



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**RECUPERAÇÃO CARDIOVASCULAR INDUZIDA POR INFUSÃO DE
SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA EM RATOS HEMORRÁGICOS:
PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS NO ÓRGÃO
SUBFORNICAL**

AMANDA BARBOSA COELHO DA SILVA

GOIÂNIA-GO

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES

E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a [Lei 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico

☒ Dissertação ☐ Tese

2. Nome completo do autor

Amanda Barbosa Coelho da Silva

3. Título do trabalho

RECUPERAÇÃO CARDIOVASCULAR INDUZIDA POR INFUSÃO DE SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA EM RATOS HEMORRÁGICOS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS NO ÓRGÃO SUBFORNICAL

4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)

Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

a) consulta ao(à) autor(a) e ao(à) orientador(a);

b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Rodrigues Pedrino, Professora do Magistério Superior**, em 09/03/2022, às 16:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **AMANDA BARBOSA COELHO DA SILVA, Usuário Externo**, em 09/03/2022, às 17:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2717656** e o código CRC **BB8DBAC0**.

AMANDA BARBOSA COELHO DA SILVA

**RECUPERAÇÃO CARDIOVASCULAR INDUZIDA POR INFUSÃO DE
SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA EM RATOS HEMORRÁGICOS:
PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS NO ÓRGÃO
SUBFORNICAL**

Qualificação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como pré-requisito para a defesa de produto final - Nível Mestrado.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino

Co-orientador: Prof. Dr. James Oluwagbamigme Fajemiroye

GOIÂNIA-GO

2021

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

SILVA, AMANDA BARBOSA COELHO DA
RECUPERAÇÃO CARDIOVASCULAR INDUZIDA POR INFUSÃO
DE SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA EM RATOS HEMORRÁGICOS:
PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS NO ÓRGÃO
SUBFORNICAL [manuscrito] / AMANDA BARBOSA COELHO DA
SILVA. - 2021.
LXIII, 63 f.

Orientador: Prof. GUSTAVO RODRIGUES PEDRINO; co
orientador JAMES Oluwagbamigbe Fajemiroye.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto
de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-graduação em Ciências
Biológicas, Goiânia, 2021.

Bibliografia. Anexos.

Inclui abreviaturas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de
tabelas.

1. Hiperosmolaridade. 2. Hipotensão. 3. Pressão Arterial. 4.
Neurotransmissão. 5. receptores adrenérgicos. I. PEDRINO,
GUSTAVO RODRIGUES, orient. II. Título.

CDU 612.1



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 520 da sessão de Defesa de Dissertação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, que confere a **Amanda Barbosa Coelho da Silva** o título de Mestre(a) em Ciências Biológicas, na área de concentração em Farmacologia e Fisiologia.

Aos vinte e oito dias do mês de janeiro de 2021, a partir das 09:00 h, por videoconferência, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “RECUPERAÇÃO CARDIOVASCULAR INDUZIDA POR INFUSÃO DE SOLUÇÃO SALINA HIPERTÔNICA EM RATOS HEMORRÁGICOS: PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS NO ÓRGÃO SUBFORNICAL”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador, Professor Doutor Gustavo Rodrigues Pedrino (ICB - UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Professor Doutor James Oluwagbamigbe Fajemiroye (ICB - UFG), coorientador; Professora Doutora Aline Andrade Mourão (ICB - UFG), membro titular externo; Professor Doutor Carlos Henrique Xavier Custodio (ICB - UFG), membro titular interno. Durante a arguição os membros da banca **não** sugeriram alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido(a) o(a) candidato(a) **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo Professor Doutor Gustavo Rodrigues Pedrino, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, ao(s) vinte e oito dias do mês de janeiro de 2021.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA



Documento assinado eletronicamente por **Carlos Henrique Xavier Custodio, Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2021, às 11:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Aline Andrade Mourão, Professora do Magistério Superior-Substituta**, em 28/01/2021, às 11:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **James Oluwagbamigbe Fajemiroye, Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2021, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Gustavo Rodrigues Pedrino, Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2021, às 11:31, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1831633** e o código CRC **7F0128E9**.

Referência: Processo nº 23070.003699/2021-74

SEI nº 1831633

DEDICATÓRIA

A minha mãe, **Luciene Francisca Barbosa**, por todo amor e carinho, por toda uma vida dedicada aos cuidados para com os filhos. Por ser essa mulher guerreira. Teus ensinamentos me proporcionaram chegar até aqui e me impulsionam seguir em busca dos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais Luciene e Silvio, por todos os anos de dedicação, paciência, ensinamentos, amor e carinho, sempre me apoiando e orientando em minhas escolhas, sou muito grata por tudo sem vocês nada disso seria possível.

A Universidade Federal de Goiás, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas e aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEG pelo apoio financeiro fundamental para a realização desse trabalho num momento tão crítico que vivemos para ciência no Brasil.

Ao professor Gustavo Rodrigues Pedrino, pela orientação e oportunidade de realizar este trabalho. Ao professor James que auxiliou na orientação deste trabalho.

A meu companheiro Lucas, pelo apoio, carinho, cuidado, amizade e amor. Por me guiar e nunca me deixar desistir dos meus sonhos e mais que isso me ajudar a atingir todos eles.

Aos meus amigos, Bárbara, Davi e Nayara que mesmo distantes estiveram sempre me escutando, aconselhando e dando suporte. Vocês são muito importantes para mim e sinto muita falta de não tê-los fisicamente ao meu lado.

A Ludyanne, “amiga que veio diretamente da Br”. Você sabe a loucura que foi tudo isso. Muitos altos e principalmente baixos, mas que sem você seriam mais difíceis. Obrigada por sua companhia diária, apoio, conversas e até mesmo planos para dominar o mundo. Você é mais que trabalho para mim, é um presentinho que o mestrado me proporcionou e que levarei para o futuro. Tenho um carinho e um respeito enorme por você. Muito obrigada.

A todos do CPNFC, em especial a Stéfanne por seus conselhos e socorros mesmo a quilômetros de distância, você é muito especial pra mim. Kássia e Florência por todas as conversas, caldos na pamonharia e momentos de descontração. Larissa

que conheci recentemente, mas já me é muitíssimo especial. Meu muito obrigada a todos vocês e por tornarem a rotina do laboratório mais leve e divertida.

E por último, mas não menos importante, agradeço a mim mesma por lutar contra as adversidades e conseguir forças pra hoje estar a cada dia mais próxima de todos os meus sonhos. “Amanda, seu voo é cada vez mais alto e bonito de se ver”.

A todos que de alguma forma estiveram presente nesta caminhada, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas e Siglas.....	IX
Lista de Figuras.....	XI
Lista de Tabelas.....	XIV
Resumo.....	XV
Abstract	XVIII
1. Introdução.....	01
2. Objetivos.....	08
2.1. Objetivo geral.....	08
2.2. Objetivos específicos.....	08
3. Metodologia.....	09
3.1. Modelos experimentais.....	09
3.2. Procedimentos cirúrgicos gerais.....	09
3.3. Nanoinjeção no Órgão Subfornical.....	10
3.4. Hemorragia Hipotensiva.....	11
3.5. Sobrecarga de sódio.....	11
3.6. Registro da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).....	11
3.7. Registro do fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA), condutância vascular renal (CVR) e condutância vascular aórtica (CVA) nos animais anestesiados.....	11
3.8. Retirada e processamento do tecido cerebral.....	13
3.9. Coloração por vermelho neutro.....	13
3.10. Análise estatística.....	13
3.11. Delineamento experimental.....	13
4. Resultados.....	15
4.1. Análise histológica das nanoinjeções no SFO.....	15
4.2. Valores basais dos parâmetros cardiovasculares analisados e volume de sangue retirado durante a hipovolemia.....	16
4.3. Análise do efeito da inibição farmacológica com Muscimol 4mM no SFO e do bloqueio farmacológico com Propranolol 10mmM na recuperação	

cardiovascular induzida pela infusão de SSH em ratos submetidos a HH.....	17
5. Discussão.....	24
6. Conclusões.....	30
Referências Bibliográficas.....	31
Anexo (s)	40
1. Anexo 01- Folha de aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA – 2012).....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang II - Angiotensina II

ATLS - Advanced Trauma Life Support

Bpm - Batimentos por minuto

CONT - Controle

CVA - Condutância Vascular Aórtica

CVLM - Região Caudodorsolateral do Bulbo

CVR - Condutância Vascular Renal

EPM - Erro Padrão da Média

FC - Frequência Cardíaca

FSA - Fluxo Sanguíneo Aórtico

FSR - Fluxo Sanguíneo Renal

GABA - Ácido gama-aminobutírico

GTP – Guanosina Trifosfato

HH - Hemorragia Hipotensiva

ICB - Instituto de Ciências Biológicas

mmHg - Milímetros de Mercúrio

ml - Mililitros

Min - Minuto

MnPO - Núcleo pré-óptico mediano

N - Número

NDR - Núcleo Dorsal da Rafe

NTS - Núcleo do Trato Solitário

OCVs. - Órgãos Circunventriculares

OVLT - Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal

PA. - Pressão Arterial

PAM - Pressão Arterial Média

PAP - Pressão Arterial Pulsátil

PVN - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

RVLM - Região Rostrodorsolateral do Bulbo

SAPORINA-ANTI-DBH - Saporina-Anti-Dopamina- β -Hidroxilase

SON - Núcleo Supraóptico

SFO - Órgão Subfornical

SNC - Sistema Nervoso Central

SSH - Solução Salina Hipertônica

UFG - Universidade Federal de Goiás

VL - Ventrículo Lateral

< - Menor

> - Maior

$\geq$ - Maior igual

$\leq$ - Menor igual

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Vias centrais envolvidas na ressuscitação cardiovascular e autonômica promovida pela infusão de salina hipertônica (SH) em ratos submetidos à hemorragia hipotensiva (HH). Região caudoventrolateral do bulbo (CVLM), núcleo do tracto solitário (NTS), núcleo paraventricular do hipotálamo magnocelular (mPVN), núcleo paraventricular do hipotálamo parvocelular (pPVN), núcleo pré-óptico mediano (MnPO), órgão subfornicial (SFO), órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), ocitocina (OT) e vasopressina (VP). Modificado de Naves (2018)06

FIGURA 2. Esquema representativo do delineamento experimental dos grupos salina, muscimol 4mM e propranolol 10mM.....14

FIGURA 3. A: Fotomicrografia de uma seção coronal do prosencéfalo (50µm) mostrando um sítio típico de nanoinjeção no órgão subfornicial. A seta indica a marcação do SFO com corante azul de evans 4%. Escala = 500 µm. **B:** Representação esquemática da disseminação do corante no SFO, azul escuro representa o espalhamento máximo e azul claro representa o espalhamento mínimo. VL: ventrículo lateral.....15

FIGURA 4. Traçado típico das alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA) e frequência cardíaca (FC), induzidas pela sobrecarga de sódio em animais que receberam nanoinjeção de salina. Estão apresentados os traçados representativos do período basal, dos tempos 10 e 20 min de hemorragia destacados pelo quadro preto assim como o momento da nanoinjeção em 10 min destacada pela linha pontilhada e os tempos 20 e 40 min após a infusão de SSH.....17

FIGURA 5. Traçado típico das alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA) e frequência cardíaca (FC),

induzidas pela sobrecarga de sódio em animais que receberam nanoinjeção de Muscimol 4mM. Estão apresentados os traçados representativos do período basal, dos tempos 10 e 20 min de hemorragia destacados pelo quadro preto assim como o momento da nanoinjeção em 10 min destacada pela linha pontilhada e os tempos 20 e 40 min após a infusão de SSH.....18

FIGURA 6. Traçado típico das alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA) e frequência cardíaca (FC), induzidas pela sobrecarga de sódio em animais que receberam nanoinjeção de propranolol 10mM. Estão apresentados os traçados representativos do período basal, dos tempos 10 e 20 min de hemorragia destacados pelo quadro preto assim como o momento da nanoinjeção em 10 min destacada pela linha pontilhada e os tempos 20 e 40 min após a infusão de SSH.....19

FIGURA 7. Variação da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B), em animais que receberam nanoinjeções de salina (n=5), muscimol 4mM (n=6) e propranolol 10mM (n=6) induzidos a HH e submetidos a sobrecarga de sódio. *Diferente do tempo 0; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de hemorragia e a linha tracejada representa a infusão de SSH.....20

FIGURA 8. Variação do fluxo sanguíneo renal (FSR; A), condutância vascular renal (CVR; B) em animais que receberam nanoinjeções de salina (n=5), muscimol 4mM (n=6) e propranolol 10mM (n=6) induzidos a HH e submetidos a sobrecarga de sódio. *Diferente do tempo 0; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de hemorragia e a linha tracejada representa a infusão de SSH.....21

FIGURA 9. Variação do fluxo sanguíneo aórtico (FSA; A) e condutância vascular aórtica (CVA; B) em animais que receberam nanoinjeções de salina (n=5), muscimol 4mM (n=6) e propranolol 10mM (n=6) induzidos a HH e submetidos a sobrecarga de

sódio. *Diferente do tempo 0; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de hemorragia e a linha tracejada representa a infusão de SSH.....22

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Classificação de choque hemorrágico de acordo com ATLS. Adaptado de Avram (2010).....	02
TABELA 2. Coordenadas utilizadas para nanoinjeções na região do SFO.....	10
TABELA 3. Resumo das fórmulas usadas para cálculo da %FSR, %FSA, CVR, CVA, %CVR, %CVA.....	12
TABELA 4. Média $\pm$ erro padrão da media (E.P.M) dos valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA), condutância vascular renal (CVR) e condutância vascular aórtica (CVA) dos animais que receberam nanoinjeção de salina (CONT), e muscimol 4mM (MUSC) e propranolol 10mM (PROP). n: número de animais.....	16

RESUMO

Diversos estudos relatam o uso de solução salina hipertônica (SSH) na terapêutica da hemorragia hipotensiva (HH), sendo esta capaz de promover o reestabelecimento imediato de parâmetros cardiovasculares, como a pressão arterial e o débito cardíaco. Investigações já demonstraram que, o Órgão Subfornical (SFO) recebe projeções de regiões envolvidas no controle osmótico e cardiovascular. Por integrar estas vias neuronais de regulação supõe-se que, o SFO possui participação na recuperação cardiovascular induzida pela infusão de SSH em ratos hemorrágicos. Assim, o presente estudo buscou avaliar o papel do SFO nas respostas cardiovasculares a infusão de SSH em animais submetidos a HH, assim como a participação das vias adrenérgicas no SFO. Todos os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA-UFG; protocolo nº034/12). Ratos Wistar (270–300g) foram anestesiados com halotano (2% em 98% de O₂; Tanohalo; Cristália, Itapira, SP, Brasil) e após a inserção do cateter venoso a anestesia foi mantida pela administração de uretana (1,2 g · kg⁻¹, i.v.; Sigma-Aldrich, MO, EUA). Os animais foram instrumentados para registros de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), fluxo sanguíneo renal (FSR) e aórtico (FSA). Os valores de condutância vascular renal (CVR) e aórtica (CVA) foram calculados a partir da razão entre o FSR ou o FSA e a PAM, respectivamente. A HH foi induzida através da retirada de sangue ao longo de 10 min até que a PAM atingisse valores aproximados de 60 mmHg, posteriormente esse nível de PAM foi mantido por mais 10 minutos através da retirada ou reinfusão de sangue quando necessário. 10 min após o início da retirada de sangue, foram realizadas nanoinjeções (100nL) no SFO de salina (NaCl; 0,15M; CONT; n=5), muscimol (4mM; MUSC; agonista GABAérgico; n=6) ou propranolol (10mM; PROP; bloqueador β-adrenérgico não seletivo; n=6). A sobrecarga de sódio, pela infusão de SSH (NaCl 3 M; 1,8 ml · kg⁻¹ de massa corpórea), foi realizada 20 min após a HH. A HH promoveu hipotensão em ambos os grupos (CONT: de 103,3 ± 3,5 para 62 ± 0,3 mmHg; MUSC: de 108 ± 4,4 para 61 ± 0,8 mmHg e PROP: de 98,4 ± 2,4 para 61 ± 1,3 mmHg; 20 min após HH; p<0,05). A sobrecarga de sódio promoveu restauração da PAM a valores próximos ao basal nos animais que receberam nanoinjeções de salina (92 ± 3,1 mmHg; 40 min após infusão de SSH; p<0,05). Entretanto, nos animais que receberam nanoinjeções de muscimol e

propranolol, a infusão de SSH não foi capaz de restaurar este parâmetro a níveis basais (MUSC: $53,0 \pm 3,8$ mmHg e PROP: $59 \pm 4,8$ mmHg; 40 min após infusão de SSH; $p < 0,05$; em relação ao basal). Durante a HH não foram observadas diferenças significativas na FC em todos os grupos (CONT: de $402,9 \pm 13,4$ bpm para $381,0 \pm 17,1$; MUSC: de $408,0 \pm 10,5$ bpm para $375,0 \pm 22,3$ bpm e PROP: de $410 \pm 15,6$ para $362 \pm 14,6$ bpm; 20 min após a HH). Observando-se que, 40 minutos após a infusão de SSH não há alteração significativa neste parâmetro (CONT: $346,0 \pm 19,7$ bpm; MUSC: $352,0 \pm 18,1$ bpm e PROP: $336,9 \pm 14,2$ bpm). A HH promoveu redução significativa do FSR em todos os grupos (CONT: $\Delta: -59,8 \pm 5,3\%$; MUSC: $\Delta: -53,4 \pm 14,6\%$; % e PROP: $\Delta: 48,7 \pm 6,8\%$, em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH). Observamos que a infusão de SSH não foi capaz de restaurar os valores de FSR nos grupos controle e experimentais (CONT: $\Delta: -20,8 \pm 19,1\%$; MUSC: $\Delta: -64,9 \pm 4,1\%$ e PROP: $\Delta: -51,3 \pm 11,6\%$, em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após a infusão de SSH). Em relação a CVR, não foram evidenciadas diferenças significativas nos grupos analisados tanto após a HH (CONT: $\Delta: -33,6 \pm 8\%$; MUSC: $\Delta: -23 \pm 6,8\%$ e PROP: $\Delta: -17,4 \pm 10,3\%$, 20 min após a HH) como após a infusão de SSH (CONT: $\Delta: -32,6 \pm 2,9\%$; MUSC: $\Delta: -27 \pm 8,0\%$ e PROP: $\Delta: -14,5 \pm 15,7\%$; 40 minutos após infusão de SSH). A HH reduziu significativamente o FSA nos grupos (CONT: $\Delta: -75 \pm 5,2\%$; MUSC: $\Delta: -60,1 \pm 9,0$ e PROP: $\Delta: -57 \pm 5\%$, $p < 0,05$; 20 min após a HH), sendo que esta redução foi mantida mesmo após 40 minutos da infusão de SSH (CONT: $\Delta: -55 \pm 5,8\%$; MUSC: $\Delta: -57 \pm 6,9\%$ e PROP: $\Delta: -60 \pm 3,7\%$ em relação ao valor basal, 40 min após a infusão de SSH). Não foram observadas alterações si da CVA nos grupos analisado após a HH (CONT: $\Delta: -46,4 \pm 14,1\%$; MUSC: $\Delta: -30,3 \pm 15,1\%$ e PROP: $\Delta: -30,4 \pm 7,4\%$, $p < 0,05$; 20 min após a HH) e a infusão de SSH (CONT: $\Delta: -52,2 \pm 4,5\%$; MUSC: $\Delta: -11,4 \pm 14,8\%$ e PROP: $\Delta: -33,6 \pm 4,1\%$; 40 minutos após infusão de SSH; em relação ao valor basal). Em conjunto, os resultados obtidos neste estudo fortalecem a hipótese do envolvimento de neurônios do SFO na recuperação cardiovascular induzida pela infusão de SSH durante a HH, e ainda que o bloqueio farmacológico da neurotransmissão β -adrenérgica neste núcleo impede a restauração de parâmetros cardiovasculares induzida pela infusão de SSH em animais submetidos a HH. Assim, a disfunção da neurotransmissão adrenérgica no SFO poderia prejudicar a recuperação cardiovascular induzida pela infusão de SSH após a HH.

Palavras-Chave: Hiperosmolaridade; Hipotensão; Pressão Arterial; neurotransmissão; receptores β -adrenérgicos.

ABSTRACT

Previous studies have shown that the immediate restoration of cardiovascular parameters, such as blood pressure and cardiac output, by hypertonic saline solution (HSS) is useful in the treatment of hypotensive hemorrhage (HH). The Subfornical Organ (SFO) receives projections of regions involved in osmotic and cardiovascular control, and the integration of these neuronal regulatory pathways by SFO is assumed to play a role in SSH-induced cardiovascular recovery in hemorrhagic rats. Thus, the present study assessed the role of SFO and adrenergic pathways in cardiovascular responses to HSS infusion in hemorrhagic rats. All experiments were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals at the Federal University of Goiás (CEUA-UFG; protocol nº 034/12). Wistar rats (270–300g) were anesthetized with halothane (2% in 98% O₂; Tanohalo; Cristália, Itapira, SP, Brazil) and after insertion of the venous catheter, anesthesia was maintained by urethane (1.2 g · kg⁻¹, iv; Sigma-Aldrich, MO, USA). The animals were instrumented to record mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR), renal blood flow (RBF) and aortic (ABF). The values of renal vascular conductance (RCV) and aortic (AVC) were calculated from the ratio between RBF or RBA and MAP, respectively. The HH was induced by withdrawing blood over 10 min until MAP reached approximately 60 mmHg, after which this MAP level was maintained for another 10 minutes by withdrawing or reinfusing blood when necessary. After 10 min of blood withdrawal, saline (NaCl; 0.15M; CONT; n = 5), muscimol (4mM; MUSC; GABAergic agonist; n = 6) or propranolol (10mM; PROP; non-selective β -adrenergic blocker; n = 6) were nanoinjected (100nL) in SFO. The sodium overload, through the infusion of HSS (NaCl 3 M; 1.8 ml · kg⁻¹ of body mass), was performed 20 min after the HH. The HH promoted hypotension (CONT: from 103.3 ± 3.5 to 62 ± 0.3 mmHg; MUSC: from 108 ± 4.4 to 61 ± 0.8 mmHg and PROP: from $98.4 \pm 2, 4$ to 61 ± 1.3 mmHg; 20 min after HH; p < 0.05). The sodium overload promoted MAP restoration to values close to baseline in the animals that received saline nanoinjections (92 ± 3.1 mmHg; 40 min after HSS infusion; p < 0.05). However, in animals that received nanoinjections of muscimol and propranolol, the HSS infusion did not restore this parameter to baseline levels (MUSC: 53.0 ± 3.8 mmHg and PROP: 59 ± 4.8 mmHg; 40 min after HSS infusion; p < 0.05; compared to baseline). The changes in HR values

were not significant in all the groups (CONT: from 402.9 ± 13.4 bpm to 381.0 ± 17.1 ; MUSC: from 408.0 ± 10.5 bpm to 375.0 ± 22.3 bpm and PROP: from 410 ± 15.6 to 362 ± 14.6 bpm; 20 min after HH). After 40 minutes of HSS infusion, there is no significant change in this parameter (CONT: 346.0 ± 19.7 bpm; MUSC: 352.0 ± 18.1 bpm and PROP: 336.9 ± 14.2 bpm). The HH promoted a significant reduction in RBF in all groups (CONT: Δ : $-59.8 \pm 5.3\%$; MUSC: Δ : $-53.4 \pm 14.6\%$ and PROP: Δ : $-48.7 \pm 6.8\%$, in relation to the baseline, $p < 0.05$; 20 minutes after HH). The HSS infusion did not restore the RBF values in the control and experimental groups (CONT: Δ : $-20.8 \pm 19.1\%$; MUSC: Δ : $-64.9 \pm 4.1\%$ and PROP: Δ : $-51.3 \pm 11.6\%$, in relation to baseline, $p < 0.05$; 40 minutes after HSS infusion). There were no significant differences in the value of RVC after HH (CONT: Δ : $-33.6 \pm 8\%$; MUSC: Δ : $-23 \pm 6.8\%$ and PROP: Δ : $-17.4 \pm 10.3\%$, 20 min after HH) and HSS infusion (CONT: Δ : $-32.6 \pm 2.9\%$; MUSC: Δ : $-27 \pm 8.0\%$ and PROP: Δ : $-14.5 \pm 15.7\%$; 40 minutes after HSS infusion). The HH significantly reduced the ABF in the groups (CONT: Δ : $-75 \pm 5.2\%$; MUSC: Δ : -60.1 ± 9.0 and PROP: Δ : $-57 \pm 5\%$, $p < 0.05$; 20 min after HH), and this reduction was maintained even after 40 minutes of the HSS infusion (CONT: Δ : $-55 \pm 5.8\%$; MUSC: Δ : $-57 \pm 6.9\%$ and PROP: Δ : $-60 \pm 3.7\%$ compared to baseline, 40 min after HSS infusion). No changes were observed in the AVC after HH (CONT: Δ : $-46.4 \pm 14.1\%$; MUSC: Δ : $-30.3 \pm 15.1\%$ and PROP: Δ : $-30.4 \pm 7.4\%$, $p < 0.05$; 20 min after HH) and HSS infusion (CONT: Δ : $-52.2 \pm 4.5\%$; MUSC: Δ : $-11.4 \pm 14.8\%$ and PROP: Δ : $-33.6 \pm 4.1\%$, 40 minutes after HSS infusion; in relation to baseline). These findings strengthen the hypothesis of the SFO involvement in HSS-induced cardiovascular recovery during HH, and suggest the attenuation of this recovery by pharmacological blockade of β -adrenergic neurotransmission. In this manner, the dysfunction of adrenergic neurotransmission in SFO could prevent HSS-induced cardiovascular recovery after HH.

Key words: Hyperosmolarity; Hypotension; Blood pressure; neurotransmission; β -adrenergic receptors.

1. INTRODUÇÃO

O choque hemorrágico é identificado como a principal causa de morbidade e mortalidade relacionado ao trauma e baixas militares (1), sendo que 40% dos óbitos relacionados ao trauma se devem ao descontrole desta patologia e das consequentes complicações decorrentes da mesma (2).

Caracteriza-se como choque hemorrágico a perda de grande volume intravascular, tornando o organismo incapaz de manter uma perfusão tecidual adequada (3). Nesse tipo de choque há diminuições na pré-carga, débito cardíaco e ainda aumento na resistência vascular sistêmica na tentativa de compensar a diminuição do débito cardíaco e manter a pressão de perfusão nos órgãos vitais (4).

De fato, o choque hemorrágico é uma sequência de eventos desencadeados a partir de um fator agressor que pode induzir a falência de mecanismos neuroendócrinos que visam a manutenção da homeostasia cardiovascular. A falência destes mecanismos podem resultar em diminuição da pressão de perfusão renal e consequentemente acidose tecidual, redução da viscosidade sanguínea, edema de células endoteliais e de tecidos extravasculares, hemoconcentração, agregação eritrocitária e também ativação de neutrófilos e macrófagos (5,6). Por promover hipotensão, o choque hemorrágico pode ser considerado como hemorragia hipotensiva (HH).

Em adição, a redução da oferta de oxigênio às células ocasionada pela HH gera alterações significativas no metabolismo circulatório promovendo ativação do metabolismo celular anaeróbico e alteração na microcirculação. Essas alterações são desencadeadas para promover à oferta de oxigênio para os diferentes órgãos e tecidos (7). Este mecanismo regulatório pode ser prejudicado em consequência da duração da HH bem como pelas lesões geradas em pacientes politraumatizados (8).

Na década de 70 foi desenvolvido o programa ATLS (Advanced Trauma Life Support), visando estabelecer um método padronizado para avaliação e tratamento iniciais por médicos que trabalham em unidades de emergência a pacientes vítimas de trauma. De acordo com este programa, clinicamente a HH foi classificada em quatro classes, a partir do porcentual de perda do volume sanguíneo: Classe I: déficit

de 15%; Classe II: déficit de 20 a 25%; Classe III: déficit de 30 a 35% e Classe IV: déficit de 40 a 50% (9). As características de cada classe esta descrita na tabela 1.

TABELA 1: Classificação fisiológica da hemorragia de acordo com ATLS (Advanced Trauma Life Support). Adaptado de Avram (2010) (9).

	CLASSE I	CLASSE II	CLASSE III	CLASSE IV
PERDA SANGUÍNEA	Até 750 ml	750-500ml	1500-2000ml	> 2000 ml
PERDA SANGUÍNEA	Até 15%	15-30%	30-40%	> 40%
FREQUÊNCIA CARDÍACA	< 100 bpm	> 100 bpm	> 120 bpm	≥ 140 bpm
PRESSÃO ARTERIAL	Normal	Pequena diminuição	Diminuída	Significativamente diminuída
PRESSÃO DE PULSO	Normal	Estreita	Estreita	Não aferível
DÉBITO URINÁRIO	≤ 0,5 mL/kg	≤ 0,5 mL/kg	≤ 0,5 mL/kg	Mínimo
SNC (ESTADO MENTAL)	Levemente ansioso	Pouco ansioso	Ansioso e confuso	Confuso e letárgico

A primeira linha de tratamento para a HH é o reestabelecimento do volume sanguíneo utilizando expansores de plasma ou transfusão de sangue (10). O tratamento com fluido intravenoso é utilizado desde 1831 para a terapêutica hemorrágica, quando foi realizada a sua infusão em pacientes diagnosticados com cólera (11). O emprego desta terapia proporciona melhora cardiorrespiratória o que permite a realização de procedimentos necessários para cessar a perda de volume sanguíneo, favorecendo uma melhor taxa de sucesso no reestabelecimento do quadro hemorrágico. De fato, a ressuscitação com fluidos após a HH possui como intuito inicial a restauração hemodinâmica, mas com o propósito final de corrigir a hipóxia tecidual e reduzir os danos aos órgãos (1).

Diversos tipos de soluções são habitualmente utilizados no tratamento desta patologia. De acordo com Krausz (2006) (12), em âmbito pré-hospitalar, há quatro tipos de fluidos que são indicados para a terapêutica hemorrágica: os cristaloides, as soluções coloidais, os substitutos do sangue e as soluções hipertônicas. Dentre estes destaca-se a solução hipertônica. Segundo a literatura, a administração de um pequeno volume de solução hipertônica pode proporcionar uma rápida recuperação cardiovascular a HH tanto em seres humanos quanto em outros animais (13).

A solução salina hipertônica (SSH) é rotineiramente empregada na ressuscitação em estados de HH, proporcionando efeitos cardiovasculares benéficos que compõem o aumento do débito cardíaco, pressão arterial e fluxos sanguíneos regionais levando a uma rápida restauração do fornecimento de oxigênio (14). De fato, encontram-se na literatura estudos relatando que, a infusão de um pequeno volume de SSH (NaCl 7-7,5%) é o suficiente para que ocorra o imediato reestabelecimento do débito cardíaco e perfusão tecidual a valores fisiológicos (15,16). Pesquisadores observaram que, pacientes internados em unidades de terapia intensiva com choque refratário a tratamentos tradicionais apresentaram melhora hemodinâmica após a infusão de SSH (solução de NaCl 7,5%) (17).

As respostas hemodinâmicas à infusão de SSH em animais submetidos a HH já estão bem estabelecidas na literatura (18,19). Recentemente, identificou-se a importância da ativação de aferentes neuronais periféricos para os efeitos cardiovasculares benéficos induzidos pela administração de SSH durante a HH (19). Os resultados obtidos nesse estudo demonstraram que, a inativação específica de quimiorreceptores carotídeos abole a recuperação da pressão arterial induzida pela infusão de SSH em ratos submetidos à HH. Estes resultados são compatíveis com a hipótese de que a infusão de SSH poderia ativar diversos mecanismos neuronais reflexos, restaurando a homeostase em quadros hemorrágicos graves. Em adição, outro importante estudo demonstrou que a denervação seletiva dos barorreceptores impede a restauração da pressão arterial após a infusão SSH em animais submetidos a HH (20).

Amaral e colaboradores (2014) (21), demonstraram que a inibição farmacológica do Núcleo Pré-óptico Mediano (MnPO), impede a recuperação de

parâmetros cardiovasculares induzida por infusão de SSH após a HH, evidenciando que, o sistema nervoso central (SNC) possui participação no reestabelecimento de parâmetros como a pressão arterial, sendo assim, importante na recuperação cardiovascular.

Estudos demonstraram que aumentos agudos da concentração plasmática de sódio desencadeiam diversas respostas autonômicas, cardiovasculares e hormonais. Dentre essas respostas destacam-se a redução da atividade simpática renal (22–24), secreção do peptídeo natriurético atrial, ocitocina e vasopressina (22,23,25), aumento da pressão arterial (22,26,27) e vasodilatação renal (28).

A detecção das variações de osmolaridade é realizada por osmorreceptores localizados periféricamente e centralmente (29–32). Os osmorreceptores periféricos estão localizados nos vasos renais, intestinais e principalmente hepáticos (veia porta) (33). Centralmente, alterações na osmolaridade plasmática são detectadas por regiões desprovidas de barreira hematoencefálica denominadas de órgãos circumventriculares (OCVs), nomenclatura dada devido sua localização próxima aos ventrículos cerebrais (33,34). Estudos têm demonstrado que, quando expostos à hiperosmolaridade, os osmorreceptores reduzem seu volume intracelular devido à perda osmótica de água (34,35). Ademais, evidências experimentais têm relacionado à diminuição do volume celular com o aumento da excitabilidade e deflagração de potenciais de ação por essas células (35,36). Uma vez detectadas as alterações da osmolaridade do fluido extracelular, desencadeiam-se mecanismos de ajustes comportamentais e vegetativos que visam reestabelecer o volume e/ou a composição do compartimento extracelular (32,37).

As áreas onde a barreira hematoencefálica típica está ausente são consideradas de fácil acesso para angiotensina (Ang II) no SNC. A Ang II é um potente peptídeo regulador da pressão arterial e da homeostase. Dentre suas funções destaca-se a liberação do hormônio vasopressina, vasoconstrição e liberação de aldosterona favorecendo a reabsorção de sódio e água pelo néfron pós-proximal (38). Em conjunto, estas alterações promovem o aumento da resistência vascular periférica e da reabsorção de água e sódio, contribuindo para o reestabelecimento da volemia e da pressão arterial. Assim, fatores como redução da pressão de perfusão arterial

renal, redução da concentração do íon sódio para a mácula densa, aumento da atividade do nervo renal, ativação dos receptores adrenérgicos do subtipo β_1 , catecolaminas ou prostaglandinas circulantes, ativam a secreção de renina para assim ocorrer produção de Ang II (37).

Dentre as regiões prosencefálicas envolvidas no controle hidroeletrolítico e regulação cardiovascular destaca-se o Órgão Subfornical (SFO). O SFO está situado na lâmina terminal do terceiro ventrículo e integra o grupo de OCVs. A principal característica dos OCVs é a existência de capilares fenestrados na barreira hematoencefálica permitindo a passagem de substâncias que possuem elevado peso molecular do plasma para o parênquima cerebral (39). Pesquisas anteriores sugerem que células osmolaridade/sódio e angiotensina II (Ang II) sensíveis, são as responsáveis pela ativação de neurônios dos OCVs durante um aumento da osmolaridade do líquido extracelular e ou deficiência aguda de sódio corporal (40–42).

Estudos demonstraram que o SFO medeia respostas fisiológicas como a regulação do apetite ao sal (43), sede (44), secreção de vasopressina (45) e pressão arterial (46–48). Em adição, autores relataram a presença de diversos tipos de varicosidades axônicas no SFO (25,49–51), que podem influenciar a atividade, sensibilidade ou capacidade de resposta desses neurônios à mudanças periféricas.

O SFO encontra-se diretamente conectado a outras estruturas do prosencéfalo que participam da regulação fluido corporal homeostático, como o MnPO, Núcleo Paraventricular (PVN) e Supraóptico (SON)(52,53). Estudos de rastreamento imuno-histoquímico mostraram que, o SFO possui conexões com a região bulbar, na qual neurônios do grupamento noradrenérgico A2 no Núcleo do Trato Solitário (NTS) e do grupamento A1 da Região Caudovertebral do Bulbo (CVLM) projetam-se diretamente para o SFO (25,54) (Figura 1). Ademais, autores evidenciaram, que a ativação desses grupamentos noradrenérgicos por hiperosmolaridade os caracteriza

como componentes fundamentais dos circuitos centrais que estão envolvidos na osmorregulação e na regulação cardiovascular (55,56).

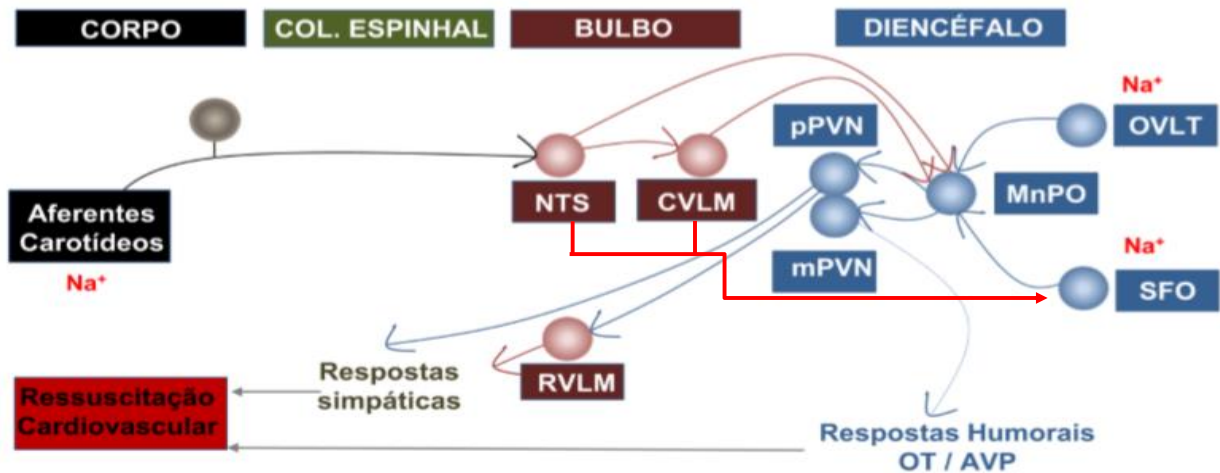


FIGURA 1. Vias centrais envolvidas na ressuscitação cardiovascular e autonômica promovida pela infusão de solução salina hipertônica (SSH) em ratos submetidos à hemorragia hipotensiva (HH). Região caudoventrolateral do bulbo (CVLM), núcleo do tracto solitário (NTS), núcleo paraventricular do hipotálamo magnocelular (mPVN), núcleo paraventricular do hipotálamo parvocelular (pPVN), núcleo pré-óptico mediano (MnPO), órgão subfornicial (SFO), órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), ocitocina (OT) e vasopressina (VP). Adaptado de de Naves e colaboradores (2018) (57).

Tanaka e colaboradores (2001) (58), demonstraram que a hemorragia promove ativação de neurônios catecolaminérgicos sensíveis ao GABA no NTS com projeções ascendentes para o SFO. Em adição, estudos anteriores demonstraram que, o SFO recebe extensas entradas sinápticas, evidenciando-se que, a aplicação do agonista do receptor GABA-A (muscimol) diminui a resistência da membrana e a taxa de disparos em todos os neurônios GABAérgicas (59,60).

Do até aqui exposto, é lícito supor que a ativação do SFO poderia modular os mecanismos envolvidos na recuperação cardiovascular induzida pela infusão de SSH em ratos submetidos à HH e ainda que receptores adrenérgicos seriam essenciais para esta recuperação. Assim, o entendimento da participação do SFO pode representar um modelo promissor para a compreensão dos mecanismos envolvidos

na ressuscitação induzida pelo emprego de SSH e na formulação de novas abordagens terapêuticas.

2. OBJETIVO

2.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar a participação do SFO na recuperação cardiovascular induzida pela infusão de SSH em animais submetidos a HH assim como a participação das vias adrenérgicas no SFO.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Compreender o efeito da inibição farmacológica do SFO na recuperação cardiovascular induzida pela infusão de SSH em ratos submetidos a HH sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), fluxo sanguíneo renal (FSR), condutância vascular renal (CVR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA) e condutância vascular aórtica (CVA);
- Determinar a participação da neurotransmissão β -adrenérgica no SFO na recuperação cardiovascular induzida pela infusão de SSH em ratos submetidos a HH sobre a PAM, FC, FSR, FSA, CVR e CVA.

3 METODOLOGIA

3.1. MODELO EXPERIMENTAL

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar (270-300g), fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais foram mantidos em salas climatizadas (22-24°C) e tiveram acesso *ad libitum* à água e ração, atendendo a todas as normas de manejo e cuidado animal. Todos os protocolos utilizados foram submetidos à aprovação pelo comitê de ética da Universidade Federal de Goiás (UFG; nº034/12; Anexo 1).

3.2. PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS GERAIS

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram inicialmente anestesiados com halotano (2% em 98% de O₂; Tanohalo; Cristália, Itapira, SP, Brasil). Em seguida, ocorreu a inserção de um cateter de polietileno na veia femoral direita realizando-se a manutenção anestésica através da administração de uretana (1,2 g·kg⁻¹, i.v; Sigma-Aldrich, MO, EUA), e posteriormente a infusão de SSH. Outro cateter foi inserido na artéria femoral direita para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e um cateter adicional foi inserido na artéria carótida direita para retirada de sangue induzindo o animal a um quadro de HH. A traqueostomia foi realizada a fim de minimizar o esforço respiratório dos animais.

Posteriormente, os animais foram fixados em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico (David Kopf Inst., CA, EUA) onde, em seguida, a musculatura da cabeça foi rebatida, expondo os ossos frontal e parietal que foram removidos com o auxílio de uma broca. Utilizou-se o bregma como ponto de referência para obtenção das coordenadas estereotáxicas. Posteriormente, o dorso foi aberto, expondo o rim esquerdo e sondas miniaturizadas (probe 1RB e probe 2RB, Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, USA) foram implantadas ao redor das artérias aorta e renal esquerda. Durante todo o experimento, a temperatura corporal foi mantida entre 36 e 37 °C com o auxílio de uma mesa térmica.

3.3. NANOINJEÇÃO NO ÓRGÃO SUBFORNICAL (SFO)

As nanoinjeções no SFO foram realizadas 10 min após o início da indução a hemorragia hipotensiva. Foram realizadas nanoinjeções (100 nL) de Muscimol (4 mM; agonista GABAérgico; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ou Propanolol (10mM; bloqueador β -adrenérgico não seletivo; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em grupos experimentais. O grupo controle recebeu apenas nanoinjeções de salina (NaCl; 0,15 M) nessa região. Para tanto, os animais foram posicionados em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico e tiveram a musculatura da cabeça rebatida expondo os ossos frontal e parietal, em seguida posicionou-se uma micropipeta de vidro acoplada a uma seringa, formando um sistema de nanoinjeção sob pressão, utilizando o bregma como ponto de referência para obtenção das coordenadas estereotáxicas, estas foram obtidas e modificadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1998). Posteriormente foi realizada a craniectomia, removendo parte dos ossos frontal e parietal com o auxílio de uma broca.

O volume injetado foi controlado pelo deslocamento do menisco da solução na micropipeta através de um microscópio cirúrgico dotado de uma lente ocular com retículo calibrado. Para a posterior confirmação histológica do sítio de nanoinjeção, ao término do período experimental foi nanoinjetada uma solução de azul de Evans (4% em NaCl 0,15 M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), no mesmo sítio e com o mesmo volume que fora anteriormente nanoinjetado as drogas ou soro fisiológico. As coordenadas utilizadas para nanoinjeções no SFO estão descritas na tabela a seguir.

TABELA 2: Coordenadas utilizadas para nanoinjeções na região do SFO.

COORDENADAS	SFO
Antero – Posterior	1,0 mm rostral ao bregma
Latero – Medial	0,0 mm lateral ao seio venoso sagital
Dorso – Ventral	4,2 mm ventral ao seio venoso sagital

3.4. HEMORRAGIA HIPOTENSIVA

A HH foi promovida através da retirada de sangue ao longo de 10 minutos, até que a pressão arterial média (PAM) atingisse valores próximo a 60 mmHg. Posteriormente esse nível de PAM foi mantido por mais 10 minutos através da retirada ou reinfusão de sangue quando necessário.

3.5. SOBRECARGA DE SÓDIO

A sobrecarga de sódio foi promovida através da infusão de SSH (NaCl 3M; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) após 20 minutos do início da indução da HH. A administração da solução foi realizada ao longo de aproximadamente 90 segundos, na dose de $1,8 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ de massa corpórea.

3.6. REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL MÉDIA (PAM) E FREQUÊNCIA CARDIACA (FC)

O sinal da pressão arterial pulsátil (PAP) foi obtido pela conexão do cateter da artéria femoral a um transdutor de pressão (MLT0699, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) acoplado a um amplificador (Bridge Amp, FE221, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os dados foram digitalizados em uma frequência de 2000 amostras $\cdot \text{s}^{-1}$ utilizando um conversor analógico digital (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A PAM foi calculada a partir da integral do sinal da PAP (LabChart 7 v7.3.7; ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A frequência cardíaca (FC) foi calculada como frequência instantânea do sinal da PAP (LabChart 7 v7.3.7, ADInstruments, Bella Vista, Austrália).

3.7. REGISTRO DO FLUXO SANGUÍNEO RENAL (FSR), FLUXO SANGUÍNEO AÓRTICO (FSA), CONDUTÂNCIA VASCULAR RENAL (CVR) E CONDUTÂNCIA VASCULAR AÓRTICA (CVA)

O fluxo sanguíneo aórtico (FSA) e fluxo sanguíneo renal (FSR) foram registrados por fluxometria de tempo de trânsito. Sondas miniaturizadas foram

implantadas na aorta abdominal e artéria renal esquerda e em seguida conectadas a um fluxômetro T206 (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, EUA) para determinação do fluxo sanguíneo em valores absolutos ($\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Os sinais obtidos foram enviados ao sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e os dados foram digitalizados em uma frequência de 2000 amostras $\cdot \text{s}^{-1}$.

As variações do FSR (%FSR) e do FSA (%FSA) foram calculadas como a razão percentual em relação ao valor basal. A condutância vascular renal (CVR) e a condutância vascular aórtica (CVA) foram calculadas pela razão entre o FSR/FSA e PAM, respectivamente. As variações da CVR (%CVR) e CVA (%CVA) foram obtidas pelo cálculo da variação percentual em relação ao valor basal. Todas as fórmulas utilizadas são mostradas na tabela a seguir.

TABELA 3: Resumo das fórmulas usadas para cálculo da %FSR, %FSA, CVR, CVA, %CVR, %CVA.

Variação do FSR (%FSR)	$\%FSR = \left(\frac{FSR_{\text{final}} - FSR_{\text{basal}}}{FSR_{\text{basal}}} \right) \cdot 100$
Variação do FSA (%FSA)	$\%FSA = \left(\frac{FSA_{\text{final}} - FSA_{\text{basal}}}{FSA_{\text{basal}}} \right) \cdot 100$
Condutância Vascular Renal (CVR)	$CVR = \frac{FSR}{PAM}$
Condutância Vascular Aórtica (CVA)	$CVA = \frac{FSA}{PAM}$
Variação do CVR (%CVR)	$\%CVR = \left(\frac{CVR_{\text{final}} - CVR_{\text{basal}}}{CVR_{\text{basal}}} \right) \cdot 100$
Variação do CVA (%CVA)	$\%CVA = \left(\frac{CVA_{\text{final}} - CVA_{\text{basal}}}{CVA_{\text{basal}}} \right) \cdot 100$

3.8. RETIRADA E PROCESSAMENTO DO TECIDO CEREBRAL

Ao final dos experimentos, os animais foram perfundidos com soro fisiológico (0,15M) seguido de solução de formaldeído (10%). Para tanto, o coração foi exposto e uma agulha conectada a uma cânula, e esta segunda acoplada a uma bomba de perfusão, foi introduzida na aorta ascendente. Posteriormente, o cérebro foi retirado e fixado em solução de formaldeído (0,1M). Utilizando um micrótomo de congelamento (Leica, Wetzlar, Alemanha), a região do SFO foi seccionada em cortes coronais de 40 μm de espessura. Para determinar os sítios de nanoinjeção no SFO. Os cortes obtidos desta região prosencefálica foram corados pela técnica do vermelho neutro.

3.9. COLORAÇÃO POR VERMELHO NEUTRO

Os cortes prosencefálicos da região do SFO dos animais submetidos a nanoinjeções nesse núcleo foram submetidos à coloração de vermelho neutro para evidenciar a marcação do corante azul de Evans (4%, 100nL, SigmaAldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a montagem em lâminas e secagem em temperatura ambiente, os cortes foram submergidos em vermelho neutro (C15H17ClN4, 1%) por 5 minutos. Em seguida foram lavados em água destilada e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$, 70%, 90%, 100%, 3 min). Os cortes foram ainda submergidos em xilol (C_8H_{10} , 30min, Neon, Suzano, SP, Brasil) para remoção do álcool e clarificação. Posteriormente foram recobertos com lamínulas com auxílio de DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (v 6.0). Os valores basais foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média) e analisados através de test-t. Os valores de PAM e FC e as variações do FSR, CVR, FSA e CVA foram expressas como média $\pm$ EPM e analisadas através de análise de variância de duas vias, seguido pelo teste de Tukey, nos casos em que o F atingiu o valor crítico assumindo-se $p < 0,05$.

3.11. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

O delineamento experimental está representado na figura 2.

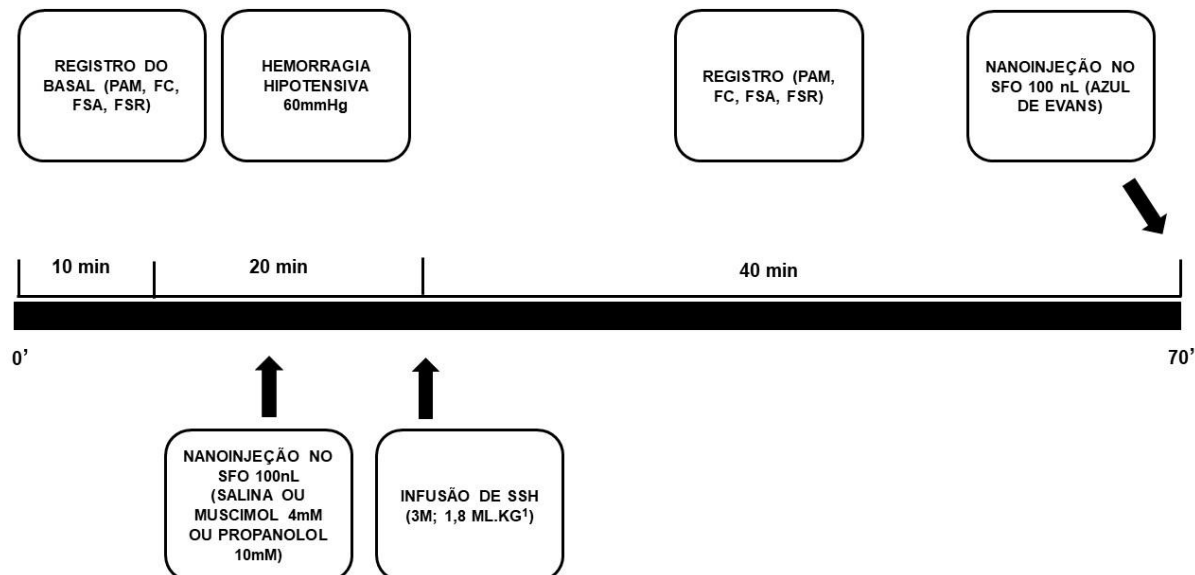


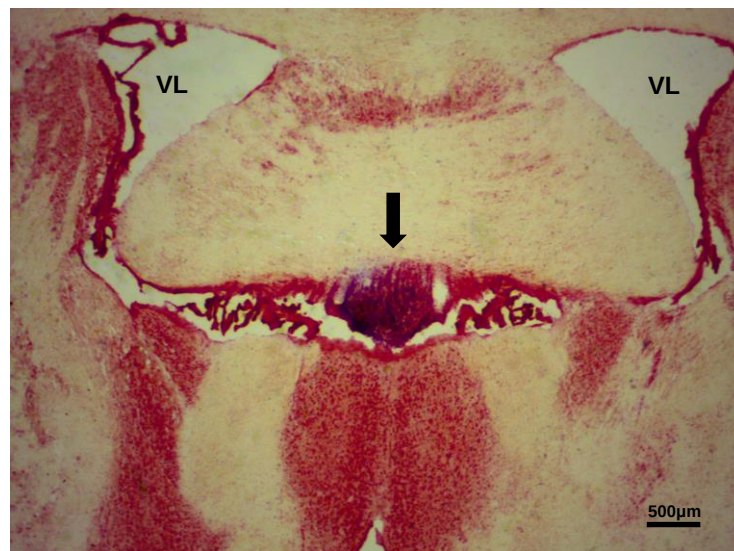
FIGURA 2. Esquema representativo do delineamento experimental dos grupos salina, muscimol 4mM e propranolol 10mM.

4-RESULTADOS

4.1- ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS NANOINJEÇÕES NO SFO

A análise histológica da propagação do corante Azul de Evans demonstrou que as nanoinjeções de salina (CONT; n=5), Muscimol 4mM (MUSC; n=6) ou Propranolol 10mM (PROP; n=6) no SFO foram limitadas a essa região (figura 3A). Assim, foram considerados para a análise, exclusivamente os animais cujas nanoinjeções foram restritas a região SFO.

A



B

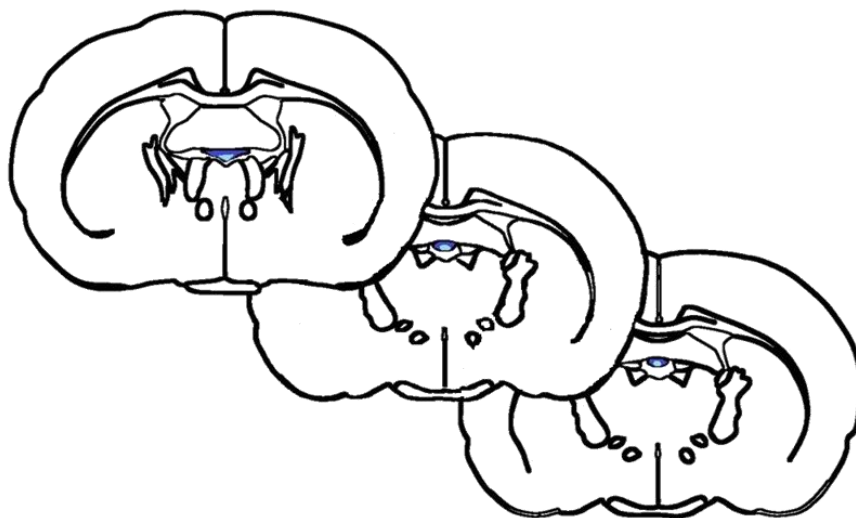


FIGURA 3. A: Fotomicrografia de uma seção coronal do prosencéfalo (40µm) mostrando um sítio típico de nanoinjeção no órgão subfornical. A seta indica a marcação do SFO com corante azul de evans 4%. Escala = 500 µm. **B:** Representação esquemática da disseminação do corante no SFO, azul escuro representa o espalhamento máximo e azul claro representa o espalhamento mínimo. VL: ventrículo lateral.

4.2. VALORES BASAIS DOS PARÂMETROS CARDIOVASCULARES E VOLUME DE SANGUE RETIRADO DURANTE A HIPOVOLEMIA

Os valores basais dos parâmetros cardiovasculares analisados e do volume sanguíneo retirado do animal durante a indução a hipovolemia, estão descritos na tabela 4.

Grupo	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	FSR (ml/min)	FSA (ml/min)	CVR ml/(min*mmHg)	CVA ml/(min*mmHg)	Volume de sangue (ml)
CONT	5	103,3±3,5	402 ± 16,3	1,8 ± 0,4	44,9 ± 6,9	0,02 ± 0,005	0,44 ± 0,07	3,83 ± 0,3
MUSC	6	108 ± 4,4	408 ± 10,5	1,9 ± 0,4	31,4 ± 5,2	0,02 ± 0,004	0,29 ± 0,04	4,1 ± 0,3
PROP	6	98,4 ± 2,2	410 ± 15,6	2,2 ± 0,3	32 ± 5,4	0,02 ± 0,003	0,32 ± 0,05	4,2 ± 0,3

TABELA 4. Média ± erro padrão da média (E.P.M) dos valores basais de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA), condutância vascular renal (CVR) e condutância vascular aórtica (CVA) dos animais que receberam nanoinjeção de salina (CONT), e muscimol 4mM (MUSC) e propranolol 10mM (PROP). n: número de animais.

Os valores basais dos parâmetros cardiovasculares foram semelhantes entre os grupos, conforme mostrado na Tabela 4. O volume de sangue retirado durante a HH foi similar entre os ratos do grupo CONT: 3,83 ± 0,3 ml, MUSC: 4,1 ± 0,3 ml e PROP 4,2 ± 0,3 ml.

4.3. ANALISE DO EFEITO DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO SFO COM MUSCIMOL 4mM E DO BLOQUEIO FARMACOLÓGICO COM PROPRANOLOL 10mM NA RECUPERAÇÃO CARDIOVASCULAR INDUZIDA PELA INFUSÃO DE SSH EM RATOS SUBMETIDOS A HEMORRAGIA HIPOTENSIVA

As alterações promovidas nos parâmetros cardiovasculares por meio de nanoinjeção de salina no SFO dos animais controle estão demonstradas no traçado abaixo (figura 4).

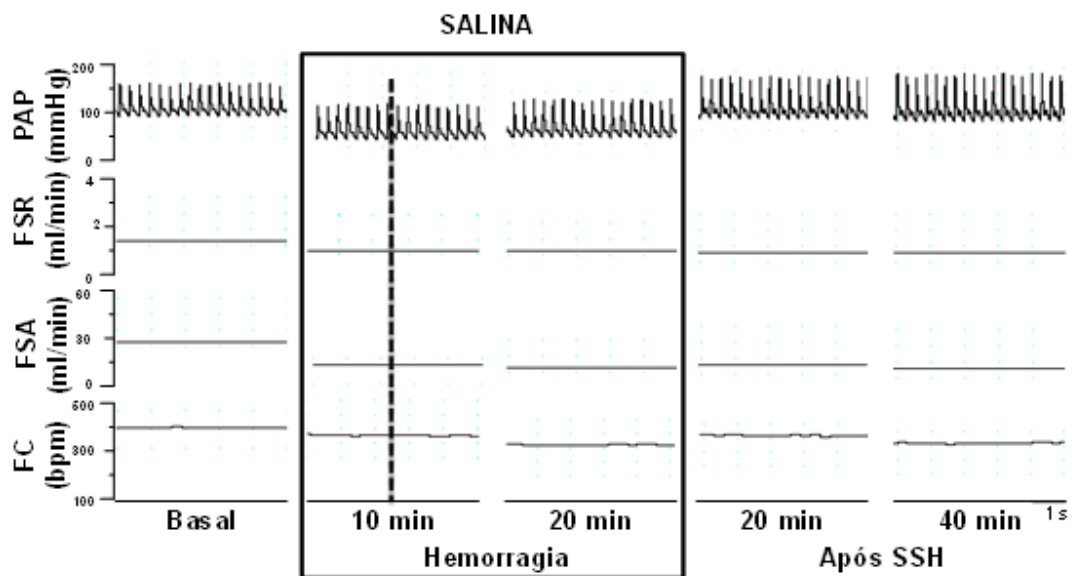


FIGURA 4. Traçado típico das alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA) e frequência cardíaca (FC), induzidas pela sobrecarga de sódio em animais que receberam nanoinjeção de salina. Estão apresentados os traçados representativos do período basal, dos tempos 10 e 20 min de hemorragia destacados pelo quadro preto assim como o momento da nanoinjeção em 10 min destacada pela linha pontilhada e os tempos 20 e 40 min após a infusão de SSH.

As alterações promovidas nos parâmetros cardiovasculares pela inibição farmacológica por meio de nanoinjeção de Muscimol 4mM de animais submetidos a infusão de SSH pós HH estão demonstradas no traçado abaixo (figura 5).

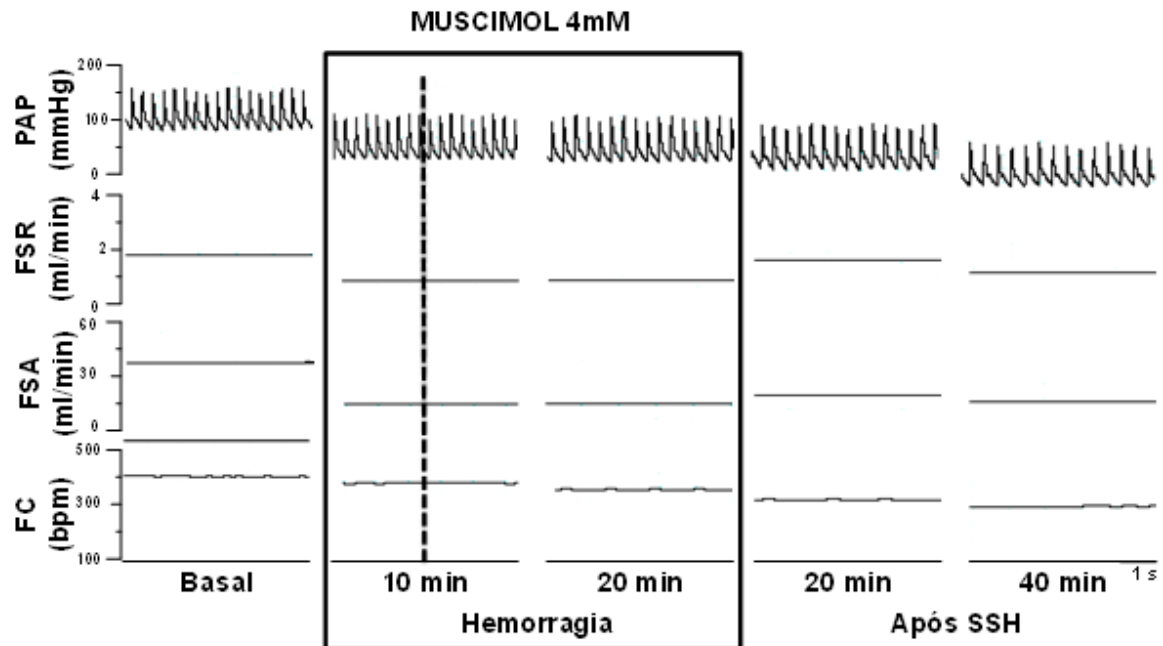


FIGURA 5. Traçado típico das alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA) e frequência cardíaca (FC), induzidas pela sobrecarga de sódio em animais que receberam nanoinjeção de Muscimol 4mM. Estão apresentados os traçados representativos do período basal, dos tempos 10 e 20 min de hemorragia destacados pelo quadro preto assim como o momento da nanoinjeção em 10 min destacada pela linha pontilhada e os tempos 20 e 40 min após a infusão de SSH.

As alterações promovidas nos parâmetros cardiovasculares pelo bloqueio farmacológico com nanoinjeção de Propranolol 10mM no SFO de animais submetidos a infusão de SSH pós HH estão demonstradas no traçado abaixo (figura 6).

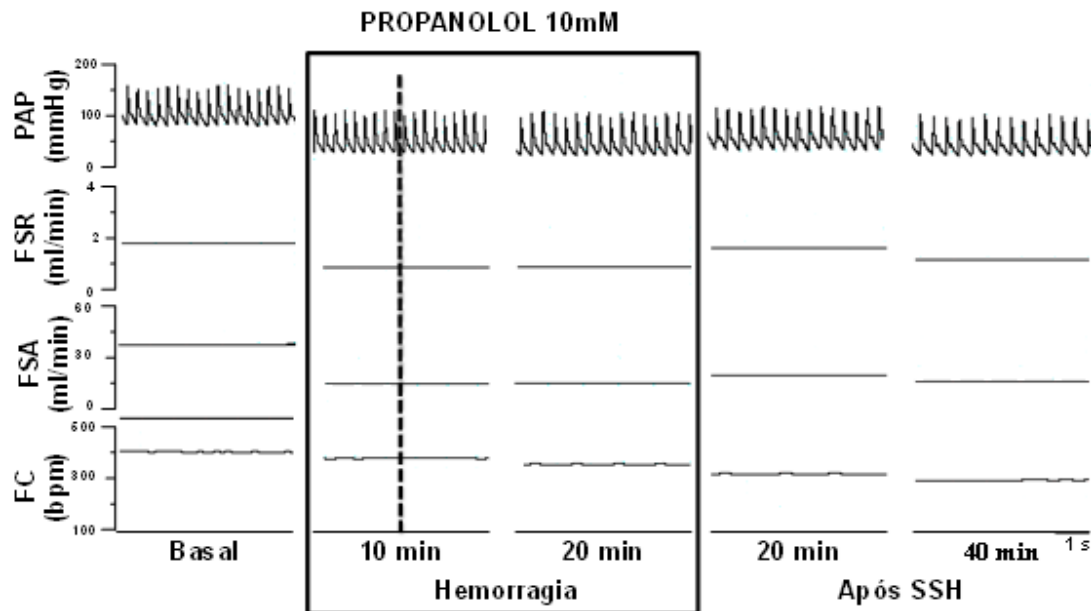


FIGURA 6. Traçado típico das alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), fluxo sanguíneo renal (FSR), fluxo sanguíneo aórtico (FSA) e frequência cardíaca (FC), induzidas pela sobrecarga de sódio em animais que receberam nanoinjeção de propranolol 10mM. Estão apresentados os traçados representativos do período basal, dos tempos 10 e 20 min de hemorragia destacados pelo quadro preto assim como o momento da nanoinjeção em 10 min destacada pela linha pontilhada e os tempos 20 e 40 min após a infusão de SSH.

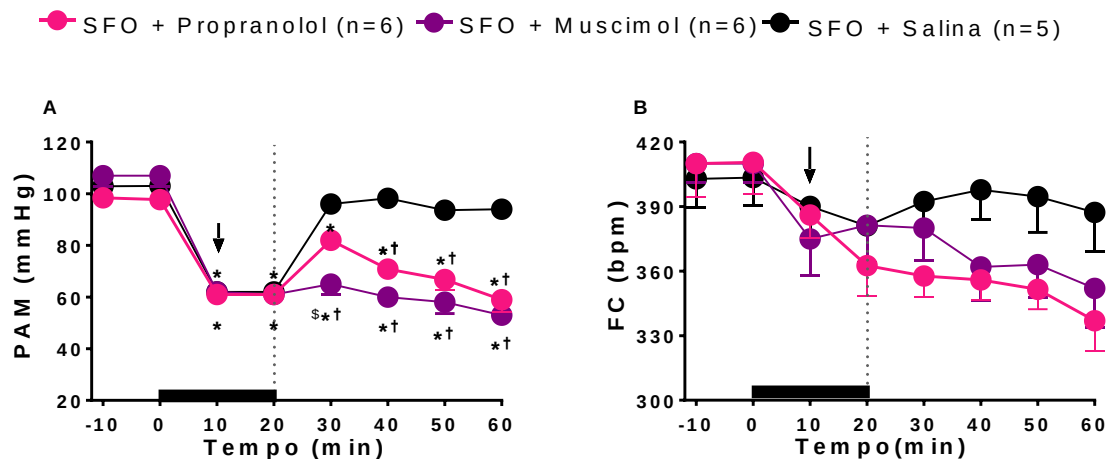


FIGURA 7. Variação da pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B), em animais que receberam nanoinjeções de salina (n=5), muscimol 4mM (n=6) e propranolol 10mM (n=6) induzidos a HH e submetidos a sobrecarga de sódio. *Diferente do tempo 0; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de hemorragia e a linha tracejada representa a infusão de SSH.

A hipotensão provocada durante a HH foi semelhante nos grupos CONT: (de $103,3 \pm 3,5$ para $62 \pm 0,3$ mmHg; 20 min após HH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7A), MUSC (de $108 \pm 4,4$ para $61 \pm 0,8$ mmHg; 20 min após HH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7A) e PROP (de $98,4 \pm 2,4$ para $61 \pm 1,3$ mmHg; 20 min após HH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7A). Observa-se que sobrecarga de sódio promoveu restauração da PAM a valores próximos ao basal em animais que receberam nanoinjeções de salina ($92 \pm 3,1$ mmHg; 40 min após infusão de SSH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7A). Entretanto, animais que receberam nanoinjeções de muscimol ($53 \pm 3,8$ mmHg; 40 min após infusão de SSH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7A) e propranolol ($59 \pm 4,8$ mmHg; 40 min após infusão de SSH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7A), a infusão de SSH não foi capaz de restaurar este parâmetro a níveis basais, sendo a PAM significativamente menor que o grupo CONT.

Durante a HH não foram observadas diferenças significativas na FC em ambos os grupos CONT (de $402 \pm 16,3 \pm 13,4$ bpm para $375,4 \pm 19,8$; 20 min após HH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7B); MUSC (de $408 \pm 10,5$ bpm para $375,0 \pm 22,3$ bpm; 20 min após HH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7B) e PROP (de $410 \pm 15,6$ para $362 \pm 14,6$ bpm; 20 min após HH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7B). Verificando-se que 40 min após

a sobrecarga de sódio não há alteração significativa neste parâmetro CONT ($346,0 \pm 19,7$ bpm; 40 min após HH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7B); MUSC ($352,0 \pm 18,1$ bpm; 40 min após HH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7B) e PROP ($336,9 \pm 14,2$ bpm; 40 min após HH; $p < 0,05$; Figuras 4, 5, 6 e 7B).

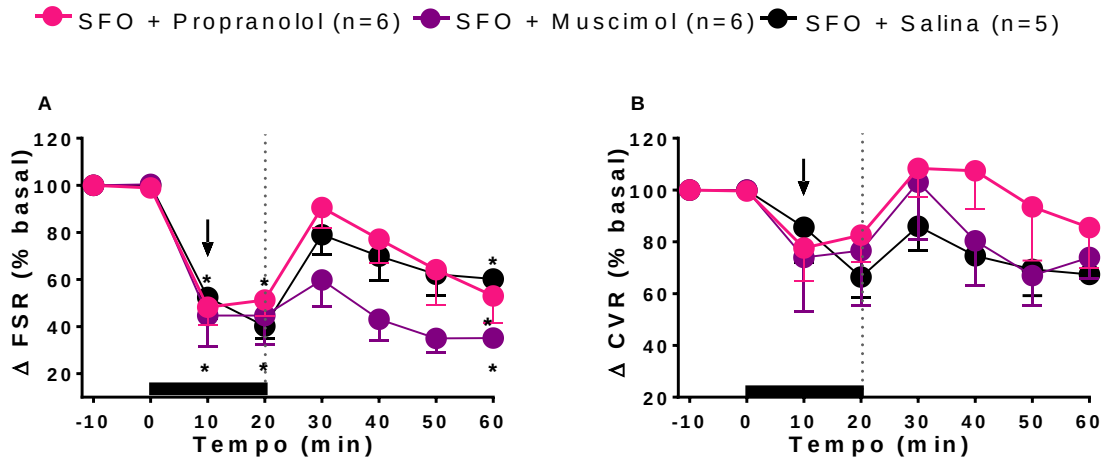


FIGURA 8. Variação do fluxo sanguíneo renal (FSR; A), condutância vascular renal (CVR; B) em animais que receberam nanoinjeções de salina (n=5), muscimol 4mM (n=6) e propranolol 10mM (n=6) induzidos a HH e submetidos a sobrecarga de sódio. *Diferente do tempo 0; $p < 0,05$. A barra preta representa o período de hemorragia e a linha tracejada representa a infusão de SSH.

A HH promoveu redução significativa do FSR em ambos os grupos: CONT (Δ : $-59,8 \pm 5,3\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 8A); MUSC (Δ : $-53,4 \pm 14,6\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 8A) e PROP (Δ : $48,7 \pm 6,8\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 8A). 40 minutos pós a infusão de SSH observa-se que ambos os grupos apresentam diferenças estatísticas quando comparados ao basal: CONT (Δ : $-20,8 \pm 19,1\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após a infusão de SSH; Figuras 4, 5, 6 e 8A); MUSC (Δ : $-64,9 \pm 4,1\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após a infusão de SSH; Figuras 4, 5, 6 e 8A) e PROP (Δ : $-51,3 \pm 11,6\%$, em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após a infusão de SSH; Figuras 4, 5, 6 e 8A).

Quando analisada a CVR, não foram observadas diferenças significativas em nenhum dos grupos tanto após a HH: CONT (Δ : $-33,6 \pm 8\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 8B); MUSC (Δ : $-23 \pm 6,8\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 8B) e PROP (Δ : $-17,4 \pm 10,3$ em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 8B) como após a infusão de SSH: CONT (Δ : $-32,6 \pm 2,9\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após SSH; Figuras 4, 5, 6 e 8B); MUSC (Δ : $-27 \pm 8,0\%$ em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após SSH; Figuras 4, 5, 6 e 8B; Figuras 4, 5, 6 e 7C) e PROP (Δ : $-14,5 \pm 15,7\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após a infusão de SSH; Figuras 4, 5, 6 e 8B).

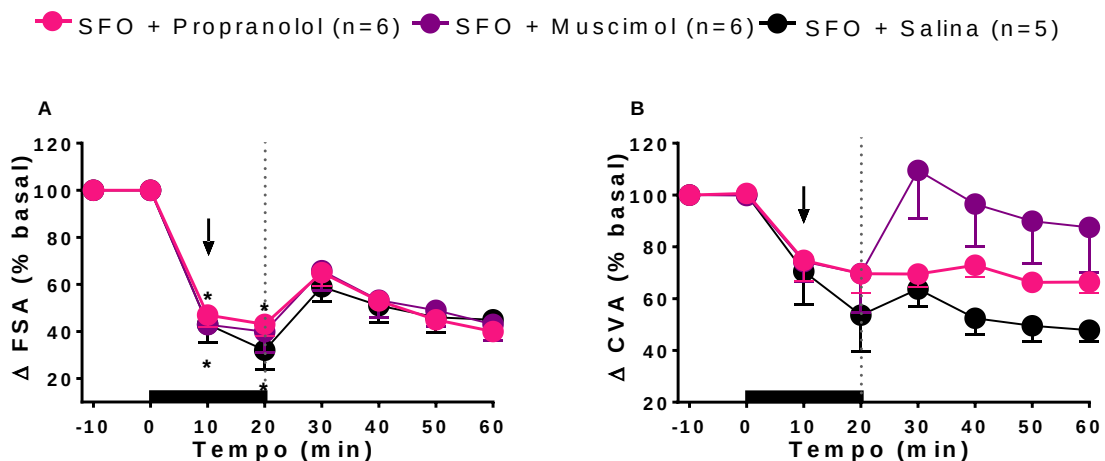


FIGURA 9. Variação do fluxo sanguíneo aórtico (FSA; A) e condutância vascular aórtica (CVA; B) em animais que receberam nanoinjeções de salina (n=5), muscimol 4mM (n=6) e propranolol 10mM (n=6) induzidos a HH e submetidos a sobrecarga de sódio. *Diferente do tempo 0; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de hemorragia e a linha tracejada representa a infusão de SSH.

A HH reduziu significativamente o FSA em ambos os grupos: CONT (Δ : $-75 \pm 5,2\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 9A); MUSC (Δ : $-60,1 \pm 9,0$; 20 min após a HH; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 9A) e PROP (Δ : $-57 \pm 5\%$, em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 9A). Entretanto 40 minutos após a infusão de SSH não há diferença estatística deste parâmetro em nenhum grupo analisado quando comparado aos seus basais: CONT (Δ : $-55 \pm 5,8\%$; em relação ao

valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após SSH; Figuras 4, 5, 6 e 9A); MUSC (Δ : $-57 \pm 6,9\%$; %; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após SSH; Figuras 4, 5, 6 e 9A) e PROP (Δ : $-60 \pm 3,7\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após SSH; Figuras 4, 5, 6 e 9A).

Não foram observadas alterações significativas em ambos os grupos da CVA tanto após a HH: CONT (Δ : $-46,4 \pm 14,1\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 9B); MUSC (Δ : $-30,3 \pm 15,1\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 9B) e PROP (Δ : $-30,4 \pm 7,4\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 20 minutos após HH; Figuras 4, 5, 6 e 9B) assim como 40 minutos após a infusão de SSH: CONT (Δ : $-52,2 \pm 4,5\%$; em relação ao valor basal, $p < 0,05$; 40 minutos após SSH; Figuras 4, 5, 6 e 9B); MUSC (Δ : $-11,4 \pm 14,8\%$; 40 minutos após SSH; Figuras 4, 5, 6 e 9B) e PROP (Δ : $-33,6 \pm 4,1\%$; 40 minutos após SSH; Figuras 4, 5, 6 e 9B).

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que a infusão de solução salina hipertônica (NaCl; 3M) é eficaz na recuperação cardiovascular de ratos submetidos a hemorragia hipotensiva. Demonstramos ainda que a integridade do SFO é essencial para essa eficácia desta recuperação. Mais especificadamente o presente estudo evidenciou que: I) a HH promove redução da PAM; II) a infusão de SSH após a HH reestabelece a PAM em animais que receberam nanoinjeção de salina; III) a infusão de SSH após HH não reestabelece a PAM em animais com o SFO inibido farmacologicamente por nanoinjeção de Muscimol 4mM; IV) Não há reestabelecimento da PAM em animais onde houve o bloqueio farmacológico com propranolol 10mM, demonstrando que a neurotransmissão adrenérgica, via receptor β está envolvida no reestabelecimento da PA deste núcleo em situações de hipovolemia.

De acordo com a literatura, a HH promove redução do volume sanguíneo circulante conduzindo a diminuição do volume diastólico e hipotensão (61), diminuição do retorno venoso, FC e débito cardíaco (19). Amaral e colaboradores (2014) (21), confirmaram que a retirada de 15-25% do volume sanguíneo é capaz de gerar um estado de hipovolemia e hipotensão. Os resultados do presente estudo, utilizando protocolo semelhante, corroboram com esses achados anteriores. Demonstrando que, de fato, a retirada de volume sanguíneo é capaz de promover efetivamente um estado de hipovolemia.

A melhora cardiovascular e hemodinâmica promovida pela sobrecarga de sódio após a hipovolemia já foi consolidada em diversos estudos (19,21). Em estudo clássico, Velasco e colaboradores (1980) (14), demonstraram que a infusão de SSH (7,5% de NaCl) em cães submetidos a HH promoveu o reestabelecimento da PAM e débito cardíaco. Em adição, diversos pesquisadores confirmam que, o uso de SSH induz a recuperação destes parâmetros (16). Como observou-se nos resultados aqui apresentados, de fato, a infusão de um pequeno volume de SSH promove esta recuperação em animais que receberam nanoinjeção de salina. Evidências

experimentais sugerem que mecanismos mediados por componentes centrais são desencadeados após aumentos agudos da concentração plasmática de sódio (62).

É de conhecimento a existência de diversas regiões neurais que possuem envolvimento na regulação do sistema cardiovascular (63). Informações sobre as alterações da pressão arterial, volemia e/ou osmolaridade são detectadas por barorreceptores, quimiorreceptores, receptores cardiopulmonares e osmorreceptores periféricos, sendo conduzidas ao SNC via nervos vago e glossofaríngeo, onde são processadas inicialmente no NTS. A partir do NTS, estas informações são enviadas para regiões envolvidas no controle cardiovascular e hidroeletrolítico, como Núcleo Parabraquial, PVN, as regiões bulbares CVLM e RVLM, o MnPO e SFO (64). Ademais, investigações anteriores evidenciaram que os neurônios do SFO são despolarizados pelo aumento da concentração plasmática de sódio e hiperpolarizados a partir da redução desta (29).

Sabendo do conhecimento de vias neurais que possuem envolvimento no controle cardiovascular e hidroeletrolítico, procuramos avaliar qual seria o papel do SFO na recuperação cardiovascular de animais submetidos a infusão de SSH após a HH.

Os resultados obtidos em nosso trabalho, evidenciaram que a infusão de SSH se mostrou ineficiente na restauração da PAM em animais submetidos a inibição farmacológica com Muscimol 4mM (bloqueador GABAérgico). Osaka e colaboradores [18], mostraram que o bloqueio de entradas GABAérgicas no SFO promove aumento na atividade espontânea dos neurônios do SFO. Sabe-se que, o GABA é um neurotransmissor inibitório amplamente aceito no SNC. Receptores GABAérgicos podem ser divididos em dois subtipos: GABA_A e GABA_B (65,66). Os receptores GABA_A são ativados especificamente por muscimol e antagonizado por bicuculina ou picrotoxina (66,67). Os receptores GABA_B, que estão principalmente localizados em terminais nervosos, são ativados especificamente por baclofeno (65,68), e estão associados a canais Ca^{2+} e K^{+} através de ligações de proteínas a guanosina trifosfato (GTP). Em adição, dados encontrados na literatura demonstraram a existência de receptores GABA_A nas membranas neuronais no interior do SFO (69).

De acordo com a literatura o SFO possui amplas projeções eferentes para outras estruturas, como o PVN, SON e MnPO (52,70). Em adição, ressalta-se que as projeções diretas do SFO, bem como a transmissão indireta através do MnPO para o PVN, regulam a liberação de vasopressina e a atividade simpática vascular e cardíaca (70). Um estudo observou a partir de um método de marcação dupla retrógrada com dois marcadores fluorescentes, o FluoSpheres (coloração vermelha) injetado no MnPO e Fast Blue no PVN unilateral que, diversos neurônios marcados retrogradamente foram encontrados em todo o SFO, sendo que destes neurônios marcados, boa porcentagem apresentava dupla marcação. Estes achados indicam que neurônios do SFO se projetam simultaneamente para o MnPO e PVN por meio de ramos axiais colaterais, sugerindo a existência de vias neuronais originadas no SFO envolvidas na regulação da homeostase cardiovascular e de fluidos corporais (71).

De fato, resultados anteriores encontrados em nosso laboratório mostraram que, em modelos de hipovolemia, a inibição farmacológica do MnPO, via muscimol impediu a recuperação da PAM (21). Estes achados corroboram com os obtidos no presente trabalho, indicando que a via SFO-MnPO é importante para o estabelecimento das respostas efectoras necessárias para a recuperação cardiovascular induzidas por SSH em ratos submetidos a hemorragia.

Sabendo da importância do SFO na ressuscitação induzida pela infusão de solução salina hipertônica em animais hemorrágicos, procuramos evidenciar se a neurotransmissão adrenérgica via receptor β -adrenérgico estaria envolvida nessas respostas de regulação cardiovascular.

Menani e colaboradores (1984) (72); demonstraram que a estimulação adrenérgica com noradrenalina (20, 40, 80 e 160nM) e isoproterenol (20, 40, 80 e 160nM; agonista β -adrenérgico) promove aumento na ingestão de água quando administradas no SFO. No entanto esta resposta é bloqueada quando administrado propanolol 40nM no SFO. Em adição, Cannata e colaboradores (1986) (73), em experimento similar verificaram que, animais em protocolo experimental de privação de água também apresentaram diminuição no consumo de água após administração de propanolol 40nM via cânula guia no SFO, sendo observado também que, quando

administrado propanolol em mesma concentração no terceiro ventrículo não havia alteração na ingestão de água. Estes estudos nos permitem concluir que a neurotransmissão β -adrenérgica no SFO atua na regulação do comportamento do volume circulante. Entretanto, a participação da neurotransmissão β -adrenérgica no SFO na recuperação cardiovascular induzida por infusão de SSH ainda não havia sido demonstrada na literatura.

No presente estudo demonstramos que animais submetidos a bloqueio farmacológico com propanolol 10 mM em quadro de hipovolemia não apresentaram restauração da PAM. Assim, pela primeira vez na literatura, mostramos que o bloqueio da neurotransmissão β -adrenérgica no SFO impede a recuperação da PAM por infusão de SSH após a HH.

Sabe-se que, o SFO recebe projeções dos grupamentos de neurônios A2 localizadas no NTS e dos neurônios A1 localizado na CVLM (25,54), sendo esta uma via noradrenérgica relacionada ao balanço hidrosalino. Autores relataram que, informações relacionadas a alterações da composição do volume circulante advindas dos aferentes carotídeos e osmorreceptores periféricos são enviadas ao grupamento A2 e este, por sua vez as direciona para outras regiões como o CVLM, MnPO e SFO (74,75). Tanaka e colaboradores (1997) (76), evidenciaram que as projeções noradrenérgicas derivadas do grupo de células A2 podem transmitir informações cardiovasculares e hidroeletrólíticas ao SFO. Em adição, dados na literatura mostraram a existência de um conjunto de neurônios no CVLM que alteram sua taxa de descarga em resposta a alterações nos níveis plasmáticos de sódio e ainda que, esses neurônios também atuam na regulação cardiovascular (77). Ademais, informações aferentes dos barorreceptores retransmitidas através do CVLM modulam a atividade dos neurônios no SFO para sinais extracelulares do equilíbrio de fluidos corporais (78).

Estudos relataram que, a presença de atividade em barorreceptores arteriais promove alteração da excitabilidade de neurônios do NTS com projeções eferentes diretamente para o SFO (79,80) e ainda que a estimulação de barorreceptores aórticos provoca alterações na expressão de c-fos na SFO (81). Kawano e colaboradores (2001) (25), investigaram possíveis locais de origem das projeções

catecolaminérgicas para a SFO, através de método de rastreamento retrógrado combinado com imuno-histoquímica, utilizando marcador retrógrado, complexo de ouro peroxidase-coloidal de rábano conjugado a aglutinina de germe de trigo. Os achados deste trabalho indicaram a existência de projeções catecolaminérgicas do RVLM para a SFO, além de projeções noradrenérgicas do NTS. Estudos recentes de nosso laboratório (57), demonstram que a lesão com nanoinjeção do complexo saporina-anti-dopamina- β -hidroxilase (saporina-anti-D β H; 100 nL) nos grupamentos noradrenérgicos bulbares abole a recuperação cardiovascular induzida por SSH após a HH. Estes achados associados aos obtidos no presente trabalho, permitem concluir que as projeções noradrenérgicas bulbares para os neurônios do SFO podem ser importantes para o reestabelecimento hemodinâmico induzido por SSH em ratos hemorrágicos. Assim, a lesão destes neurônios adrenérgicos ou o bloqueio farmacológico da via β -adrenérgica no SFO impede o reestabelecimento da PA após a administração de SSH em ratos submetidos a hemorragia.

Em nosso estudo não foram observadas diferenças significativas nos grupos avaliados nos parâmetros FSA e FSR após a administração de SSH, demonstrando que o SFO parece não modular diretamente as respostas a sobrecarga de sódio nos leitos aórtico e renal durante o HH, diferente do que é encontrado por Amaral e colaboradores (2014) (21), ao realizar inibição farmacológica do MnPO. Entretanto é possível que outros leitos não analisados no presente estudo possam ainda ser modulados pelo SFO, necessitando de investigações adicionais. Em adição, não foram observadas alterações na condutância vascular no leito renal e aórtico (CVR e CVA, respectivamente). Tendo em vista que a condutância vascular é calculada pela razão entre fluxo sanguíneo e PAM.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente trabalho indicam, pela primeira vez na literatura, que a inibição farmacológica do SFO impede a restauração da PAM induzida pela infusão de SSH após a HH e ainda que, o bloqueio farmacológico da neurotransmissão β -adrenérgica no SFO impede a restauração de parâmetros cardiovasculares induzida pela infusão de solução de salina hipertônica em animais submetidos a hemorragia hipotensiva. Esses dados confirmam a participação do SFO na regulação dessa resposta. Desse modo, a integridade do SFO e da neurotransmissão β -adrenérgica parece ser fundamental para a conexão dos

aferentes periféricos a núcleos e estruturas centrais responsáveis pela geração de respostas endócrinas e autonômicas responsáveis pelo reestabelecimento cardiovascular promovidas por aumentos na osmolaridade plasmática durante a HH.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstram que, a inibição farmacológica do SFO, e mais especificamente o bloqueio da neurotransmissão β -adrenérgica é capaz de suprimir o reestabelecimento da pressão arterial em resposta à infusão de SSH em ratos submetidos a hemorragia hipotensiva. Estes resultados sustentam a hipótese de que a neurotransmissão β -adrenérgica neste núcleo é essencial para a recuperação cardiovascular induzida pela SSH em animais com HH.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Zhao X, Ren W, Siegel PB, Li J, Yin H, Liu Y, et al. 2015. Zhao et al. Housing systems interacting with sex and genetic line affect broiler growth and carcass treats.pdf. Poult Sci. 2015;94(7):17111–1717.
2. Kauvar DS, Lefering R, Wade CE. Impact of Hemorrhage on Trauma Outcome: An Overview of Epidemiology, Clinical Presentations, and Therapeutic Considerations. J Trauma Inj Infect Crit Care [Internet]. 2006;60(Supplement):S3–11. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0005373-200606001-00002>
3. Kobayashi L, Costantini TW, Coimbra R. Hypovolemic shock resuscitation. Surg Clin North Am [Internet]. 2012;92(6):1403–23. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23153876>
4. Gaieski D, Parsons PE, Wilson KC. Shock in adults : Types, presentation, and diagnostic approach. UpToDate. 2012;i:1–10.
5. Kreimeier U, Ruiz-Morales M, Messmer K. Comparison of the effects of volume resuscitation with Dextran 60 vs. Ringer's lactate on central hemodynamics, regional blood flow, pulmonary function, and blood composition during hyperdynamic endotoxemia. Circ Shock. 1993;39(2):89–99.
6. Velasco IT. Clinical and therapeutic aspects of the state of shock. S??o Paulo medical journal = Revista paulista de medicina. 1997;115(1):1329.
7. Avram MJ, Ph D, Stoelting RK, Cahalan MK, Stock MC, Philadelphia MD. Reviews of educational material. 2010;(March):767–8.
8. Langer RM. Vladimir P. Demikhov, a Pioneer of Organ Transplantation. TPS [Internet]. 2011;43(4):1221–2. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2011.03.070>
9. Mutschler M, Nienaber U, Brockamp T, Wafaisade A, Wyen H, Peiniger S, et al. A critical reappraisal of the ATLS classification of hypovolaemic shock: Does it

- really reflect clinical reality? *Resuscitation*. 2013;84(3):309–13.
10. Journal AI, Ao-ieong ESY, Williams A, Jani V, Cabrales P, Williams A, et al. Cardiac function during resuscitation from hemorrhagic shock with polymerized bovine hemoglobin-based oxygen therapeutic bovine hemoglobin-based oxygen therapeutic. *Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol* [Internet]. 2016;0(0):000. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/21691401.2016.1241797>
 11. Stancil SA. Development of a New Infusion Protocol for Austere Trauma Resuscitations. *Air Med J* [Internet]. 2017;36(5):239–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1067991X16302334>
 12. Krausz MM. Initial resuscitation of hemorrhagic shock. *World J Emerg Surg* [Internet]. 2006;1:14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1488835&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 13. Morel N, Bernard JC, Dabadie P, Sztark F. Le serum sal hypertonique en 2004. *Reanimation*. 2004;13(8):484–91.
 14. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M Jr LO. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol* [Internet]. 1980;239(5):H664–73. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6776826>
 15. Vassar MJ, Perry CA, Holcroft JW. Prehospital resuscitation of hypotensive trauma patients with 7.5% NaCl versus 7.5% NaCl with added dextran: a controlled trial. *J Trauma* [Internet]. 1993;34(5):622–32; discussion 632-3. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7684457>
 16. Wade CE, Grady JJ, Kramer GC, Younes RN, Gehlsen K, Holcroft JW. Individual patient cohort analysis of the efficacy of hypertonic saline/dextran in patients with traumatic brain injury and hypotension. *J Trauma* [Internet]. 1997;42(5 Suppl):S61-5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9191698>
 17. By MICS, Injections SC, Felipe JDE, Timoner J, Velasco IT, Lopes OU, et al. treatment of refractory Introduction drug therapy ; in these circumstances , death is very probable . The use of hyperosmotic crystalloid injections in the treatment

of severe haemorrhagic shock is not new; solutions of glucose , NaCl , or mannitol , at . 1980;1002–4.

18. Kramer GC. Hypertonic resuscitation: physiologic mechanisms and recommendations for trauma care. *J Trauma*. 2003;54(5 Suppl):S89–99.
19. Pedrino GR, Rossi M V., Schoorlemmer GHM, Lopes OU, Cravo SL. Cardiovascular adjustments induced by hypertonic saline in hemorrhagic rats: Involvement of carotid body chemoreceptors. *Auton Neurosci Basic Clin*. 2011;160(1–2):37–41.
20. de Almeida CEF, Pedrino GR, Lopes OU, Cravo SL. 2009. Afferent pathways involved in cardiovascular adjustments induced by hypertonic saline resuscitation in rats submitted to hemorrhagic shock. *Shock*. 2009;32(2):190–3.32, 190–193
21. Amaral NO, Naves LM, Ferreira-Neto ML, Freiria-Oliveira AH, Colombari E, Rosa DA, et al. Median preoptic nucleus mediates the cardiovascular recovery induced by hypertonic saline in hemorrhagic shock. *Sci World J*. 2014;2014.
22. Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Murphy D, Paulin RF, Antunes-Rodrigues J, Colombari E, et al. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013 Apr;304(7):R531-42.
23. Antunes-Rodrigues J, Machado BH, Andrade HA, Mauad H, Ramalho MJ, Reis LC, et al. Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Aug;89(15):6828–31.
24. Collins R, Peto R, MacMahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA, et al. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2, Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet (London, England)*. 1990 Apr;335(8693):827–38.
25. Kawano H, Masuko S. Tyrosine hydroxylase-immunoreactive projections from

- the caudal ventrolateral medulla to the subfornical organ in the rat. *Brain Res.* 2001;903(1–2):154–61.
26. Colombari DS, Colombari E, Lopes OU, Cravo SL. Afferent pathways in cardiovascular adjustments induced by volume expansion in anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* [Internet]. 2000;279(3):R884-90. Available from: <http://ajpregu.physiology.org/content/279/3/R884.abstract>
 27. Vatner SF. Effects of volume expansion on renal nerve activity , renal blood flow , and sodium and water excretion in conscious dogs MORITA. 2019;
 28. Colombari E, Colombari DSA, Li H, Shi P, Dong Y, Jiang N, et al. Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Paraventricular Nucleus Plays a Major Role in the Sympathoexcitatory Response to Salt. 2010;
 29. Bourque C, Oliet SH, Richard D. Osmoreceptors, Osmoreception, and Osmoregulation. *Front Neuroendocrinol.* 1994 Sep;15(3):231–74.
 30. Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1996;23(2):183–91.
 31. Johnson AK, Thunhorst RL. The Neuroendocrinology of Thirst and Salt Appetite: Visceral Sensory Signals and Mechanisms of Central Integration. *Front Neuroendocrinol.* 1997 Jul;18(3):292–353.
 32. Castro MDE, Elias LLK, Valenc MM, Castro M De, Elias LLK, Valenc MM. Neuroendocrine Control of Body Fluid Metabolism. 2004;169–208.
 33. Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. 2008;9(july).
 34. Bourque CW, Naeini RS, Witty M, Se P. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. 2006;9(1):93–8.
 35. Ciura S, Bourque CW. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Required for Intrinsic Osmoreception in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons and for Normal Thirst Responses to Systemic Hyperosmolality. *J Neurosci.* 2006

Feb;22(4):1238–47.

36. Law MR, Frost CD, Wald NJ. By how much does dietary salt reduction lower blood pressure? Analysis of data from trials of salt reduction. *BMJ*. 1991 Apr;302(6780):819–24.
37. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*. 1998 Jul;78(3):583–686.
38. Antonio F. Sanjuliani, Marcia R. S. G. Torres, Livia N. Paula, Fabiana B. Bassan. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: Bases fisiológicas e fisiopatológicas. *Rev do Hosp Univ Pedro Ernesto, UERJ*. 2011;11–30.
39. Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier. *Cell Tissue Res*. 2003;314(1):119–29.
40. Pastuskovas C, Vivas L. Effect of intravenous captopril on c-fos expression induced by sodium depletion in neurons of the lamina terminalis. *Brain Res Bull*. 1997;44(3):233–6.
41. Vivas L, Pastuskovas CV, Tonelli L. Sodium depletion induces Fos immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. *Brain Res*. 1995;679(1):34–41.
42. Vivas L, Chiaraviglio E, Carrer HF. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: Responses to changes in sodium concentration. *Brain Res*. 1990;519(1–2):294–300.
43. Weisinger RS, Denton DA, Di Nicolantonio R, Hards DK, McKinley MJ, Oldfield B, et al. Subfornical organ lesion decreases sodium appetite in the sodium-depleted rat. *Brain Res*. 1990;526(1):23–30.
44. Smith PM, Beninger RJ, Ferguson A V. Subfornical organ stimulation elicits drinking. *Brain Res Bull*. 1995;38(3):209–13.
45. Iovino M, Steardo L. Vasopressin release to central and peripheral angiotensin II in rats with lesions of the subfornical organ. *Brain Res*. 1984;322(2):365–8.

46. Simpson JB. The circumventricular organs and the central actions of angiotensin. *Neuroendocrinology* [Internet]. 1981;32(4):248–56. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7012657>
47. Ferguson A V, Wall KM. Central actions of angiotensin in cardiovascular control: multiple roles for a single peptide. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992;70(5):779–85.
48. Ferguson A V., Bains JS. Actions of angiotensin in the subfornical organ and area postrema: implications for long term control of autonomic output. *Clin Exp Pharmacol Physiol* [Internet]. 1997;24(1):96–101. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1440-1681.1997.tb01790.x>
49. Dellmann HD. Fine structural organization of the subfornical organ. A concise review. *Brain Res Bull*. 1985;15(1):71–8.
50. Lind RW, Swanson LW, Sawchenko PE. Anatomical evidence that neural circuits related to the subfornical organ contain angiotensin II. *Brain Res Bull* [Internet]. 1985;15(1):79–82. Available from: <http://www.biomednet.com/db/medline/85281589>
51. Kai A, Ono K, Kawano H, Honda E, Nakanishi O, Inenaga K. Galanin inhibits neural activity in the subfornical organ in rat slice preparation. *Neuroscience*. 2006;143(3):769–77.
52. Lind RW, van Hoesen GW, Johnson AK. An HRP study of the connections of the subfornical organ of the rat. *J Comp Neurol*. 1982;210(3):265–77.
53. Miselis RR. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: A circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res*. 1981;230(1–2):1–23.
54. Ciriello J, Rosas-Arellano MP, Solano-Flores LP. Direct projections to subfornical organ from catecholaminergic neurons in the caudal nucleus of the solitary tract. *Brain Res*. 1996;726(1–2):227–32.
55. Plasma hypernatremia induces c-fos activity in medullary catecholaminergic

- neurons. *Brain Res.* 1995 Mar;674(1):46–54.
56. Godino A, Giusti-Paiva A, Antunes-Rodrigues J, Vivas L. Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. *Neuroscience.* 2005;133(2):493–505.
 57. Naves LM, Marques SM, Mourão AA, Fajemiroye JO, Xavier CH, Castro CH De, et al. Involvement of median preoptic nucleus and medullary noradrenergic neurons in cardiovascular and sympathetic responses of hemorrhagic rats. 2018;(February):1–14.
 58. Tanaka J, Miyakubo H, Hayashi Y, Nomura M. Hemorrhage activates catecholaminergic neurons sensitive to GABA in the nucleus of the solitary tract with ascending projections to the subfornical organ in rats. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2001;91(1–2):100–4.
 59. Osaka T, Yamashita H, Koizumi K. Inhibitory inputs to the subfornical organ from the AV3V: Involvement of GABA. *Brain Res Bull.* 1992;29(5):581–7.
 60. Inenaga K, Nagatomo T, Honda E, Ueta Y, Yamashita H. GABAergic inhibitory inputs to subfornical organ neurons in rat slice preparations. *Brain Res.* 1995;705(1–2):85–90.
 61. Spevetz A, Parrillo JE. Shock-Classification-Pathophysiological-Characteristics-and-Management. *Comprehensive Critical Care: Adult.* 2011.
 62. Silva EF, Sera CTN, Mour AA, Lopes PR, Moreira MCS, Cravo LD, et al. Involvement of sinoaortic afferents in renal sympathoinhibition and vasodilation induced by acute hypernatremia. 2015;(July):1135–41.
 63. Huang C, Johns EJ. Role of brain angiotensin II on somatosensory-induced antinatriuresis in hypertensive rats. *Hypertension [Internet].* 2001;37(6):1369–74. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11408379>
 64. Vasquez EC, Meyrelles SS, Mauad H, Cabral AM. Neural reflex regulation of arterial pressure in pathophysiological conditions: Interplay among the baroreflex, the cardiopulmonary reflexes and the chemoreflex. In: *Brazilian*

- Journal of Medical and Biological Research. 1997. p. 521–32.
65. Bormann J. Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. 1988;4(D).
 66. Simmonds MA. Multiple GABA receptors and associated regulatory sites. 1983;983(1978):3–5.
 67. Inenaga K, Mason WT. Acid modulates chloride channel activity in cultured primary bovine lactotrophs. 1987;23(2).
 68. Gage PW, Iv P. viewpoint Activation and modulation of neuronal K⁺ channels by GABA. 1992;(2):46–51.
 69. Weindl A, Bufler J, W B, Arzberger T, Hatt H. Neurotransmitters and receptors in the subfornical organ . Immunohistochemical and electrophysiological evidence. 1992;91.
 70. Weiss ML, Hatton GI. Collateral input to the paraventricular and supraoptic nuclei in rat. II. Afferents from the ventral lateral medulla and nucleus tractus solitarius. Brain Res Bull. 1990;25(4):561–7.
 71. Duan P, Kawano H, Masuko S. Collateral projections from the subfornical organ to the median preoptic nucleus and paraventricular hypothalamic nucleus in the rat. 2008;98:0–4.
 72. Menani JV, SAAD w. A, CAMARGO LAA, COVIAN MR. Effect of cholinergic and adrenergic stimulation of the subfornical organ on water intake. Pharmacol Biochem Behav. 1984;20:301–6.
 73. Gomez RE, Cannata A. Further evidence that a β -adrenergic mechanism regulates water intake: role of the subfornical organ. Eur J Pharmacol. 1986;126:69–73.
 74. Blessing WW, Sved AF, Reis DJ. Destruction of noradrenergic neurons in rabbit brainstem elevates plasma vasopressin, causing hypertension. Science (80-). 1982;217(4560):661–3.

75. Dahlström A, Fuxe K. Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in the cellbodies of brain stem neurons. *Acta Physiol Scand Suppl* [Internet]. 1964;18(1):SUPPL 232:1-55. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14229500> <http://link.springer.com/10.1007/BF00160582>
76. Tanaka J, Hayashi Y, Shimamune S, Nomura M. Ascending pathways from the nucleus of the solitary tract to the subfornical organ in the rat. *Brain Res*. 1997;777(1-2):237-41.
77. Hochstenbach SL, Susan L, Ciriello J. Effects of plasma hypernatremia on nucleus tractus solitarius neurons. 2019;
78. Ciriello J. Caudal ventrolateral medulla mediates baroreceptor afferent inputs to subfornical organ angiotensin II responsive neurons. *Brain Res* [Internet]. 2013;1491:127-35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.brainres.2012.10.064>
79. Tanaka J, Miyakubo H, Nomura S, Sakamaki K, Okumura T, Hayashi Y. GABAergic modulation of neurons in the nucleus of the solitary tract with ascending projections to the subfornical organ in the rat. *Brain Res*. 2001;888(1):184-8.
80. Tanaka J, Hayashi Y, Watai T, Hori K, Nomura M. Noradrenaline Release in the Rat Subfornical Organ Area to Blood Pressure Changes. 1998;306(152):303-6.
81. Krukoff TL, Calaresu FR, Mckitrick DJ, Biology C. protein in rat brain after electrical stimulation of the aortic depressor nerve. 1992;599:215-22.

ANEXOS

Anexo 1: Folha de aprovação da Comissão de Ética de Uso de Animais (CEUA – 2012).

	MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA	
Goiânia, 11 de junho de 2012.		
PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA/ENSINO PROTOCOLADO NA CEUA SOB O N°. 034/12		
I. IDENTIFICAÇÃO:		
1. <i>Título do projeto:</i> Vias e Mecanismos Neurais Envolvidos nos Ajustes Cardiovasculares, Autonômicos e Endócrinos Induzidos por Alterações do Compartimento Extracelular		
2. <i>Pesquisador Responsável:</i> Gustavo Rodrigues Pedrino		
3. <i>Unidade/Órgão:</i> Instituto de Ciências Biológicas/ICB-UFG		
4. <i>Pesquisadores Participantes:</i> Paulo César Ghedini; Daniel Alves Rosa; Diego Basile Colugnati.		
5. <i>Unidade onde será realizado:</i> Instituto de Ciências Biológicas/ICB-UFG		
6. <i>Data de apresentação do protocolo à CEUA:</i> 28/03/12		
7. <i>Data do Relatório:</i> 14/05/12		
8. <i>Data de Atendimento das Pendências:</i> 06/06/12		
II - Parecer da CEUA:		
Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, Aprova, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.		
O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.		
III - Informação aos pesquisadores:		
Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o <u>Relatório Final</u> baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de		
<i>Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA</i> Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215 Email: ceua.ufg@gmail.com		

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Experimentação Animal-CONSEA. O prazo para entrega do Relatório é de até 30 dias após o encerramento da pesquisa, prevista para conclusão em 29/12/2017.

IV - Data da reunião: 11/06/12

Dra. Ekaterina Akimovna Botivchenko Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Prof.ª Ekaterina Akimovna Botivchenko Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto de Física - Universidade Federal de Goiás

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia
(Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (51-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com

