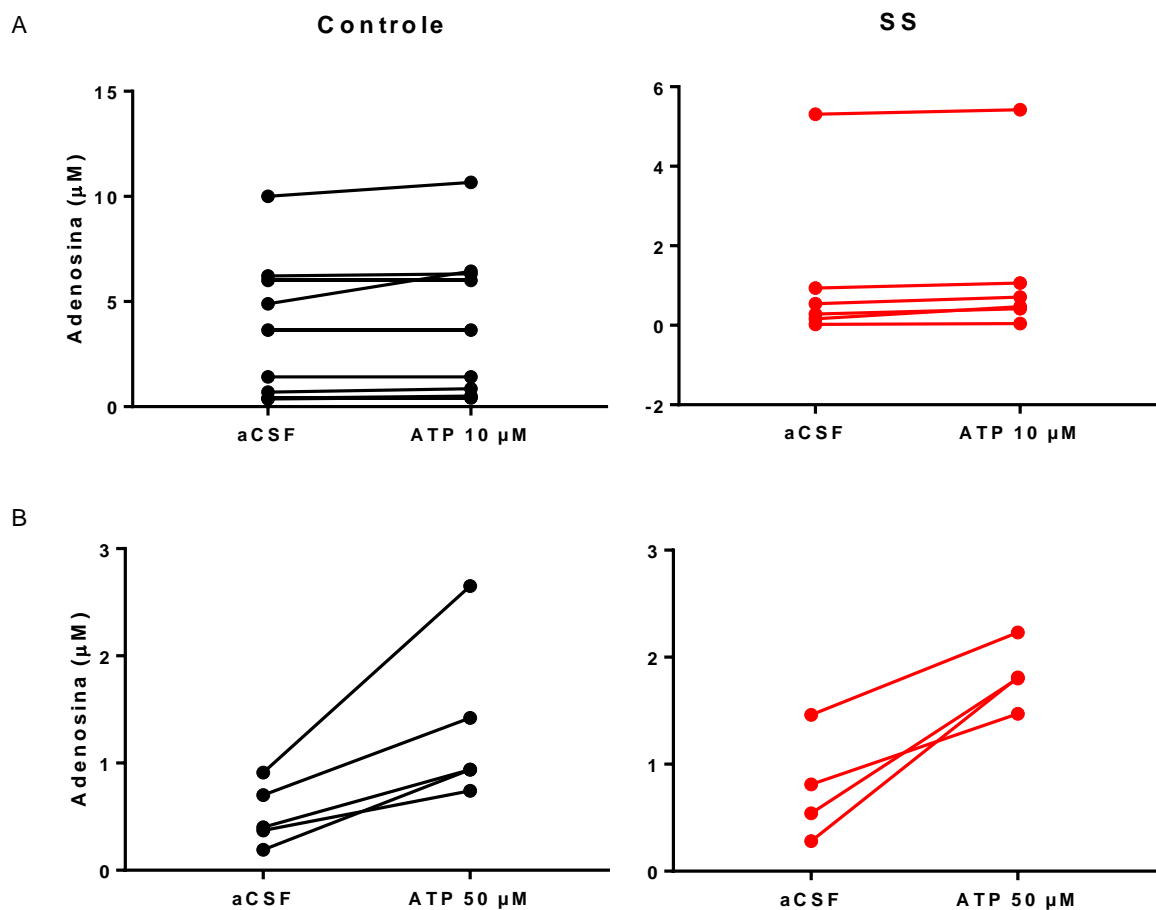


Em A: biossensores das purinas foram posicionados contralateralmente no PVN. Em B: corrente dos sensores de ATP e adenosina. Em C: resposta máxima de liberação de ATP e adenosina. Em D e E: modulação da permeabilidade das conexinas com aCSF 0 Ca^{2+} e NPPB (50 μM) não afetou a liberação das purinas. * $P < 0,05$ comparado com controle por teste t de Student.

4.7 ATIVIDADE DAS ECTONUCLEOTIDASES

A atividade das ectonucleotidases foi testada *in vitro* quantificando a produção máxima de adenosina em resposta a aplicação exógena de ATP 10 e 50 μM (figura 13). Somente o ATP 50 μM evocou uma resposta detectável, mas nenhuma diferença foi observada comparando as respostas do grupo controle [$0,51 \pm 0,1 \mu\text{M}$ (acsf, controle) vs. $1,33 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (ATP 50 μM , controle)] e SS [$0,77 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (acsf SS) vs. $1,82 \pm 0,2 \mu\text{M}$ (ATP 50 μM , SS)].

Figura 13. Atividade das ectonucleotidases.

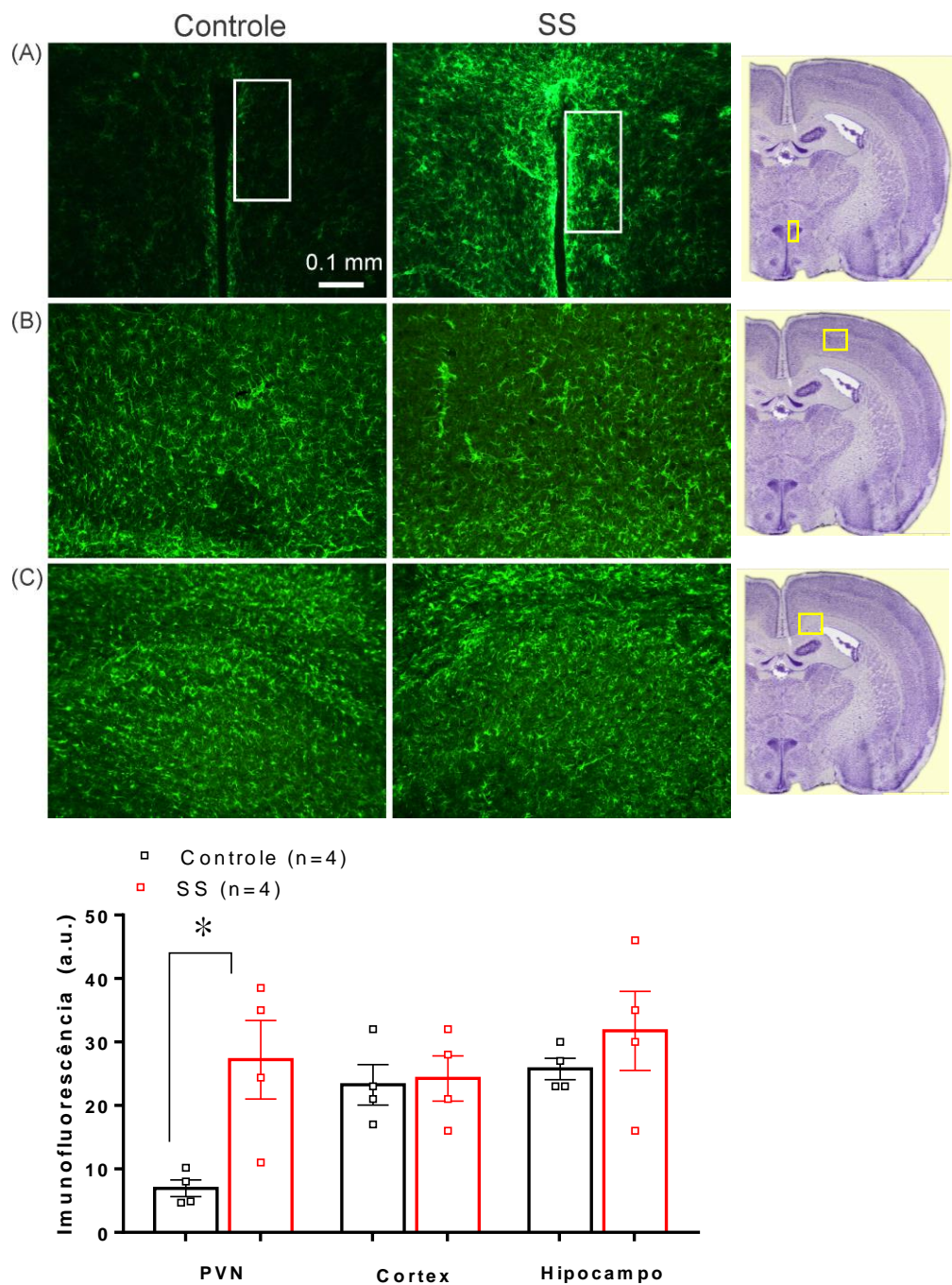


Atividade das ectonucleotidases medida indiretamente pela concentração de adenosina após a aplicação exógena de ATP 10 (A) e 50 (B) μM .

4.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA

A imunofluorescência da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) também foi quantificada em ratos SS após 4 dias de ingestão de solução de NaCl 2% (figura 14). A diferença na intensidade da imunofluorescência foi observada apenas no PVN: $[6,9 \pm 1,3 \text{ a.u. (controle)} \text{ vs } 27,2 \pm 6,2 \text{ a.u. (SS)} \text{ } p = 0,0184]$.

Figura 14. Imunofluorescência.

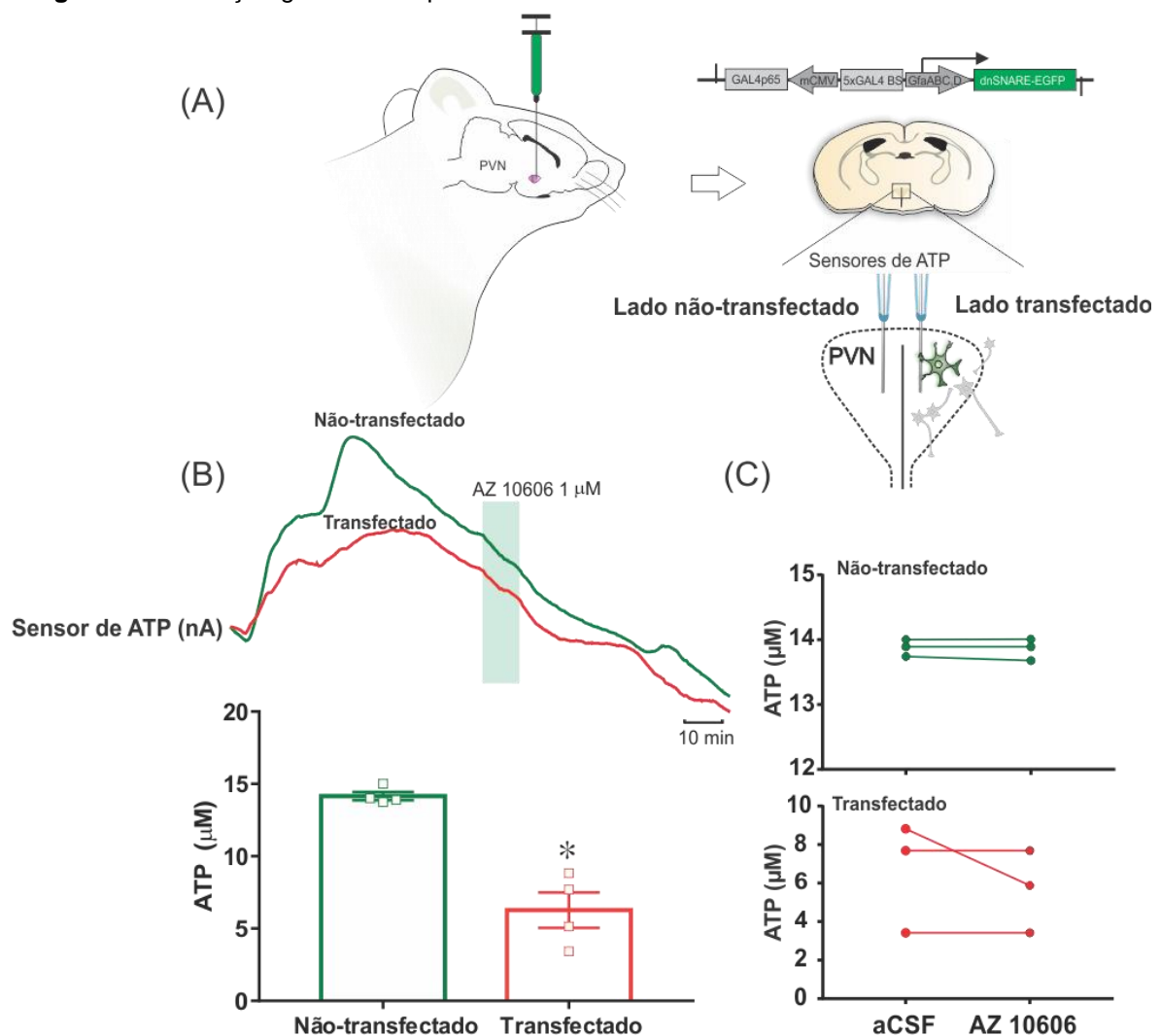


Intensidade da imunofluorescência da proteína ácida fibrilar glial (GFAP) no PVN (A), no córtex (B) e no hipocampo (C). * $P < 0.05$ vs controle. ANOVA de uma via.

4.9 LIBERAÇÃO GLIAL DE ATP POR EXOCITOSE

A injeção unilateral do PVN do adenovírus dn-SNARE promoveu a diminuição na liberação de ATP em ratos SS após 4 dias de ingestão de solução de NaCl 2% (figura 15 B). A diferença foi detectada comparando o lado transfectado com o lado não transfectado [$13,88 \pm 0,07 \mu\text{M}$ (lado não transfectado) vs. $6,64 \pm 1,64 \mu\text{M}$ (lado transfectado) $p = 0,0117$]. Não foi observada alteração com o antagonista P2X7 AZ 10606 $1 \mu\text{M}$ (figura 15 C).

Figura 15. Liberação glial de ATP por excitose.



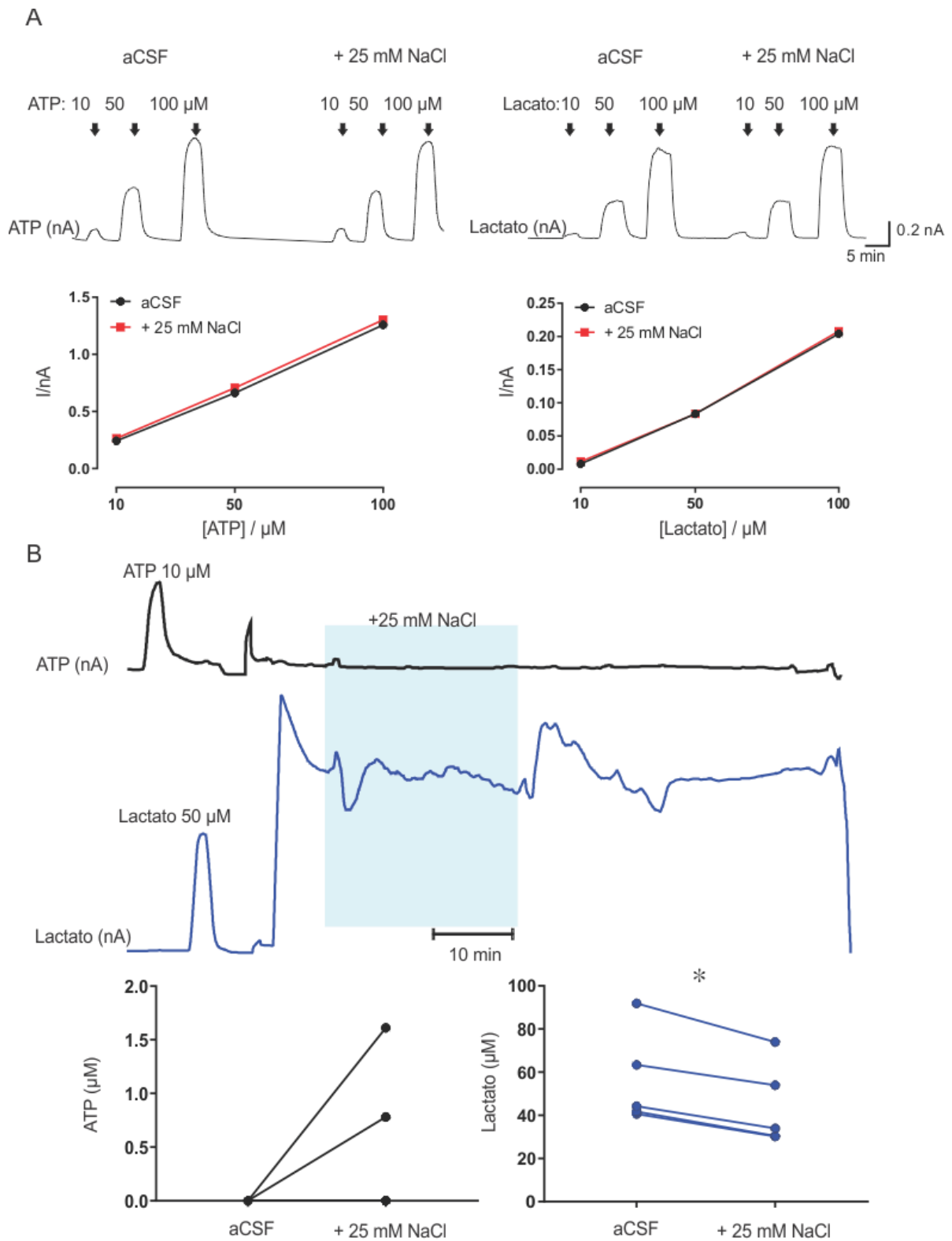
Em A: a transfecção com o vetor viral AVV-sGFAP-dnSNARE-EGFP foi realizada através de uma única microinjeção de 250 nl no lado direito do PVN. Fatias hipotalâmicas contendo o PVN foram preparadas para o registo de ATP. Foi utilizado dois biossensores de ATP, cada um posicionado contralateralmente sobre o PVN. Em B: corrente média ($n=3$) de ATP entre os lados transflectado (vermelho) e não-transflectado (verde). Em C: efeito do antagonismo de receptores P2X7 com o AZ 10606 ($1 \mu\text{M}$) sobre a liberação de ATP. * $P < 0,05$ comparado com lado não transflectado por teste t de Student.

4.10 ESTÍMULO HIPEROSMÓTICO NO PVN

Experimentos anteriores revelaram que a hipernatremia estimula os astrócitos do OVLT a liberarem lactato através de transportadores de monocarboxilato (MCTs), que em última instância despolariza os neurônios do OVLT que se projetam para o PVN (Nomura, Hiyama et al. 2019). No presente estudo, para avaliarmos se hipernatremia também estimula a liberação de lactato e ATP nos astrócitos do PVN perfundimos os slices com solução aCSF hipertônica, com a adição de 25 mM de NaCl na solução (totalizando 145mM de NaCl), por 20 minutos. Para esta análise em particular, é de fundamental importância avaliar se a adição de NaCl na solução de perfusão *per se* alteraria a corrente dos biossensores de ATP e lactato.

Os resultados obtidos na figura 16 demonstram que a adição de 25mM de NaCl na solução aCSF não alterou as curvas dose-respostas de ATP e lactato. No painel inferior (figura 16 B), o estímulo hiperosmótico não alterou de forma significativa a liberação de ATP [0 (aCSF) vs. $0,4 \pm 0,3 \mu\text{M}$ (+ 25mM de NaCl)], mas reduziu a liberação de lactato [$56,3 \pm 9,8 \mu\text{M}$ (aCSF) vs. $44,4 \pm 8,6 \mu\text{M}$ (+ 25mM de NaCl)].

Figura 16. Estímulo hiperosmótico no PVN.



5. DISCUSSÃO

Os principais achados apresentados nesta tese podem ser resumidos da seguinte forma:

(1) a sobrecarga de sal dada pelo fornecimento de solução hipertônica de NaCl 2% em substituição à água da torneira por 7 dias promoveu aumento gradual na pressão arterial e no componente LF da variabilidade da PAS;

(2) quatro dias de ingestão de solução de NaCl 2% foram suficientes para estimular a liberação de ATP no PVN por um mecanismo envolvendo excitose astrocítica, visto que os ratos SS apresentaram uma ativação astrogliar maciça no PVN.

(3) a expressão unilateral da proteína dn-SNARE foi capaz de reduzir aproximadamente 50% da liberação de ATP do PVN de animais submetidos à sobrecarga de sal.

(4) diferentemente do que observamos no modelo SS, a estimulação hiperosmótica direta do PVN falhou em reproduzir a liberação de ATP, sugerindo que a liberação astrocítica de ATP poderia ser dependente dos sinais osmossensoriais, muito provavelmente provenientes dos CVOs para o PVN.

5.1 HIPERTENSÃO E BALANÇO AUTONÔMICO

Os mecanismos que conectam a alta ingestão de sal e a HA são complexos e foram objetos de intenso debate ao longo do último século, sobretudo depois que Ambard e Beaujard, em 1904, sugeriram que pacientes hipertensos tendem a reter Na^+ após algumas semanas alimentando-se com uma dieta rica em sal (MacGregor and Wardener 1998). Essa observação seminal levou a comunidade científica a admitir a retenção de sal como uma das causas de edema e hipertensão e inspirou uma série de experimentos demonstrando que o fenótipo dos rins desempenharia um papel central na determinação da hipertensão sal-sensível (Dahl, Heine et al. 1972, Guyton, Coleman et al. 1972).

No entanto, achados conflitantes apareceram ao final da década de 1970 após a demonstração de que a alta ingestão de sal aumentava o débito cardíaco nas cepas Dahl-Sal sensíveis (DS) e resistentes (DR), mas produzia vasodilatação em ratos DR

e vasoconstrição em ratos DS (Ganguli, Tobian et al. 1979). Estudos subsequentes utilizando abordagens farmacológicas para produzir simpatectomia química com 6-hidroxidopamina (Takeshita, Mark et al. 1979); ou interromper a função adrenérgica periférica com guanetidina (Friedman, Tassinari et al. 1979) ou mesmo bloquear os gânglios da cadeia simpática com clorisondamina (Gordon, Matsuguchi et al. 1981) revelaram a importância central dos mecanismos neurais simpáticos na hipertensão induzida pelo sal.

Corroborando os estudos acima, nosso laboratório demonstrou que ratos SS após quatro dias de ingestão de solução de NaCl 2% apresentam um aumento sustentado da atividade do nervo simpático lombar e hipertensão (Ribeiro, Panizza et al. 2015). Além disso, em estudo recente do nosso laboratório demonstramos que ablação seletiva dos neurônios catecolaminérgicos C1 do RVLM preveniu o desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos SS simultaneamente à atenuação da influência simpática no sistema cardiovascular (Ribeiro, Sá et al. 2020).

No presente estudo demonstramos, por meio da telemetria, que o aumento da pressão arterial de ratos SS foi mais notório durante os ciclos noturnos, como observado também por outros autores (Nomura, Hiyama et al. 2019). Essas alterações foram acompanhadas por um aumento gradual do componente LF da variabilidade da PAS, sugerindo que a dominância simpática na hipertensão à alta ingestão de sal também é refletida no aumento da modulação do tônus vasomotor, diferente do que é observado por alguns autores na hipertensão espontânea (SHR) (Abdala, McBryde et al. 2012).

As ondas LF (comumente chamadas de ondas de Mayor) denotam o ritmo espontâneo de 4 segundos na pressão sanguínea de ratos ou ao ritmo de 10-s na pressão sanguínea dos seres humanos que ocorrem em uma frequência menor que a ventilação e geralmente são aumentados durante estados de ativação simpática (Parati, Saul et al. 1995, Julien 2006). O componente LF de um espectro da variabilidade da PAS de rato é fortemente atenuado, ou mesmo abolido, após bloqueio agudo de receptores alfa-adrenérgicos (Japundzic, Grichois et al. 1990) ou após o bloqueio ganglionar com hexametônio (Abdala, McBryde et al. 2012).

Uma explicação plausível para este resultado pode ser sustentada por estudos que mostraram que a alta ingestão de sal interfere na resposta da neurotransmissão

entre núcleos que fazem parte das vias integrativas do SNA (Simmonds, Lay et al. 2014). Neste estudo, os autores fizeram uma série de manipulações experimentais, incluindo ativação dos aferentes ciáticos, estimulação do nervo depressor aórtico (aferentes barorreceptores), ativação dos aferentes do nervo vago, expansão do volume sanguíneo e elevação volume do LCR, e observaram que, independente dos níveis basais de PA, as respostas simpáticas desencadeadas por essas manipulações eram significativamente maiores em ratos alimentados com ração hipersódica contendo 4% de NaCl (Simmonds, Lay et al. 2014). No entanto, quais mecanismos estariam desencadeando todos esses distúrbios modulatórios ainda não foram esclarecidos.

Mostramos também que a variabilidade do IP é fortemente influenciada pelo ritmo circadiano em seus componentes LF e HF, que refletem respectivamente aumento modulação simpática e parassimpática para o coração (Parati, Saul et al. 1995, Li, Rüdiger et al. 2019). Embora o conjunto de dados que dispomos até o momento não seja suficiente para interpretamos este fenômeno com precisão, é possível que a sobrecarga de sal também influencia a atividade dos neurônios do núcleo supraquiasmático (SCN) que exibem atividade de marcapasso e controlam funções neurovegetativas associadas ao ritmo circadiano.

Este raciocínio é baseado em estudos que demonstraram que durante o dia neurônios gabaérgicos do SCN inibem pré-sinápticamente os *inputs* excitatórios dos neurônios osmossensoriais do OVLT sobre os neurônios magnocelulares vasopressinérgicos do PVN e do núcleo supraóptico (SON), e durante a noite esta inibição é retirada para permitir o aumento da secreção de AVP durante a última fase do sono, ajudando a preservar a água corpórea (Colwell 2010, Trudel and Bourque 2010). Em nosso estudo, embora consideremos a análise espectral uma medida subjetiva de avaliação do balanço autonômico, é possível que os *inputs* gabaérgicos do SCN também deprimam circuitos do PVN que influenciam a atividade do nervo simpático cardíaco e nervo vago, o que justificaria o “silenciamento” das bandas LF e HF da variabilidade do intervalo de pulso nos ratos SS durante o dia.

Alternativamente, distúrbios na sinalização purinérgica no PVN também poderiam justificar parte deste resultado, uma vez que o silenciamento das bandas LF e HF da variabilidade do intervalo de pulso na fase clara ocorreu em paralelo a uma

alta expressão gênica da E-NTPD3 no PVN, que é uma das ectoenzimas com maior afinidade ao ATP ($K_m \sim 75 \mu M$) (Zimmermann, Zebisch et al. 2012). A E-NTPD3 está localizada na superfície celular e presumivelmente metaboliza o ATP (em ADP) que é secretado pela célula como neurotransmissor. Sua função se estende também a metabolização de ADP em AMP, que é o principal substrato usado pela E-5'-NT para produzir adenosina (Zimmermann, Zebisch et al. 2012), cujo o efeito no eixo hipotálamo-neurohipofisário parece ser majoritariamente inibitório por meio da sinalização de receptores A_1 (Stojilkovic 2009). No entanto, não podemos confirmar que os padrões circadianos da expressão gênica da E-NTP3 no PVN poderiam de fato ter algum papel relevante no balanço autonômico cardíaco de ratos SS.

5.2 A PRESENÇA DE ATP NO PVN NÃO DEPENDE DAS ECTONUCLEOTIDASES OU CONEXINAS

Evidências anteriores demonstraram o envolvimento da sinalização purinérgica no hipotálamo na regulação da temperatura corporal (Gourine, Melenchuk et al. 2002) e na secreção de vasopressina (Mori, Tsushima et al. 1994). Especificamente no PVN, a microinjeção de ATP estimula a atividade nervosa simpática (Ferreira-Neto, Yao et al. 2013) bem como resposta pressora e taquicárdica (Busnardo, Ferreira-Junior et al. 2013).

Sabe-se que o aumento agudo da osmolaridade plasmática com injeção periférica de manitol ou solução hipertônica de NaCl 2% ativa neurônios PVN que expressam receptores $P2X_2$ e produz ativação do nervo simpático lombar em ratos decorticados artificialmente perfundidos, um efeito que é atenuado pela microinjeção do antagonista de receptores purinérgicos P2 PPADS no PVN (Ferreira-Neto et al., 2017). Apesar desta evidência de ativação purinérgica no PVN após o aumento agudo da osmolaridade, ainda não se sabia se de fato na hipertensão induzida por sal existiria a liberação de ATP no PVN.

No presente estudo, demonstramos com o uso de biossensores em uma abordagem *in vitro* que a sobrecarga de sal por quatro dias aumenta expressivamente a liberação de ATP no PVN, mas sem afetar a concentração de adenosina. Este fenômeno parece não ser justificado por uma falha das ectonucleotidases em converter o ATP em adenosina, como nossa hipótese primária predizia, porque a

aplicação exógena de ATP 50 μ M na superfície do PVN resultou em uma resposta semelhante na concentração de adenosina em ratos SS e controles. Esses resultados nos levaram a estudar sistematicamente os mecanismos secretórios que poderiam explicar a liberação de ATP no PVN.

Mostramos que a manipulação da permeabilidade das conexinas com o NPPB e aCSF 0 Ca^{2+} não teve efeito na liberação de ATP, sugerindo que essas estruturas não são rotas importantes para o “leakage” de ATP no PVN durante a sobrecarga de sal. Relatos também conflitantes forneceram fortes evidências de que a formação de poros pelos receptores purinérgicos P2X₇ (expressos em astrócitos), mas não hemicanais, são locais de liberação de ATP (Suadicani, Brosnan et al. 2006). No entanto, em nosso estudo o antagonista de receptores P2X₇ AZ 10606 também não foi capaz de interromper a liberação de ATP.

5.3 REATIVIDADE ASTROCITÁRIA E TRANSMISSÃO PURINÉRGICA

A GFAP pertence à família de filamentos intermediários que juntamente com a vimentina, microtúbulos e filamentos de actina, constituem o citoesqueleto dos astrócitos, estrutura que é de fundamental importância para os processos de transporte e metabolização aminoácidos, de glicose e outras moléculas (Li, Lundkvist et al. 2008). Embora as implicações funcionais da expressão desta proteína tenham sido pouco compreendidas até hoje (Hol and Pekny 2015), estudos sugerem que distúrbios em sua expressão podem determinar não apenas alterações morfológicas, mas também a função dos astrócitos na liberação de (glio-) transmissores que modulam a excitabilidade neuronal (Sheikhabaei, Turovsky et al. 2018).

Nossos resultados revelaram que ratos SS apresentam alta expressão de GFAP no PVN sem nenhuma alteração no córtex ou hipocampo, regiões que foram usadas aqui como controles. Por razões ainda não compreendidas, este resultado se difere do que é observado na literatura relacionado à desidratação. Por exemplo, estudos revelaram uma redução importante na imunorreatividade de GFAP ao mesmo tempo um aumento na imunorreatividade de VP no PVN e no SON de roedores da família *Muridae* (espécie adaptada à vida no deserto) quando submetidos a privação prolongada de água (Gamrani, Elgot et al. 2011), o que é no entanto, uma reação integralmente normalizada após um período de reidratação (Elgot, El Hiba et al. 2012).

Evidências também em cultura primária de astrócitos hipotalâmicos revelaram que a exposição destas células em meio hipertônico reduz significativamente a imunorreatividade de GFAP bem como a capacidade dos astrócitos em recaptar glutamato (Souza, Vechiato et al. 2020). Por fim, ratos Sprague-Dawley submetidos a ingestão de ração contendo 4% de NaCl durante sete dias não apresentaram alterações significativas na expressão de GFAP no PVN (Moreira, Chaudhary et al. 2019).

O aumento da expressão de GFAP é uma das principais características que definem o fenômeno de reatividade astrocitária, ou como alguns autores a definem “astroglíose reativa”, que é geralmente causada por uma reação glial à citocinas como TGF- α , CNTF, IL-6, e LIF, cuja produção é aumentada durante distúrbios neurológicos, como neurotrauma, acidente vascular cerebral isquêmico e doença neurodegenerativa (Hol and Pekny 2015).

Linhas de pesquisas mais recentes vêm surgindo que a dieta rica em sal pode ocasionar uma redução na perfusão sanguínea cerebral e prejuízo cognitivo em camundongos (Faraco, Brea et al. 2018, Schmidt-Pogoda, Strecker et al. 2018). A redução do suprimento adequado de O₂ cerebral, como observada também em SHR, é de fato uma condição que leva alta expressão de GFAP no tronco encefálico bem como liberação glial de ATP e lactato nos circuitos reguladores da atividade nervosa simpática (Marina, Ang et al. 2015, Turlejski, Humoud et al. 2016). É proposto neste contexto que os astrócitos são importantes sensores fisiológicos da perfusão sanguínea cerebral (e também hipóxia e hipercapnia) e exibem um papel fundamental na regulação da circulação cerebral e sistêmica, via ativação purinérgica no bulbo (Marina, Turovsky et al. 2017, Marina, Christie et al. 2020).

No presente estudo, mostramos que a microinjeção unilateral no PVN do adenovírus dnSNARE que estimula a expressão da proteína SNARE dominante negativa seletivamente sob promotor GFAP foi capaz de reduzir aproximadamente em 50% a liberação de ATP, comparando o lado transfectado vs não transfectado do PVN. Este resultado sugere que o ATP é liberado pelos astrócitos por via excitotóxica (SNARE-dependente) similar ao que ocorre no tronco encefálico em resposta a queda na perfusão sanguínea cerebral (Marina, Christie et al. 2020) ou durante a hipóxia e hipercapnia (Sheikhabaei, Turovsky et al. 2018). No entanto, não se pode

desconsiderar a possibilidade que a interferência gênica restringiria a liberação glial excitatória de outras classes de gliotransmissores os quais poderiam estimular os neurônios do PVN a liberarem ATP. Neste caso, os astrócitos estariam envolvidos com a liberação de ATP de forma indireta.

Estimulamos hiperosmoticamente as fatias hipotalâmicas contendo o PVN com aCSF hipertônico (com adição de 25 mM de NaCl em aCSF) e não observamos liberação de ATP no PVN. Este resultado corrobora dados anteriores do nosso grupo de pesquisa que a microinjeção de solução hiperosmótica no PVN (solução de Ringer contendo 135 mM de NaCl) não resulta em ativação simpática (Antunes, Yao et al. 2006). Assim, o estímulo para liberação de ATP não parece ser resultado de um efeito direto do Na⁺ ou da hiperosmolaridade sobre o PVN, embora alguns estudos tenham correlacionado o aumento da expressão de canais epiteliais de Na⁺ não voltagem-dependentes (ENaC) no hipotálamo no desenvolvimento da hipertensão arterial em ratos Dahl-Sal sensíveis (Sharma, Haque et al. 2017, Mills, Sharma et al. 2018).

O SFO e OVLT são as duas mais importantes estações sensoriais que detectam elevações na osmolaridade do plasma ou no LCR em situações de desidratação ou alta ingestão de sal (Bourque 2008). Após a observação que a injeção de solução de NaCl hipertônica no terceiro ventrículo cerebral estimula a sede, secreção de VP e atividade nervosa simpática de forma mais intensa que a injeção de solução hipertônica equiosmolar de sacarose ou manitol levou-se a interpretação da existência de mecanismos distintos osmossensoriais bem como Na⁺-sensoriais nestas estruturas (McKinley, Denton et al. 1978, Kinsman, Browning et al. 2017)

Experimentos mais recentes revelaram que os neurônios do SFO e do OVLT que se projetam para o PVN (identificados por meio de injeção de marcador retrógrado no PVN) são ambos ativados durante a alta ingestão de sal, mas a contribuição na detecção de Na⁺ parece ser significativamente maior por parte do OVLT do que o SFO primeiro porque a porcentagem de neurônios FOS positivos no OVLT após a alta ingestão de sal é relativamente maior, e a atividade do OVLT é atenuada em animais *knockout* para um tipo de canal de Na⁺ voltagem dependente (Na_x) (Nomura, Hiyama et al. 2019).

Os canais Na_x (também conhecido com SCN7A) são majoritariamente expressos em astrócitos e desempenham um papel fundamental na detecção de [Na⁺]

no plasma e no LCR. A hipernatremia estimula a captação de glicose pelos astrócitos do OVLT que levam à liberação de ácido láctico e H^+ por transportadores de monocarboxilato (MCTs) levando a acidificação do meio. Como consequência, ocorre a abertura dos canais iônicos sensíveis a ácido do tipo 1a (ASIC1a) expressos na membrana dos neurônios do OVLT que se projetam para o PVN, levando à sua despolarização (Nomura, Hiyama et al. 2019). Já as mudanças no volume celular causados por alterações da osmolaridade *per se* é percebida diretamente pelos neurônios que expressam receptores de potencial transitório vanilóide (TRPV) do tipo 1 e 4 (Noda and Sakuta 2013, Sakuta, Nishihara et al. 2016).

No presente estudo, descobrimos que o estímulo hiperosmótico direto com a exposição das fatias hipotalâmicas contendo o PVN ao aCSF hipertônico diminui a liberação de lactato, sugerindo que os astrócitos do PVN e do OVLT exibem respostas funcionais distintas quando são expostos ao Na^+ . No entanto, a relevância fisiológica destas distintas características fenotípicas entre os astrócitos do PVN e do OVLT ainda precisam ser examinadas em experimentos futuros.

5.4 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS ASPECTOS TRANSLACIONAIS DA SOBRECARGA DE SAL

O consumo excessivo de sal é historicamente considerado um importante fator que contribui para patogênese da HA (DiNicolantonio and O'Keefe 2017). Uma análise sistemática realizada a partir de dados da excreção urinária de Na^+ de 24h da população de 187 países entre as décadas de 1990 e 2010 revelou que a ingestão de Na^+ excedeu neste período o dobro do que é recomendado pela OMS e *American Heart Association* em quase todos países analisados (Powles, Fahimi et al. 2013).

No Brasil, por exemplo, o consumo médio de Na^+ em 2010 foi de 4,11 g/dia (ou 10,2 g de NaCl), valor próximo ao registrado em 1990 de 3,89 g/dia. Estes números estão em linha com uma pesquisa mais recente realizada em uma amostra da população de Vitória (ES) onde o consumo de Na^+ em 2015 foi de 4,16 g/d (ou 10,4 g de NaCl), sendo que uma parcela significativa da população ingeriria quantias superiores a 15 g/dia de NaCl, três vezes mais do que é recomendado pela OMS (Rodrigues, Souza Júnior et al. 2015).

Do ponto de vista translacional, a reprodutibilidade da HA em ratos a partir de modelos de sobrecarga de sal com mesmo espectro de consumo de Na^+ dos seres humanos, isto é, ingestão de Na^+ em torno de 2 a 3 vezes mais do que é recomendado pelas agências de saúde, tem sido uma tarefa complexa no panorama experimental, sobretudo por demandar um período relativamente grande para indução da HA. Por exemplo, considera-se um período mínimo de 12 semanas a partir do desmame para que ratos Wistar desenvolvam HA se ingerirem ração com teor moderado de sódio (0,9% Na^+ ou 2% NaCl) que representa um pouco mais de 3 vezes o conteúdo de Na^+ de uma ração comum para ratos (0,27% de Na^+) (Gomes, Sá et al. 2017). Ratos SD quando submetidos a ingestão de dieta contendo 3,2% de Na^+ (8% NaCl), ultrapassando 10 vezes o normal, demoram seis semanas para se tornarem hipertensos (Gu, Bailey et al. 2008). Um outro estudo com esta mesma linhagem de animais demonstrou que a ingestão de dieta moderada em sódio (0,9% de Na^+ ou 2% NaCl) só produz aumentos significativos nos níveis pressóricos se acompanhado por infusão subcutânea crônica de angiotensina II (King, Osborn et al. 2007).

Neste contexto, o fornecimento de solução de NaCl 2% em substituição à água da torneira por 4 a 7 dias, como utilizado aqui e por outros autores (Choe, Han et al. 2015, Ribeiro, Panizza et al. 2015), tem sido uma alternativa eficaz para induzir HA já a partir do segundo dia de ingestão de solução de NaCl 2%, como nossos resultados atuais demonstraram. Apesar do distanciamento da quantidade de Na^+ ingerida pelos seres humanos, uma vez que a ingestão média de solução de NaCl 2% por parte dos animais SS foi próxima de 100 ml por dia (ingestão de sal aproximada de 2 g/dia), este modelo garante a indução da HA por mecanismos puramente sal-dependentes.

Limita-se, neste modelo, a chance do corpo do animal restaurar o *set point* osmorregulatório devido à ausência da bureta com água de torneira, forçando um desequilíbrio entre o teor de água e sódio. De fato, experimentos anteriores do nosso laboratório demonstraram que a ingestão da solução de NaCl 2% por quatro dias aumenta a osmolaridade plasmática em aproximadamente 40 mOsmol/L (Ribeiro, Panizza et al. 2015). Aqui, mostramos também que a concentração de Na^+ plasmática é aumentada sem modificar o hematócrito, sugerindo que não há alterações significativas de volume plasmático neste modelo experimental.

Demonstramos também que a HA nos animais SS não depende do aumento da concentração de Na^+ no líquido cefalorraquidiano (LCR) como é sugerido acontecer em animais Dahl-S, em animais espontaneamente hipertensos (SHR) sob ingestão de dieta hipersódica (8% NaCl) (Huang, Vliet et al. 2004), no protocolo DOCA-sal (Nomura, Hiyama et al. 2019) bem como em ratos Wistar pós-desmame submetidos a ingestão de ração com teor moderado de sódio (0,9% de Na^+) por doze semanas (Gomes, Sá et al. 2017). É interessante notar que neste último estudo a HA é estabelecida mesmo sem alteração da concentração plasmática de Na^+ (Gomes, Sá et al. 2017). Com base nesta evidência e em nossos resultados, é possível que os mecanismos adaptativos nos circuitos neurais que controlam a atividade nervosa simpática cardiovascular sejam mais importantes para a manutenção da HA do que um efeito tônico da hipernatremia sobre as células osmo e Na^+ -sensíveis dos CVOs.

5.5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A figura 17 é um desenho esquemático que resume as principais vias de integração neuronal hipotalâmica e tronco-encefálicas envolvidas na hipertensão neurogênica decorrente da sobrecarga de sal. Além disso, descreve em detalhes o avanço que nosso laboratório tem feito nos estudos de mecanismos de neurotransmissão envolvendo a sinalização purinérgica ao nível de hipotálamo.

O SFO, OVLT e o MnPO apresentam conexões diretas e indiretas com a subdivisão parvocelular do PVN onde residem os neurônios pré-autonômicos simpáticos que se projetam para regiões do tronco cerebral (como o núcleo do trato solitário [NTS] e bulbo ventrolateral rostral [RVLM]) e medula espinhal (Toney and Stocker 2010).

No PVN, a combinação de PPADS e o antagonista de receptor não-NMDA para glutamato CNQX atenuam a resposta simpatoexcitatória evocada pelo ATP de uma forma mais acentuada que o PPADS individualmente, aventando a hipótese de que o ATP e glutamato são co-liberados neste ambiente (Ferreira-Neto, Yao et al. 2013). Dados subsequentes suportam a hipótese de um acoplamento funcional entre receptores P2 e AMPA (provavelmente de localização extrasináptica) em neurônios PVN-RVLM, o qual estimula a atividade de neurônios pré-autonômicos simpáticos do PVN (Ferreira-Neto, Antunes et al. 2015).

Nossos resultados atuais sugerem que na hipertensão induzida por sal o ATP é liberado pelos astrócitos do PVN por via exocitótica (SNARE-dependente) e o estímulo não parece ser resultado de um efeito direto do Na⁺ ou da hiperosmolaridade sobre os astrócitos do PVN, o que é natural considerando o fato que PVN é protegido pela barreira hematoencefálica. Sugere-se então que *inputs* excitatórios dos CVOs sobre o PVN poderiam promover mudanças morfofuncionais nos astrócitos o que levaria subsequente liberação de ATP. Dados funcionais já publicados anteriormente complementam nossos achados de que a microinjeção do antagonista de receptores purinérgicos P2 no PVN atenua a resposta simpatoexcitatória mediada por aumento agudo da osmolaridade plasmática (Ferreira-Neto, Ribeiro et al. 2017).

No RVLM estão localizados os neurônios catecolaminérgicos C1 que têm sido amplamente estudados devido à sua capacidade de controlar o nível de pressão arterial, principalmente em situações de estresse homeostático, conforme sugerido por alguns autores, como “técnicos médicos de emergência do corpo” (Guyenet, Stornetta et al. 2013). Recentemente demonstramos que ablação seletiva dos neurônios catecolaminérgicos C1 do RVLM por meio injeções de anti-DβH-SAP no

RVLM atenua a hipertensão arterial em ratos SS, além de atenuar também a influência simpática no controle neural da circulação (Ribeiro, Sá et al. 2020).

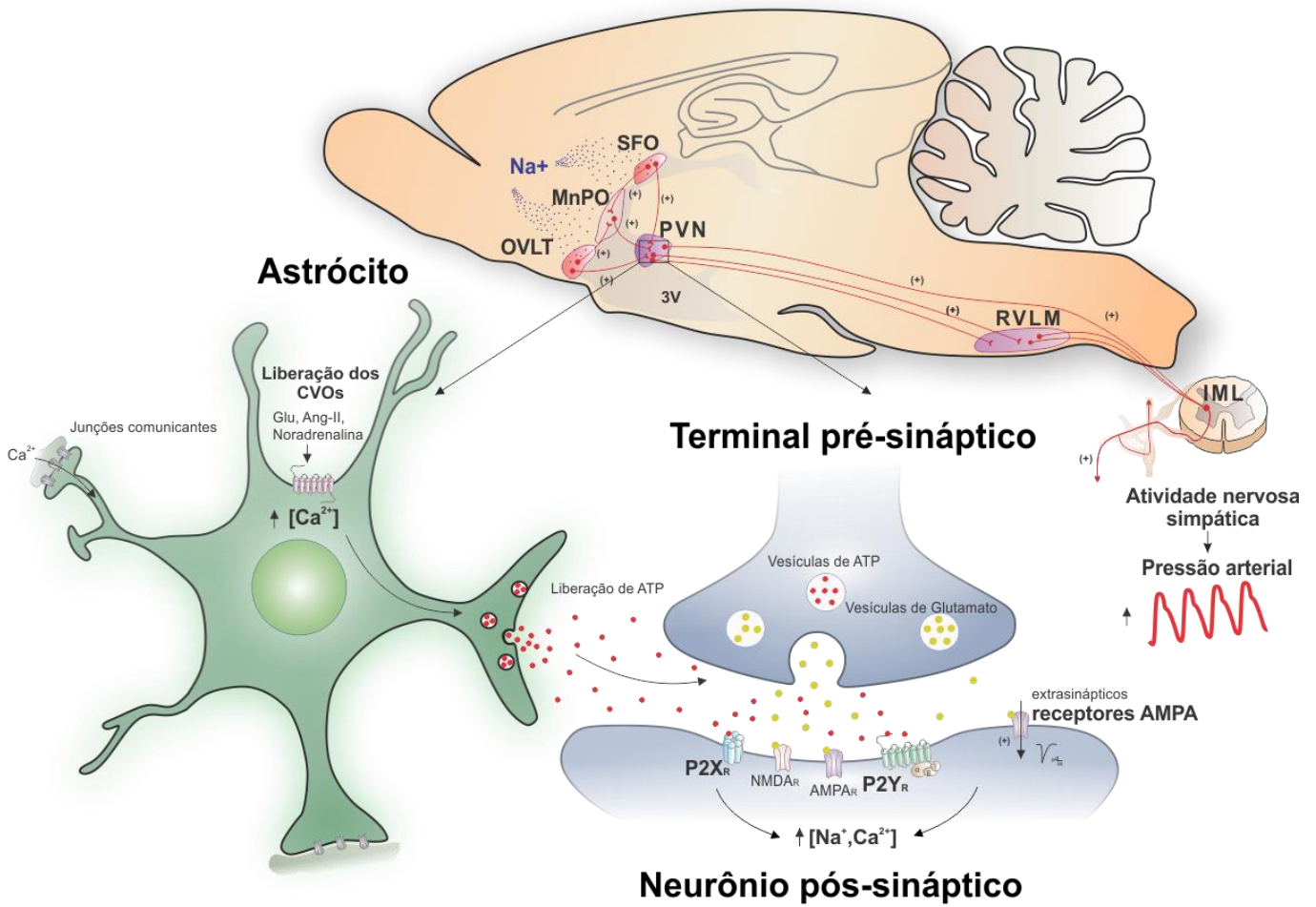


Figura 17. Papel dos astrócitos na liberação de ATP no PVN durante a sobrecarga de sal.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados mostram que a sobrecarga de sal dada pelo suprimento de solução hipertônica com NaCl 2% não afeta a atividade das ectonucleotidases, mas estimula os astrócitos do PVN a liberarem ATP por uma via excitatória.

REFERÊNCIAS

- Abdala, A. P., F. D. McBryde, N. Marina, E. B. Hendy, Z. J. Engelman, M. Fudim, P. A. Sobotka, A. V. Gourine and J. F. R. Paton (2012). "Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat." The Journal of Physiology **590**(17): 4269-4277.
- Anderson, C. M., J. P. Bergher and R. A. Swanson (2003). "ATP-induced ATP release from astrocytes." Journal of Neurochemistry **88**(1): 246-256.
- Antunes, V. R., S. T. Yao, A. E. Pickering, D. Murphy and J. F. R. Paton (2006). "A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation." The Journal of Physiology **576**(2): 569-583.
- Antunes, V. R., S. T. Yao, A. E. Pickering, D. Murphy and J. F. R. Paton (2006). "A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation." The Journal of Physiology **576**(2): 569-583.
- Azar, S., P. Ernsberger, S. Livingston and P. Azar (1981). "Paraventricular-suprachiasmatic lesions prevent salt-induced hypertension in Dahl rats " Clinical Science **61**(7): 49-51.
- Benarroch, E. E. (2005). "Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease." Clinical Autonomic Research **15**(4): 254-263.
- Bohmbach, K., M. K. Schwarz, S. Schoch and C. Henneberger (2018). The structural and functional evidence for vesicular release from astrocytes in situ, Elsevier Inc. **136**: 65-75.
- Bourque, C. W. (2008). "Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation." Nature Reviews Neuroscience **9**: 519-531.
- Brody, M. J. and A. K. Johnson (1979). "Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation, and hypertension." Frontiers in Endocrinology **6**: 249-292.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergetic nerves." Pharmacological Reviews **24**: 509-581.
- Burnstock, G. (1990). "Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves." Neurochemistry International **17**(2): 357-368.
- Burnstock, G. (2007). "Physiology and pathophysiology of purinergetic neurotransmission." Physiological reviews **87**(2): 659-797.
- Burnstock, G., G. Campbell, M. Bennett and M. E. Holman (1963). "Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli." Nature **200**(4906): 581-582.

- Burnstock, G., G. Campbell, D. Satchell and A. Smythe (1970). "Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut." British Journal of Pharmacology **40**(4): 668–688.
- Busnardo, C., N. C. Ferreira-Junior, J. C. Cruz, B. H. Machado, F. M. Correa and L. B. Resstel (2013). "Cardiovascular responses to ATP microinjected into the paraventricular nucleus are mediated by nitric oxide and NMDA glutamate receptors in awake rats." Exp Physiol **98**(10): 1411-1421.
- Chen, Q. H. and G. M. Toney (2001). "AT1-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **281**(6): 1844-1853.
- Choe, K. Y., S. Y. Han, P. Gaub, B. Shell, D. L. Voisin, B. A. Knapp, P. A. Barker, C. H. Brown, J. T. Cunningham and C. W. Bourque (2015). "High Salt Intake Increases Blood Pressure via BDNF-Mediated Downregulation of KCC2 and Impaired Baroreflex Inhibition of Vasopressin Neurons." Neuron **85**(3): 549-560.
- Coco, S., F. Calegari, E. Pravettoni, D. Pozzi, E. Taverna, P. Rosa, M. Matteoli and C. Verderio (2003). "Storage and release of ATP from astrocytes in culture." Journal of Biological Chemistry **278**(2): 1354-1362.
- Colwell, C. S. (2010). "Preventing dehydration during sleep." Nature Neuroscience **13**(4): 403-404.
- Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper and S. J. Smith (1990). "Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling." Science **247**(4941): 470-473.
- Cruz, J. C., L. G. H. Bonagamba and B. H. Machado (2010). "Modulation of arterial pressure by P2 purinoceptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of awake rats." Autonomic Neuroscience **158**(1): 79-85.
- Dahl, L. K. (1960). "Possible role of salt intake in the development of essential hypertension." Essential hypertension, Springer, Berlin, Heidelberg: 53-65.
- Dahl, L. K., M. Heine and L. Tassinari (1962). "Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion." Nature **194**(4827): 480-482.
- Dahl, L. K., M. Heine and K. Thompson (1972). "Genetic influence of renal homografts on the blood pressure of rats from different strains." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **140**(3): 852-856.

Dahl, L. K., K. D. Knudsen, M. Heine and G. Leitl (1967). "Effects of chronic excess salt ingestion: Genetic influence on the development of salt hypertension in parabiotic rats: Evidence for a humoral factor." The Journal of Experimental Medicine **126**(4): 687-699.

De Luca Jr, L. A., J. V. Menani and A. K. Johnson (2013). Neurobiology of body fluid homeostasis: transduction and integration, CRC Press.

DiNicolantonio, J. J. and P. J. H. O'Keefe (2017). "The History of the Salt Wars." The American journal of medicine **130**(9): 1011-1014.

Drury, A. N. and A. Szent-Györgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." The Journal of physiology **68**(3): 213-237.

Elgot, A., O. El Hiba and H. Gamrani (2012). "Structural and neurochemical plasticity in both supraoptic and paraventricular nuclei of hypothalamus of a desert rodent *Meriones shawi* after a severe dehydration versus opposite treatment by rehydration: GFAP and vasopressin immunohistochemical study." Neurosci Lett **515**(1): 55-60.

Faraco, G., D. Brea, L. Garcia-Bonilla, G. Wang, G. Racchumi, H. Chang, I. Buendia, M. M. Santisteban, S. G. Segarra, K. Koizumi, Y. Sugiyama, M. Murphy, H. Voss, J. Anrather and C. Iadecola (2018). "Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response." Nat Neurosci **21**(2): 240-249.

Ferreira-Neto, H. C., V. R. Antunes and J. E. Stern (2015). "ATP STIMULATES RAT HYPOTHALAMIC SYMPATHETIC NEURONS BY ENHANCING AMPA RECEPTOR-MEDIATED CURRENTS." Journal of Neurophysiology **jn-01011**.

Ferreira-Neto, H. C., I. M. R. Ribeiro, T. Moreira, S. Yao and V. R. Antunes (2017). "Purinergic P2 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus are involved in hyperosmotic-induced sympathoexcitation." Neuroscience **349**: 253-263.

Ferreira-Neto, H. C., I. M. R. Ribeiro, T. S. Moreira, S. T. Yao and V. R. Antunes (2017). "Purinergic P2 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus are involved in hyperosmotic-induced sympathoexcitation." Neuroscience **349**: 253-263.

Ferreira-Neto, H. C., S. T. Yao and V. R. Antunes (2013). "Purinergic and glutamatergic interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow." Purinergic signalling **9**(3): 337-349.

Franke, H., A. Verkhratsky, G. Burnstock and P. Illes (2012). "Pathophysiology of astroglial purinergic signalling." Purinergic Signalling **8**(3): 629–657.

Frieden, T. R. and M. G. Jaffe (2018). "Saving 100 million lives by improving global treatment of hypertension and reducing cardiovascular disease risk factors." The Journal of Clinical Hypertension **20**(2): 208-211.

Friedman, R., L. M. Tassinari, M. Heine and J. Iwai (1979). "Differential development of salt-induced and renal hypertension in Dahl hypertension-sensitive rats after neonatal sympathectomy." Clinical and Experimental Hypertension **1**(6): 779-799.

Gamrani, H., A. Elgot, O. El Hiba and M. Fèvre-Montange (2011). "Cellular plasticity in the supraoptic and paraventricular nuclei after prolonged dehydration in the desert rodent *Meriones shawi*: Vasopressin and GFAP immunohistochemical study." Brain Res **1375**: 85-92.

Ganguli, M., L. Tobian and J. Iwai (1979). "Cardiac output and peripheral resistance in strains of rats sensitive and resistant to NaCl hypertension." Hypertension **1**(1): 3-7.

Geerling, J. C., J.-W. Shin, P. C. Chimenti and A. D. Loewy (2010). "Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem." Journal of Comparative Neurology **518**

(9): 1460-1499.

Geerling, J. C., J.-W. Shin, P. C. Chimenti and A. D. Loewy (2010). "Paraventricular Hypothalamic Nucleus: Axonal Projections to the Brainstem." The Journal of Comparative Neurology **518**(9): 1460 –1499.

Gizowski, C. and C. W. Bourque (2018). "The neural basis of homeostatic and anticipatory thirst." Nature Reviews Nephrology **14**(1): 11-25.

Gomes, P. M., R. W. M. Sá, G. L. Aguiar, M. H. S. Paes, A. C. Alzamora, W. G. Lima, L. B. d. Oliveira, S. D. Stocker, V. R. Antunes and L. M. Cardoso (2017). "Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats." Scientific Reports **7**(1): 1-14.

Gordon, F. J., H. Matsuguchi and A. L. Mark (1981). "Abnormal Baroreflex Control of Heart Rate in Prehypertensive and Hypertensive Dahl Genetically Salt-Sensitive Rats." Hypertension **3**(pt 2): 135-141.

Goto, A., T. Ikeda, L. Tobian, J. Iwai and M. A. Johnson (1981). "Brain lesions in the paraventricular nuclei and catecholaminergic neurons minimize salt hypertension in Dahl salt-sensitive rats." Clinical Science **61**: 53-55.

Gourine, A. V., E. V. Melenchuk, D. M. Poputnikov, V. N. Gourine and K. M. Spyer (2002). "Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats." Br J Pharmacol **135**(8): 2047-2055.

Grygorczyk, R. and J. W. Hanrahan (1997). "CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli." American Journal of Physiology - Cell Physiology **272**(3 41-3).

Gu, J. W., A. P. Bailey, W. Tan, M. Shparago and E. Young (2008). "Long-term High Salt Diet Causes Hypertension and Decreases Renal Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Sprague-Dawley Rats." J Am Soc Hypertens **2**(4): 275-285.

Guo, L., J. Menga, C. Xuan, J. Geb, W. Sun, S. T.O'Rourke and C. Sun (2015). "High salt-diet reduces SLC14A1 gene expression in the choroid plexus of Dahl salt sensitive rats." Biochemical and Biophysical Research Communications **461**(2): 254-259.

Guthrie, P. B., J. Knappenberger, M. Segal, M. V. L. Bennett, A. C. Charles and S. B. Kater (1999). "ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves." The Journal of neuroscience **19**(2): 520-528.

Guthrie, P. B., J. Knappenberger, M. Segal, M. V. L. Bennett, A. C. Charles and S. B. Kater (1999). "ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves." Journal of Neuroscience **19**(2): 520-528.

Guyenet, P. G., R. L. Stornetta, G. Bochorishvili, S. D. DePuy, P. G. Burke and S. B. Abbott (2013). "C1 neurons: the body's EMTs." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **305**(3): R187-R204.

Guyton, A. C. (1980). "Circulatory Physiology III: Arterial Pressure and Hypertension." WB Saunders, Philadelphia.

Guyton, A. C., T. G. Coleman, A. W. Cowley, K. W. Scheel, R. D. Manning and R. A. Norman (1972). "Arterial pressure regulation: Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension." The American Journal of Medicine **52**(5): 584-594.

Hamilton, N. B. and D. Attwell (2010). "Do astrocytes really exocytose neurotransmitters?" Nature Reviews Neuroscience **11**(4): 227-238.

Hashmat, S., N. Rudemiller, H. Lund, J. M. Abais-Battad, S. V. Why and D. L. Mattson (2016). "Interleukin-6 inhibition attenuates hypertension and associated renal damage in Dahl salt-sensitive rats." American Journal of Physiology - Renal Physiology **311**(3): 555-561.

Hazama, A., T. Shimizu, Y. Ando-Akatsuka, S. Hayashi, S. Tanaka, E. Maeno and Y. Okada (1999). "Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line. Lack of correlation with volume-sensitive Cl⁻ channels." Journal of General Physiology **114**(4): 525-533.

Hol, E. M. and M. Pekny (2015). "Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system." Current opinion in cell biology **32**: 121-130.

Holton, P. (1959). "The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves." The Journal of Physiology **145**(3): 494-504.

Huang, B. S., B. N. V. Vliet and F. H. H. Leenen (2004). "Increases in CSF [Na⁺] precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high-salt diet." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **287**: 160-166.

Intersalt (1988). "Intersalt Cooperative Research Group. "Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion."." BMJ: British Medical Journal: 319-328.

Japundzic, N., M.-L. Grichois, P. Zitoun and D. Laude (1990). "Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers." Journal of the Autonomic Nervous System **30**: 91-100.

Julien, C. (2006). "The enigma of Mayer waves: Facts and models." Cardiovascular Research **70**(1): 12-21.

Kim, Y., J. Park and Y. K. Choi (2019). "The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel and Heme Oxygenase Metabolites: A Review." Antioxidants **8**(5): 121.

Kimelberg, H. K., S. K. Goderie, S. Higman, S. Pang and R. A. Waniewski (1990). "Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures." Journal of Neuroscience **10**(5): 1583-1591.

King, A. J., J. W. Osborn and G. D. Fink (2007). "Splanchnic circulation is a critical neural target in angiotensin II salt hypertension in rats." Hypertension **50**(3): 547-556.

Kinsman, B. J., K. N. Browning and S. D. Stocker (2017). "NaCl and osmolarity produce different responses in organum vasculosum of the lamina terminalis neurons, sympathetic nerve activity and blood pressure." The Journal of Physiology **595**(18): 6187–6201.

Kinsman, B. J., H. N. Nation and S. D. Stocker (2017). "Hypothalamic Signaling in Body Fluid Homeostasis and Hypertension." Current Hypertension Reports **6**(19): 1-9.

Knott, T. K., H. G. Marrero, E. E. Custer and J. R. Lemos (2008). "Endogenous ATP potentiates only vasopressin secretion from neurohypophysial terminals." Journal of Cellular Physiology **217**(1): 155–161.

Kozlov, A. S., M. C. Angulo, E. Audinat and S. Charpak (2006). "Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(26): 10058-10063.

Langer, D., K. Hammer, P. Koszalka, J. Schrader, S. Robson and H. Zimmermann (2008). "Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited." Cell and Tissue Research **334**(2): 199-217.

Li, D.-P., S.-R. Chen and H.-L. Pan (2010). "Adenosine inhibits paraventricular pre-sympathetic neurons through ATP-dependent potassium channels." Journal of Neurochemistry **113**(2): 530-542.

Li, K., H. Rüdiger and T. Ziemssen (2019). "Spectral Analysis of Heart Rate Variability: Time Window Matters." Frontiers in Neurology **10**(545): 1-12.

Li, L., A. Lundkvist, D. Andersson, U. Wilhelmsson, N. Nagai, A. C. Pardo, C. Nodin, A. Ståhlberg, K. Aprico and K. Larsson (2008). "Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **28**(3): 468-481.

Ludwig, M. and G. Leng (2006). "Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours." Nat Rev Neurosci **7**(2): 126-136.

MacGregor, G. A. and H. E. d. Wardener (1998). "Salt, Diet and Health."

Marina, N., R. Ang, A. Machhada, V. Kasymov, A. Karagiannis, P. S. Hosford, V. Mosienko, A. G. Teschemacher, P. Vihko, J. F. R. Paton, S. Kasparov and A. V. Gourine (2015). "Brainstem Hypoxia Contributes to the Development of Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat." Hypertension **65**(4): 775-783.

Marina, N., I. N. Christie, A. Korsak, M. Doronin, A. Brazhe, P. Hosford, J. Wells, S. Sheikhabaei, I. Humoud, J. F. R. Paton, M. F. Lythgoe, A. Semyanov, S. Kasparov and A. V. Gourine (2020). "Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow." Nature Communications **9**(11): 131.

Marina, N., I. N. Christie, A. Korsak, M. Doronin, A. Brazhe, P. Hosford, J. Wells, S. Sheikhabaei, I. Humoud, J. F. R. Paton, M. F. Lythgoe, A. Semyanov, S. Kasparov and A. V. Gourine (2020). "Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow." Nature Communications **9**(11): 131-131.

Marina, N., E. Turovsky, I. N. Christie, P. S. Hosford, A. Hadjihambi, A. Korsak, R. Ang, S. Mastitskaya, S. Sheikhabaei, S. M. Theparambil and A. V. Gourine (2017). "Brain metabolic sensing and metabolic signaling at the level of an astrocyte." Glia.

- McKinley, M., D. Denton and R. Weisinger (1978). "Sensors for antidiuresis and thirst—osmoreceptors or CSF sodium detectors?" Brain research **141**(1): 89-103.
- Mills, N. J., K. Sharma, K. Huang and R. Teruyama (2018). "Effect of dietary salt intake on epithelial Na⁺ channels (EN aCs) in the hypothalamus of Dahl salt-sensitive rats." Physiological reports **6**(16): e13838.
- Moreira, J. D., P. Chaudhary, A. A. Frame, F. Puleo, K. M. Nist, E. A. Abkin, T. L. Moore, J. C. George and R. D. Wainford (2019). "Inhibition of microglial activation in rats attenuates paraventricular nucleus inflammation in Gai2 protein-dependent, salt-sensitive hypertension." Experimental physiology **104**(12): 1892-1910.
- Mori, M., H. Tsushima and T. Matsuda (1994). "Antidiuretic effects of ATP induced by microinjection into the hypothalamic supraoptic nucleus in water-loaded and ethanol-anesthetized rats." Jpn J Pharmacol **66**(4): 445-450.
- Mothet, J.-P., L. Pollegioni, G. Ouanounou, M. Martineau, P. Fossier and G. Baux (2005). "Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein dependent release of the gliotransmitter D-serine." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(15): 5606-5611.
- Nedergaard, M. (1994). "Direct Signaling from Astrocytes to Neurons in Cultures of Mammalian Brain Cells." Science **263**(5154): 1768-1771.
- Noda, M. and H. Sakuta (2013). "Central regulation of body-fluid homeostasis." Trends in Neurosciences - Cell Press **36**(11): 661-673.
- Nomura, K., T. Y. Hiyama, H. Sakuta, T. Matsuda, C.-H. Lin, K. Kobayashi, K. Kobayashi, T. Kuwaki, K. Takahashi, S. Matsui and M. Noda (2019). "[Na⁺] Increases in Body Fluids Sensed by Central Nax Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H⁺-Dependent Activation of ASIC1a." Neuron **101**: 1-16.
- Parati, G., J. P. Saul, M. Di Rienzo and G. Mancia (1995). "Spectral Analysis of Blood Pressure and Heart Rate Variability in Evaluating Cardiovascular Regulation." Hypertension **25**(6): 1276-1286.
- Pascual, O., K. B. Casper, C. Kubera, J. Zhang, R. Revilla-Sanchez, J.-Y. Sul, H. Takano, S. J. Moss, K. McCarthy and P. G. Haydon (2005). "Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks." Science **310**(5745): 113-116.
- Porter, J. T. and K. D. McCarthy (1996). "Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals." The Journal of Neuroscience **16**(16): 5073-5081.
- Powles, J., S. Fahimi, R. Micha, S. Khatibzadeh, P. Shi, M. Ezzati, R. E. Engell, S. S. Lim, G. Danaei and D. Mozaffarian (2003). "Global, regional and national sodium

intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide." BJM Open **3**(12).

Powles, J., S. Fahimi, R. Micha, S. Khatibzadeh, P. Shi, M. Ezzati, R. E. Engell, S. S. Lim, G. Danaei and D. Mozaffarian (2013). "Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide." BJM Open **3**(12).

Ribeiro, N., H. d. N. Panizza, K. M. d. Santos, H. C. Ferreira-Neto and V. R. Antunes (2015). "Salt-induced sympathoexcitation involves vasopressin V1a receptor activation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **309**(11): 1369-1379.

Ribeiro, N., R. W. M. Sá and V. R. Antunes (2020). "Depletion of C1 Neurons Attenuates the Salt-Induced Hypertension in Unanesthetized Rats." Brain Research: 147107.

Rodrigues, S. L., P. R. Souza Júnior, E. B. Pimentel, M. P. Baldo, D. C. Malta, J. G. Mill and C. L. Szwarcwald (2015). "Relationship between salt consumption measured by 24-h urine collection and blood pressure in the adult population of Vitória (Brazil)." Braz J Med Biol Res **48**(8): 728-735.

Sakuta, H., E. Nishihara, T. Y. Hiyama, C. H. Lin and M. Noda (2016). "Nax signaling evoked by an increase in [Na⁺] in CSF induces water intake via EET-mediated TRPV4 activation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **311**(2): R299-306.

Schmidt-Pogoda, A., J. K. Strecker, M. Liebmann, C. Massoth, C. Beuker, U. Hansen, S. König, S. Albrecht, S. Bock, J. Breuer, C. Sommer, N. Schwab, H. Wiendl, L. Klotz and J. Minnerup (2018). "Dietary salt promotes ischemic brain injury and is associated with parenchymal migrasome formation." PLoS One **13**(12): e0209871.

Schwiebert, E. M., M. E. Egan, T. H. Hwang, S. B. Fulmer, S. S. Allen, G. R. Cutting and W. B. Guggino (1995). "CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP." Cell **81**(7): 1063-1073.

Sharma, K., M. Haque, R. Guidry, Y. Ueta and R. Teruyama (2017). "Effect of dietary salt intake on epithelial Na⁺." J Physiol **595**(17): 5857-5874.

Sheikhabaei, S., E. A. Turovsky, P. S. Hosford, A. Hadjihambi, S. M. Theparambil, B. Liu, N. Marina, A. G. Teschemacher, S. Kasparov, J. C. Smith and A. V. Gourine (2018). "Astrocytes modulate brainstem respiratory rhythm-generating circuits and determine exercise capacity." Nature Communications **9**(1): 370.

Sheikhabahaei, S., E. A. Turovsky, P. S. Hosford, A. Hadjihambi, S. M. Theparambil, B. Liu, N. Marina, A. G. Teschemacher, S. Kasparov, J. C. Smith and A. V. Gourine (2018). "Astrocytes modulate brainstem respiratory rhythm-generating circuits and determine exercise capacity." Nature Communications **9**(1): 370-370.

Simmonds, S. S., J. Lay and S. D. Stocker (2014). "Dietary salt intake exaggerates sympathetic reflexes and increases blood pressure variability in normotensive rats." Hypertension **64**(3): 583-589.

Souza, M., F. Vechiato, L. Debarba, R. Leao, M. Dias, A. Pereira, J. Cruz, L. Elias, J. Antunes-Rodrigues and S. Ruginsk (2020). "Effects of hyperosmolality on hypothalamic astrocytic area, mRNA expression and glutamate balance in vitro." Neuroscience.

Stojilkovic, S. S. (2009). "Purinergic regulation of hypothalamopituitary functions." Trends in Endocrinology and Metabolism **20**(9): 460-468.

Stout, C. E., J. L. Costantin, C. C. Naus and A. C. Charles (2002). "Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels." Journal of Biological Chemistry **277**(12): 10482-10488.

Suadicani, S. O., C. F. Brosnan and E. Scemes (2006). "P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca²⁺ signaling." Journal of Neuroscience **26**(5): 1378-1385.

Sá, R. W. M., A. S. Haibara, P. M. Gomes, G. L. Aguiar, R. S. L. Nascimento, M. L. Pedrosa, A. C. Alzamora, L. B. d. Oliveira and L. M. Cardoso (2017). "Changes in cardiovascular responses to chemoreflex activation of rats recovered from protein restriction are not related to AT1 receptors." Experimental Physiology **102**(1): 34-47.

Takeshita, A., A. L. Mark and M. J. Brody (1979). "Prevention of salt-induced hypertension in the Dahl strain by 6-hydroxydopamine." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **236**(1): 48-52.

Tang, F., S. Lane, A. Korsak, J. F. R. Paton, A. V. Gourine, S. Kasparov and A. G. Teschemacher (2014). "Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain." Nature communications **5**(1): 1-14.

Toney, G. M. and S. D. Stocker (2010). "Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: implications for cardiovascular disease." The Journal of Physiology **588**(2010): 3375-3384.

Trudel, E. and C. W. Bourque (2010). "Central clock excites vasopressin neurons by waking osmosensory afferents during late sleep." Nature Neuroscience volume **13**(4): 467-474.

Turlejski, T., I. Humoud, R. Desai, K. J. Smith and N. Marina (2016). "Immunohistochemical evidence of tissue hypoxia and astrogliosis in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats." Brain Research **1650**: 178-183.

Verney, E. B. (1947). "Croonian Lecture - The antidiuretic hormone and the factors which determine its release." Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences **135**(878): 25-106.

Weiss, M. L., D. E. Claassen, T. Hirai and M. J. Kenney (1996). "Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion." Journal of the Autonomic Nervous System **57**: 109-115.

Yang, M., F. Gao, H. Liu, W. H. Yu, F. Zhuo, G. P. Qiu, J. H. Ran and S. Q. Sun (2013). "Hyperosmotic induction of aquaporin expression in rat astrocytes through a different MAPK pathway." Journal of cellular biochemistry **114**(1): 111-119.

Yoshimoto, M., Y. Onishi, N. Mineyama, S. Ikegame, M. Shirai, J. W. Osborn and K. Miki (2019). "Renal and Lumbar Sympathetic Nerve Activity During Development of Hypertension in Dahl Salt-Sensitive Rats." Hypertension **74**(4): 888-895.

Zimmermann, H., M. Zebisch, N. Sträter, H. Zimmermann, M. Zebisch and N. Sträter (2012). "Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases Madin-Darby canine kidney MS Mass spectrometry NDP Nucleoside diphosphate NLD Nuclease-like domain NMP Nucleoside monophosphate NMN Nicotinamide mononucleotide NMR Nuclear magnetic resonance NPP Nucleotide pyrophosphatase/ phosphodiesterase NR Nicotinamide riboside NTP Nucleoside triphosphate." Purinergic Signalling **8**: 437-502.