



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

**O ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO NA MANUTENÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E
MODULAÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO RENAL DE RATOS
TRATADOS COM DIETA RICA EM SÓDIO NA FASE PÓS NATAL**

MELISSA TAVARES ALMEIDA

GOIÂNIA-GO

2019

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO 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 nº 9610/98, 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.

1. Identificação do material bibliográfico: **Dissertação** **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

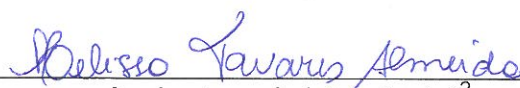
Nome completo do autor: Melissa Tavares Almeida

Título do trabalho: O ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO NA MANUTENÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E MODULAÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO RENAL DE RATOS TRATADOS COM DIETA RICA EM SÓDIO NA FASE PÓS NATAL

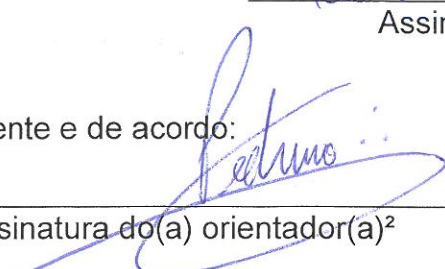
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 03 / 07 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados 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.

² A assinatura deve ser escaneada.

MELISSA TAVARES ALMEIDA

**O ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO NA MANUTENÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E
MODULAÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO RENAL DE RATOS
TRATADOS COM DIETA RICA EM SÓDIO NA FASE PÓS NATAL**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Fisiologia

Área de Concentração: Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino

Co-orientadora: Profa. Dra. Aline Andrade Mourão

GOIÂNIA-GO

2019

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

Almeida, Melissa Tavres

O ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO NA MANUTENÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E MODULAÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO RENAL DE RATOS TRATADOS COM DIETA RICA EM SÓDIO NA FASE PÓS NATAL [manuscrito] / Melissa Tavres Almeida. - 2019.

10, 73 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino; co-orientadora Dra. Aline Andrade Mourão.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Cidade de Goiás, 2019.

Bibliografia. Anexos.

Inclui siglas, fotografias, abreviaturas, símbolos, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Sobrecarga de sódio. 2. Doenças Cardiovasculares. 3. Atividade nervosa simpática renal. 4. Pressão arterial. 5. Estrógeno. I. Pedrino, Gustavo Rodrigues, orient. II. Título.

CDU 612.1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

1 **ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 12**

2 Aos vinte e oito dias do mês de junho do ano de dois mil e dezenove, às nove
3 horas e trinta minutos, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas IV da
4 Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca
5 examinadora: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino, Prof. Dr. Marcos Luiz
6 Ferreira Neto e Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes para, em sessão pública
7 presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa
8 de dissertação intitulada "O ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR
9 DO HIPOTÁLAMO NA MANUTENÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E MODULAÇÃO DO
10 TÔNUS SIMPÁTICO RENAL DE RATOS TRATADOS COM DIETA RICA EM SÓDIO
11 NA FASE PÓS NATAL", em nível de mestrado, de autoria de **Melissa Tavares**
12 **Almeida**, discente do Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências
13 Fisiológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo
14 presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a
15 seguir, foi concedida à autora da dissertação que, em cerca de 0,35
16 minutos, procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação,
17 cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de
18 diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da
19 dissertação. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1558 de 2017 do
20 Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o
21 Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a
22 dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este
23 requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas
24 pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da
25 entrega da versão definitiva da dissertação na secretaria do programa, com as
26 devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

27 contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta,
28 às 11:00 horas e 30 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para
29 constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da
30 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada,
31 será assinada por seus membros em três vias de igual teor.

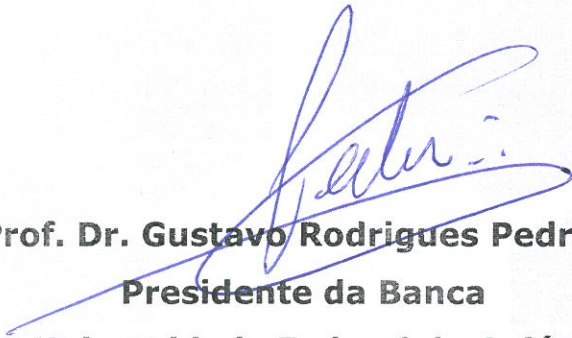
32

33

34

35

36


Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino
Presidente da Banca
Universidade Federal de Goiás

37

38

39

40

41

42


Prof. Dr. Marcos Luiz Ferreira Neto
Universidade Federal de Uberlândia

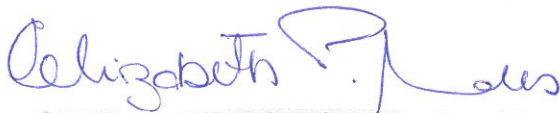
43

44

45

46

47


Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes
Universidade Federal de Goiás

48

MELISSA TAVARES ALMEIDA

**O ENVOLVIMENTO DO NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO
HIPOTÁLAMO NA MANUTENÇÃO DA PRESSÃO ARTERIAL E
MODULAÇÃO DO TÔNUS SIMPÁTICO RENAL DE RATOS
TRATADOS COM DIETA RICA EM SÓDIO NA FASE PÓS NATAL**

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Elizabeth Pereira Mendes
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Marcos Luiz Ferreira-Neto
Universidade Federal de Uberlândia.

Aprovada em: ____/____/____

Dedicatória

Dedico este trabalho, bem como toda a minha vida, à minha mãe, Valdeira Tavares Almeida (*in memoriam*). Tudo aqui escrito e desenvolvido ao longo de minha vida foi em seu nome. Lutar é viver e viver é seguir em frente.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente à minha família, sem a ajuda de cada um, desde a fagulha inicial, seria impossível sequer sonhar em concluir uma graduação, quiçá um mestrado. De particular interesse minha mãe, Valdeira, que apesar de há 8 anos não estar mais fisicamente comigo, sempre foi o motor que moveu esta máquina que é a vontade de buscar conhecimento em mim. Meus irmãos, Gabriel e Guilherme, que me mantiveram firme e inabalável, sempre tendo eles em mente em todos os meus propósitos. Foram oito anos difíceis, mas sempre tive o apoio de vocês. Sem o amor de vocês eu não seria nada.

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Gustavo, pela oportunidade, mesmo inexperiente e sem ter ainda a sua confiança, me aceitou em seu laboratório e sob sua orientação. Era a oportunidade que precisava naquele momento em minha vida e que me proporcionou grandes coisas. Agradeço a todos os membros do CPNFC, alunos e professores, que sempre me auxiliaram seja no conhecimento ou desenvolvimento acadêmico. Dentre estes gostaria de agradecer a minha co-orientadora Aline, que veio no final do meu mestrado como um sopro de ar fresco, e em poucos meses me moldou para que eu soubesse e obtivesse o entendimento do que é a ciência, a experimentação, como se ter organização, entre outras coisas tanto na vida profissional quanto pessoal. Aprendizado que todos temos que sair do mestrado carregando em nossa bagagem, e Aline você foi essencial para isso. Impulsionadora. Fez-me ver a academia com outros olhos que até então estavam cegados para entender a verdadeira beleza da ciência.

Agradeço também aos meus amigos do CPNFC, João, Kássia, Aryanne, Lara, Letícia, Florencia, meus “babuínos”, que me proporcionaram grandes momentos de risada, desabafo, apoio e sempre foi incrível como pudemos discutir das mais mirabolantes ideias até as mais plausíveis. A ajuda de vocês nesses últimos dois anos foi imprescindível para o que no final sempre precisei, acreditar em mim mesma. Ao Paulo, Isis, Isabela e Karla por sempre me ajudarem com inúmeras coisas, debater inúmeras ideias e dar excelentes conselhos.

Agradeço também as jóias raras que esse mestrado me trouxe. Desde o primeiro dia, o dia da prova, nós três, sem se conhecer, nos sentamos do lado de fora do “lab” e começamos a conversar sobre a prova. Eu era uma novata no

laboratório, inexperiente, inocente. E mal sabia eu que três pessoas que foram unidas por algo como o mestrado pudessem se unir tanto, se amar tanto. Laíla e Thais, vocês foram a minha rocha nesse mestrado. Ninguém nunca vai saber o sufoco que passamos, os momentos de tristeza e de alegria que passamos juntas, ou separadas, mas sempre conectadas. Nós três entramos com um propósito e sairemos cada um com o seu. Hoje me pego pensando em como cada uma de nós três trilhamos nosso caminho a partir desse final. É nostálgico pensar em quem éramos antes e quem somos agora. O final deste capítulo chegou. Faremos o que sempre fizemos, daremos as mãos e iremos respirar fundo. Mais um passo a frente.

Agradeço às pessoas aquém do laboratório que foram essenciais. Gostaria de agradecer especialmente à Rafaella, Izabella, Ilza e Carlos, minha família postiça, que me adotaram quando cheguei do Maranhão em Goiânia, que sempre me deram muito amor e carinho e sempre me fizeram sentir como se tivesse uma família, uma casa, um lar. Ao meu namorado Júnior que desde o momento que nos conhecemos, sempre colocou acima de tudo a minha busca por conhecimento, o meu trabalho, sempre se interessou e me apoiou, sempre teve paciência e melhor de tudo sempre buscou formas de fazer com que acreditasse em mim mesma.

Por fim, gostaria de agradecer aos meus amigos Amanda, Gilvana e Gustavo, que entre trancos e barrancos e 5 anos de amizade, a amizade mais improvável e inabalável, aconteceu. Indo embora eu sei no fundo do meu coração, que o que nós temos nunca irá se dissipar. Passamos por muitas coisas juntos e de certa forma crescemos juntos. Olho para vocês como parceiros e amigos de infância e estamos entrando na vida adulta “real oficial”, juntos. É incrível ver vocês crescerem e espero que sempre se orgulhem de mim da mesma forma que me orgulho de vocês. Amo vocês amigos. Vocês nunca deixarão de ser especiais.

Agradeço a FAPEG/CAPES, pela bolsa de estudos a mim ofertada, o que possibilitou a dedicação exclusiva ao mestrado, assim como o financiamento do laboratório juntamente com o CNPq.

À Universidade Federal de Goiás por prover um local para realização da pesquisa e pelo comprometimento em formação desde aluna até a pós-graduação.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VI
RESUMO.....	VII
ABSTRACT.....	X
Introdução	1
Homeostase dos fluidos corporais: osmossensibilidade e osmorregulação.....	3
Participação do PVN na regulação osmótica da ANS.....	7
Dieta rica em sódio nas fases iniciais e alterações cardiovasculares.....	10
O efeito protetor do estrógeno na hipertensão sensível ao sal.....	12
2. Objetivos	14
2.1. Objetivo Geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	14
3. Materiais e métodos	15
3.1 Animais experimentais.....	15
3.2 Dieta rica em sódio.....	15
3.3 Acompanhamento de Ingestão de ração, fluido, peso corporal e ciclo estral das fêmeas.....	15
3.4 Protocolo de restrição hídrica de 36h e repleção parcial (RH-RH) – Avaliação de apetite ao sódio.....	17
3.5 Nanoinjeções no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN).....	17
3.6 Registro da Atividade Nervosa Simpática Renal (ANSR).....	18
3.7 Confirmação histológica dos sítios de nanoinjeção no PVN.....	19
3.8 Análise estatística.....	19
4. Resultados	20

4.1. Acompanhamento de peso corporal e ingestão de fluido e ração.....	20
4.2. Avaliação de Ingestão Induzida de Sódio.....	22
4.3 Alterações Cardiovasculares Induzidas pela Inibição do PVN.....	24
4.4 Verificação histológica das Nanoinjeções no PVN.....	28
5. Discussão.....	29
6. Considerações finais.....	38
7. Referências.....	39
ANEXO.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- Ang II – Angiotensina II
- ANOVA – Análise de Variância
- ANP – Peptídeos Natriurético Atrial
- ANS – Atividade Nervosa Simpática
- ANSR – Atividade Nervosa Simpática Renal
- AT1 – Receptor 1 da Angiotensina II
- AT2 – Receptor 2 da Angiotensina II
- AV3V – Região Anteroventrolateal do Terceiro Ventrículo
- CEC – Compartimento Extracelular
- CEUA - Comissão de Ética do Uso de Animais
- CIC – Compartimento Intracelular
- CSF – Fluido Cerebroespinal
- CVLM – Região Caudovertebral do Bulbo
- DCVs – Doenças Cardiovasculares
- DNA – Ácido Desoxirribonucleico
- DR – Ratos Dahl Resistentes ao Sal
- DS – Ratos Dahl Sensíveis ao Sal
- ECA – Enzima Conversora de Angiotensina
- eNOS – Óxido Nítrico Sintase Endotelial
- EAA – Aminoácidos excitatórios
- EPM – Erro Padrão da Média
- E2 – Estrógeno
- ER- α – Receptor α do Estrogênio
- ER- β - Receptor β do Estrogênio
- FC – Frequência Cardíaca
- FCTRL – Fêmeas Controles
- FEC – Fluido Extracelular
- FEXP – Fêmeas Experimentais
- GABA – Ácido GamaAminobutírico
- GABA_AR – Receptor GABA_A
- GPR 30 – Proteína G – segundo mensageiro acoplada ao receptor de estrógeno da

membrana

HA – Hipertensão Arterial

HSS – Hipertensão Sensível ao Sódio

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IML – Coluna Intermédio Lateral da Medula Espinhal

MCTRL – Machos Controles

MEXP – Machos Experimentais

mosM – Miliosmol

mRen2.Lewis – Ratos transgênicos com genes de camundongo para superexpressão de renina

mRNA – RNA mensageiro

Na⁺ - Íon Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

nPBL – Núcleo Parabraqueal Lateral

NTS – Núcleo do Trato Solitário

OCVs – Órgãos Circumventriculares

OMS – Organização Mundial de Saúde

ON – Óxido Nítrico

OT – Ocitocina

OVLT – Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal

OVX – Ovariectomia

PA – Pressão Arterial

PAM – Pressão Arterial Média

PAP – Pressão Arterial Pulsátil

Pc – Peso corporal

PE – Polietileno

PI3-quinase – Fosfoinositol Trifosfato quinase

PVN – Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

PVNmM – PVN medial magnocelular

RH-RP – Protocolo de Restrição Hídrica e Repleção Parcial

RS – Resistente ao Sódio

RVLM – Região Rostroventrolateral do Bulbo

SFO – Órgão Subfornicial

SH – Solução Hipertônica

SHR – Ratos Espontaneamente Hipertensos

SNC – Sistema Nervoso Central

SON – Núcleo Suprótico

SRA – Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona

SS – Sensível ao Sódio

TGI – Trato Gastrointestinal

UFG – Universidade Federal de Goiás

UT-A1 – Transportador de uréia A1

V – Volt

VGLUT-2 – Transportador 2 de vesícula de glutamato

VP – Vasopressina

Δ – Variação ou Delta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Delineamento experimental da dieta rica em sódio.....	16
Figura 2. Esquema explicativo do ciclo estral e fotomicrografias representativas das fases do ciclo estral das fêmeas, no qual são observados os tipos de células características de cada fase. Aumento 20x.....	17
Figura 3. Delineamento experimental do protocolo de restrição hídrica e repleção parcial, realizado em gaiolas metabólicas após o período de recuperação, no qual foram coletados dados de ingestão de fluidos e ração, peso e volume urinário.....	18
Figura 4. Delineamento experimental do registro de pressão arterial média, frequência cardíaca e atividade nervosa simpática nervosa renal e nanoinjeções no núcleo paraventricular do hipotálamo, após o período de recuperação.....	18
Figura 5. Média \pm EPM do peso (A e D), ingestão média semanal de ração (B e E) e fluido (C e F) dos animais controle e experimental submetidos à sobrecarga de sódio por 30 dias, durante o tratamento e recuperação (barra preta). (A-C machos e D-F fêmeas) * Diferente do controle, $p < 0,05$	20
Figura 6. Média \pm EPM do volume ingerido e excretado (mL) dos grupos controles (A) e experimentais (B) de machos e fêmeas durante os três últimos dias de tratamento com NaCl (0,3M). \$ volume ingerido diferente do volume excretado; & volume excretado dos machos diferente do volume excretado das fêmeas experimentais, $p < 0,05$	22
Figura 7. Média \pm EPM média do peso (A), ingestão de ração (B), água (C), salina (D), volume urinário (E) e fluxo urinário (F). A faixa cinza representa o período de restrição hídrica. * diferente do controle, $p < 0,05$	23
Figura 8. Média \pm EPM média do peso (A), ingestão de ração (B), água (C), salina (D), volume urinário (E) e fluxo urinário (F). A faixa cinza representa o período de restrição hídrica.....	24
Figura 9. Traçado típico representativo das respostas de PAP (mmHg), FC (bpm), ANSR (u.a.) e a integral da ANSR (u.a.) após nanoinjeção bilateral de soro e muscimol no PVN dos animais do grupo controle.....	25
Figura 10. Traçado típico representativo das respostas de PAP (mmHg), FC (bpm), ANSR (u.a.) e a integral da ANSR (u.a.) após nanoinjeção bilateral de soro e muscimol no PVN dos animais do grupo experimental.....	25

Figura 11. Média \pm EPM das variações de pressão arterial média (A), frequência cardíaca (B) e atividade nervosa simpática (%) (C), dos grupos controle e experimental de machos e fêmeas, após nanoinjeção bilateral de muscimol (4mM) no PVN.* diferente da dos grupos controles, $p < 0,05$27

Figura 12. A) fotomicrografia representativa da seção coronal do PVN demonstrando o espalhamento do azul de Evans. B) regiões marcadas representam espalhamento dos sítios de nanoinjeções nos grupos.....28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Valores médios \pm EPM do Peso (g), Ingestão de Ração (g), Ingestão de NaCl (0,3M) ou água (mL) e volume urinário (mL) ao final do tratamento dos animais controle e dos animais experimentais.....	21
Tabela 2. Valores médios basais \pm EPM da PAM (mmHg), FC (bpm) e ANSR (volts) dos animais controles e animais experimentais.....	24
Tabela 3. Valores médios \pm EPM da diferença da PAM (mmHg), FC (bpm) e ANSR (%) dos animais controles e animais experimentais após a nanoinjeção bilateral de soro.....	26

RESUMO

O consumo elevado de sódio pode afetar a excitabilidade de neurônios de regiões responsáveis pelo controle da atividade nervosa simpática. Sabe-se que a atividade neuronal do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo encontra-se aumentada em diversos modelos de hipertensão arterial sensível ao sódio (HSS). Doenças que se desenvolvem na fase adulta estão relacionadas a determinadas exposições sofridas pelo indivíduo durante as fases iniciais da vida. No entanto, a literatura aponta diferenças entre machos e fêmeas na expressão da hipertensão tanto em modelos animais quanto em humanos, sendo que em fêmeas, o estrógeno por vezes apresenta um efeito cardioprotetor. No presente estudo, investigamos se alterações na dieta durante as fases pós-natais contribuem para alterações centrais no controle do tônus simpático renal em machos e fêmeas e, se estas persistem na fase adulta. Mais especificamente, avaliamos a contribuição do PVN no controle dos parâmetros cardiovasculares e de atividade nervosa simpática (ANS) após o tratamento com dieta rica em sódio por 30 dias em ratos e ratas adultos. Foram utilizados ratos e ratas da linhagem Wistar com 21 dias divididos em dois grupos: grupo controle, composto por machos (MCTRL) e fêmeas (FCTRL), mantidos com água; e grupo experimental, composto por machos (MEXP) e fêmeas (FEXP), mantidos com solução hipertônica de NaCl 0,3 M. Os animais de todos os grupos receberam ração e a solução hipertônica ou água *ad libitum* por 30 dias. Após o tratamento, os animais de todos os grupos foram mantidos com água e ração por 15 dias (período de recuperação). A ingestão diária de fluido (NaCl 0,3M ou água), ração e o peso corporal foram acompanhados durante os períodos de tratamento e recuperação. Ao final do tratamento, observou-se que os ratos tratados possuíam menor peso corporal em relação aos controles (MEXP (n=9): 115,3 ± 4,7 g vs. MCTRL (n=9): 168,0 ± 8,0 g, $p < 0,05$). Entretanto, tal diferença não foi observada entre os grupos de fêmeas experimentais e controles (FEXP (n=8): 119,5 ± 5,3 g vs. FCTRL (n=8): 134,1 ± 5,2 g). Observamos também que os animais experimentais ingeriram maior quantidade de fluido por grama de peso corporal (pc) em relação aos animais controles (MEXP (n=9): 0,7 ± 0,12 mL/g/pc vs. MCTRL (n=9): 0,2 ± 0,001 mL/g/pc; FEXP (n=8): 0,57 ± 0,06 mL/g/pc vs. FCTRL (n=8): 0,251 ± 0,01 mL/g/pc, $p < 0,05$) e observamos uma diminuição do volume excretado (V_{exc}) nas fêmeas experimentais comparado ao volume ingerido (V_{ing}) (FEXP (n=8): V_{ing} 89,6

$\pm 5,6$ mL vs. Vexc $56,8 \pm 5,2$ mL, $p < 0,05$). No período de recuperação não houve diferença na ingestão diária de água entre os grupos (MEXP (n=9): $0,203 \pm 0,008$ mL/g/pc vs. MCTRL (n=9): $0,171 \pm 0,005$ mL/g/pc; FEXP (n=8): $0,229 \pm 0,013$ mL/g/pc vs. FCTRL (n=8): $0,187 \pm 0,010$ mL/g/pc). Em outra série de experimentos, avaliamos a participação do PVN, para a manutenção do tônus simpático após o tratamento com dieta rica em sódio por 30 dias. Nanoinjeções bilaterais de 50 nL de muscimol (agonista GABA_A; 4mM) foram realizadas no PVN em animais dos grupos controle e experimental durante o registro de pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e ANS renal (ANSR). Vale ressaltar que nas fêmeas estes experimentos foram realizados no diestro do ciclo estral. Nos experimentos anestesiados, os machos do grupo tratado demonstraram valores elevados de PAM basal em relação tanto a seus pares do grupo controle, quanto aos grupos de fêmeas (PAM: MEXP (n=6): $108,2 \pm 2,9$ mmHg vs. MCTRL (n=6): $92 \pm 5,4$ mmHg vs. FEXP (n=6): $102,7 \pm 4,4$ mmHg vs. FCTRL (n=6): $90,8 \pm 1,8$ mmHg; $p < 0,05$). A inibição do PVN promoveu redução na PAM dos grupos experimentais quando comparados aos grupos controles: (Δ PAM: MEXP (n=6): $-14,9 \pm 1,5$ mmHg vs. MCTRL (n=6): $-7,2 \pm 0,7$ mmHg; FEXP (n=6): $-12,9 \pm 1,7$ mmHg vs. FCTRL (n=6): $-4,8 \pm 0,6$ mmHg $p < 0,05$). Por outro lado, não foram observadas diferenças nas respostas de FC dos grupos avaliados (Δ FC: MEXP (n=6): $-35,8 \pm 6,6$ bpm vs. MCTRL (n=6): $-21,6 \pm 2,9$ bpm; FEXP (n=6): $-27,8 \pm 3,5$ bpm vs. FCTRL (n=6): $-31,0 \pm 4,4$ bpm). Além disso, a inibição aguda do PVN promoveu simpatoinibição renal nos animais experimentais comparados aos controles (Δ %ANSR: MEXP (n=6): $-17,3 \pm 1,5$ % vs. MCTRL (n=6): $-6,8 \pm 1,0$ %; FEXP (n=6): $-18,1 \pm 0,5$ % vs. FCTRL (n=6): $-3,0 \pm 0,6$ %; $p < 0,05$). Os resultados demonstrados no presente estudo mostraram que a dieta hipersódica durante as fases iniciais da vida alterou a PAM basal dos machos experimentais. Adicionalmente, observamos que a inibição aguda do PVN promoveu alterações cardiovasculares e simpáticas nos ratos tratados com dieta rica em sódio em comparação ao grupo controle. Em conjunto, os resultados observados adicionam novas informações à literatura e sugerem que regiões de controle cardiovascular e simpático, como o PVN, podem estar mais envolvidas na modulação tônica da pressão arterial e ANSR, em resposta à sobrecarga de sódio na fase pós-natal de ratos normotensos. Por fim, nosso estudo aponta para a possibilidade de que o estrógeno tenha auxiliado na diminuição do efeito pressórico elevado promovido pelo aumento prolongado da ingestão de sódio, mas não foi

suficiente para prevenir o aumento da modulação no tônus simpático exercido pelo PVN. No entanto, estudos futuros são necessários para investigar vias e mecanismos envolvidos nessas respostas.

Palavras-Chave: Sobrecarga de sódio, Doenças Cardiovasculares, Atividade nervosa simpática renal, Pressão arterial, Ingestão de sódio, Estrógeno.

ABSTRACT

High sodium intake can affect the excitability of neurons in regions responsible for the control of sympathetic nervous activity. It is known that the neuronal activity of the hypothalamus paraventricular nucleus (PVN) is increased in several models of sodium-sensitive arterial hypertension (SSH). Diseases that develop in adulthood are related to certain exposures suffered by the individual during the early stages of life. However, the literature point out differences between males and females in the expression of hypertension in both animal and human models, and in females, estrogen sometimes has a cardioprotective effect. In the present study, we investigated whether changes in diet during the postnatal phases contribute to central alterations in the control of renal sympathetic tone in males and females, and whether they persist in adulthood. More specifically, we evaluated the contribution of the PVN in the control of cardiovascular parameters and sympathetic nervous activity (SNA) after treatment with a sodium-rich diet for 30 days in adult rats and rats. Twenty one days old wistar male and female rats were divided into two groups: control group, composed of males (MCTRL) and females (FCTRL), maintained with water; and experimental group, composed of males (MEXP) and females (FEXP), maintained with hypertonic solution of 0.3 M NaCl. Animals of all groups received chow and hypertonic solution or water *ad libitum* for 30 days. After treatment, the animals of all groups were maintained with water and chow for 15 days (recovery period). Daily food and fluid (0.3 M NaCl or water) intake and body weight were monitored during the treatment and recovery periods. At the end of treatment, the treated male rats were found to have lower body weight compared to controls (MEXP (n = 9): 115.3 ± 4.7 g vs. MCTRL (n = 9): 168.0 ± 8.0 g, $p < 0.05$). However, this difference was not observed between the experimental and control female groups (FEXP (n = 8): 119.5 ± 5.3 g vs. FCTRL (n = 8): 134.1 ± 5.2 g). We also observed that the experimental animals ingested a greater amount of fluid per gram of body weight (bw) than control animals MEXP (n=9): 0.717 ± 0.120 mL/g/bw vs. MCTRL (n=9): 0.209 ; FEXP (n=8): 0.576 ± 0.060 mL/g/bw vs. FCTRL (n=8): 0.251 ± 0.011 mL/g/bw, $p < 0.05$) and we observed a decrease in the excreted volume (V_{exc}) in experimental females compared to the ingested volume (V_{ing}) (FEXP (n=8): V_{ing} 89.6 ± 5.6 mL vs. V_{exc} 56.8 ± 5.2 mL, $p < 0.05$). In the recovery period there was no difference in daily water intake between groups (MEXP (n=9): 0.203 ± 0.008 mL/g/bw

vs. MCTRL (n=9): $0,171 \pm 0,005$ mL/g/bw; FEXP (n=8): $0,229 \pm 0,013$ mL/g/bw vs. FCTRL (n=8): $0,187 \pm 0,010$ mL/g/bw). In another set of experiments, we evaluated the participation of the PVN in the maintenance of sympathetic tonus after treatment with a high sodium diet for 30 days. Bilateral nanoinjections of 50 nL of muscimol (GABA_A agonist, 4 mM) were performed in the PVN in experimental and control animals during recording of mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and renal SNA (RSNA). It is noteworthy that in the females these experiments were performed in the diestrus of the estrous cycle. In the anaesthetized experiments, the males of the treated group showed higher values of baseline MAP compared to both control male group and to female groups (PAM: MEXP (n=6): 108.2 ± 2.9 mmHg vs. MCTRL (n=6): 92 ± 5.4 mmHg vs. FEXP (n=6): 102.7 ± 4.4 mmHg vs. FCTRL (n=6): 90.8 ± 1.8 mmHg, $p < 0.05$). Inhibition of the PVN promoted a reduction on MAP of experimental groups when compared to control groups: (Δ MAP: MEXP (n=6): -14.9 ± 1.5 mmHg vs. MCTRL (n=6): -7.2 ± 0.7 mmHg vs. FEXP (n=6): -12.9 ± 1.7 mmHg vs. FCTRL (n=6): -4.8 ± 0.6 mmHg, $p < 0.05$). On the other hand, no differences were observed in the HR responses of the evaluated groups (Δ HR: MEXP (n=6): -35.8 ± 6.6 bpm vs. MCTRL (n=6): -21.6 ± 2.9 bpm vs. FEXP (n=6): -27.8 ± 3.5 bpm vs. FCTRL (n=6): -31.0 ± 4.4 bpm). In addition, acute inhibition of PVN promoted renal sympathoinhibition in experimental animals compared to controls (Δ % ANSR: MEXP (n=6): $-17.3 \pm 1.5\%$ vs. MCTRL (n=6): $-6.8 \pm 1.0\%$ vs. FEXP (n=6): $-18.1 \pm 0.5\%$ vs. FCTRL (n=6): $-3.0 \pm 0.6\%$, $p < 0.05$). The results demonstrated in the present study showed that the hypersodiuc diet during the early stages of life altered baseline MAP of experimental males. Additionally, we observed that the acute inhibition of PVN promoted cardiovascular and sympathetic changes in rats treated with a high sodium diet in comparison to the control group. Taken together, the observed results add new information to the literature and suggest that cardiovascular and sympathetic control regions, such as the PVN, may be more involved in the tonic modulation of blood pressure and RSNA in response to sodium overload in the postnatal phase of normotensive rats. Finally, our study points to the possibility that estrogen may have helped decrease the high blood pressure promoted by prolonged increase in sodium intake, but it was not enough to prevent the increase in the modulation of the sympathetic tone exerted by the PVN. However, future studies are needed to investigate pathways and mechanisms involved in these responses.

Keywords: Sodium overload, Cardiovascular diseases, Renal sympathetic nervous activity, Blood pressure, Sodium intake, Estrogen.

1. Introdução

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as doenças cardiovasculares (DCVs) representam 31% no total do número de mortes globais, cerca de 17,5 milhões de pessoas (World Health Organization, 2017), e estão relacionadas principalmente às alterações no componente vascular e cardíaco. Um dos principais fatores de risco para as DCVs é a hipertensão arterial (HA) (Rapsomaniki *et al.*, 2014) sendo esta, caracterizada por um aumento da pressão arterial (PA), o que contribui significativamente para o agravamento das patologias relacionadas ao sistema cardiovascular (World Health Organization, 2013). Assim, a HA afeta diretamente a saúde de um bilhão de pessoas em escala mundial, contribuindo então para o aumento da mortalidade e morbidade total (NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC), 2016). Embora ainda não seja bem esclarecida a patogênese da hipertensão, sabe-se que distúrbios da homeostase hidromineral e ingestão elevada de sódio relacionam-se com esta patologia (Da Costa *et al.*, 1997; Ito, Gordon e Sved, 1999; Contreras *et al.*, 2000; Rodriguez-Iturbe e Vaziri, 2007; Gomes *et al.*, 2017).

Nesse sentido, diversos estudos têm buscado demonstrar que o consumo elevado de produtos industrializados e alimentos ricos em sódio desencadeia efeitos prejudiciais à saúde, como o aumento da PA (Vidonhoet *et al.*, 2004; He, Marrero e MacGregor, 2008; He e MacGregor, 2009; Moreira *et al.*, 2014). O estudo de Moubarac *et al.* (2013) demonstrou que logo na primeira infância, introduz-se uma dieta rica em alimentos industrializados, com elevados índices de sódio, em decorrência do baixo custo e grande oferta, tornando-os mais acessíveis a todas as classes sociais (Moubarac *et al.*, 2013). Outros trabalhos demonstram ainda que haja uma forte correlação entre uma dieta rica em sódio e o aumento da incidência das DCVs, classificando assim o consumo elevado de sódio como um fator de risco para o desenvolvimento, por exemplo, de HA sensível ao sódio (HSS) (Weinberger, 1996, 2006; He e MacGregor, 2009; Mendis, Puska e Norrving, 2011; Helm e Macdonald, 2015).

A sensibilidade ao sódio pode ser definida como alterações da PA, em relação às mudanças da ingestão dietética de sódio (Weinberger *et al.*, 1986), geralmente é observada em indivíduos que não conseguem efetivamente excretar o

sódio em excesso sem uma elevação pressórica (Strauss *et al.*, 1958; Guyton, 1991; Choi, Park e Ha, 2015). Evidências experimentais indicam que essa resposta pode variar dentre os indivíduos, podendo estes ser classificados como sensíveis ao sódio (SS), quando uma dieta rica em sódio leva um aumento de 10% dos níveis de PA, ou resistentes ao sódio (RS), no qual elevações da ingestão de sódio alimentar não levam a alterações pressóricas superiores a 10% nos indivíduos (Kawasaki *et al.*, 1978; Luft *et al.*, 1979; Weinberger *et al.*, 1986).

Além disso, estudos diversos demonstram que: i) a maioria da população normotensa é RS, com aproximadamente 30% pertencente ao grupo SS (Weinberger, 1996; He e MacGregor, 2009); ii) há uma maior incidência de indivíduos SS entre a população hipertensa, indicando assim que a maioria dos indivíduos SS são hipertensos (Weinberger, 1996; He and MacGregor, 2009); iii) há uma maior probabilidade de indivíduos SS desenvolverem HSS (Weinberger, 2002); iv) a incidência de indivíduos SS é influenciada ainda por inúmeros fatores como, por exemplo, origem étnica, idade, sexo e valores basais de PA (Luft *et al.*, 1979; Weinberger, 1996; He *et al.*, 2009), demonstrando assim uma heterogeneidade deste efeito.

Apesar da sensibilidade ao sódio ser um fenômeno bem estabelecido na HSS, tanto humana quanto em modelos experimentais, ainda não é bem esclarecido os mecanismos patofisiológicos, havendo uma complexidade multifatorial para a ocorrência desta patologia. De fato, diversos mecanismos já foram propostos estar envolvidos na patogênese da HSS (Oberleithner *et al.*, 2007; MacHnik *et al.*, 2009; S. *et al.*, 2011; Nishimoto e Fujita, 2014). Dentre esses mecanismos podemos citar: anormalidades no endotélio vascular, como alterações no sistema do óxido nítrico (ON) e eucosanoides (MacHnik *et al.*, 2009; Bragulat *et al.*, 2012; Choi, Park e Ha, 2015); disfunção renal, como por exemplo, alterações no sistema de transporte de sódio transmembrana, levando a retenção de água e sódio (Del Mar Lluch *et al.*, 1996; Choi, Park and Ha, 2015); desequilíbrio no sistema renina-angiotensina (SRA) (Osborn *et al.*, 2007; King *et al.*, 2008; Bragulat, Giner, *et al.*, 2012) e também o aumento da atividade nervosa simpática (ANS) (Huang, Amin e Leenen, 2006; Osborn e Fink, 2010), o que ocasionará num aumento da resistência vascular periférica.

Diversas linhas de evidência sustentam a participação de um componente neurogênico na HSS, pelos quais a ingestão de sal altera a regulação cardiovascular. Assim, tem-se a hipótese de que o aumento na ingestão diária de sódio leva a um aumento de diversos reflexos simpáticos, podendo ter uma influência na excitabilidade das redes simpatoexcitatórias (Mann *et al.*, 1980; Ito, Gordon e A. F. Sved, 1999; Muntzel *et al.*, 2007; Scrogin, Hatton e McCarron, 2017). Alterando assim, a excitabilidade das redes neurais de controle da PA, que podem predispor o indivíduo ao quadro hipertensivo.

Homeostase dos fluidos corporais: osmossensibilidade e osmorregulação.

O equilíbrio do meio interno é fundamental para a estabilidade e manutenção dos processos fisiológicos, havendo assim uma relação direta com a manutenção da osmolaridade corporal e concentrações iônicas dos meios intra e extracelulares (Strange, 2004; Pedersen, Kapus e Hoffmann, 2011). A osmolaridade refere-se ao número de partículas osmoticamente presentes em 1 quilograma de solvente ('IUPAC compendium of chemical terminology', 2013), sendo assim é definida como a concentração total efetiva de todas as substâncias ou solutos dissolvidos. A osmolaridade média dos fluidos corporais estão entre a faixa de ~290-300 miliosmois (mosM). Nestes fluidos corporais estão dissolvidos a maioria das biomoléculas orgânicas, que contribuem muito pouco para a osmolaridade, e também sais inorgânicos que estão presentes em grandes concentrações, principalmente o íon sódio (Na^+) que, conjuntamente com seus íons associados, é responsável por 90% da atividade osmótica plasmática (Evangelista *et al.*, 2014). É importante ressaltar que os fluidos corporais estão separados em dois compartimentos, o compartimento intracelular (CIC) e compartimento extracelular (CEC) e as principais alterações na osmolaridade ocorrem neste último. A composição de solutos do CIC e CEC são diferenciadas devido a membrana plasmática das células, que funciona como uma barreira, permitindo a troca de água, porém, impedindo a passagem de íons, confinando assim, o Na^+ bem como outros íons, ao CEC. Quando a água, por osmose e transporte facilitado, se move entre estes compartimentos, ela vai de uma região de baixa osmolaridade, para um local de alta osmolaridade, criando assim um gradiente osmótico (Strange, 2004; Cannon, 2017).

O sal proveniente da alimentação é absorvido pelo trato gastrointestinal (TGI) e o íon Na^+ entra no plasma sanguíneo. Em seguida ocorre uma distribuição uniforme deste íon em todo CEC, resultando em um aumento generalizado da osmolaridade. Conseqüentemente, a água se move do local hiposmótico para o local hiperosmótico e este processo de osmose ocorre até ser atingido um equilíbrio (Bourque, 2008). Entretanto, estudos demonstraram que a hiperosmolaridade do CEC, promovida pela ingestão de sódio, pode desencadear respostas comportamentais e neuro-humorais (Dunn *et al.*, 1973; McKinley, Denton e Weisinger, 1978; Silk *et al.*, 2003; Thrasher *et al.*, 2017; Zerbe e Robertson, 2017), como a sensação de sede, para aumentar a ingestão de água e diluir o sódio, diminuição do apetite ao sódio (Weisinger, Denton and McKinley, 1983; Blackburn *et al.*, 1993, 1995) e a liberação do hormônio vasopressina (VP), para aumentar a reabsorção de água pelos rins, através do tráfego de aquoporinas para a membrana luminal das células principais dos túbulos renais, onde ocorre difusão de água até que seja reestabelecido o gradiente (Fenton, 2009; Stockand, 2010).

Por outro lado, aumentos agudos na osmolaridade plasmática, induzidos por infusão de soluções hipertônicas na artéria carótida, por exemplo, promovem o aumento da taxa de natriurese (Blaine *et al.*, 1975; Emmeluth *et al.*, 1996; Passo, Thornborough e Rothballer, 2011; McKinley *et al.*, 2017). A natriurese ocorre devido a promoção de respostas renais, autonômicas (Morita *et al.*, 1993; Weiss *et al.*, 1996; Nishida *et al.*, 1998; May, McAllen e McKinley, 2000) e humorais (Pettersson *et al.*, 1986; Morris e Alexander, 1989; Rauch *et al.*, 1990; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004; Blanch *et al.*, 2013). Estas respostas resultam em aumentos na PA (Colombari *et al.*, 2000; Pedrino, Monaco e Cravo, 2009; Toney e Stocker, 2010) e vasodilatação renal (Fujita *et al.*, 1991; Colombari e Cravo, 1999; Colombari *et al.*, 2000; Pedrino, Monaco e Cravo, 2009) a fim de restabelecer as condições normovolêmicas.

A detecção das variações de osmolaridade é realizada por osmorreceptores localizados periféricamente e centralmente (Bourque, Oliet e Richard, 1994; Johnson e Thunhorst, 1997; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). Os osmorreceptores periféricos estão localizados no TGI superior como a orofaringe (Kuramochi e Kobayashi, 2000), o TGI em si (Dooley and Valenzuela, 1984; Andersen *et al.*, 2017; Carlson, Beitz e Osborn, 2017), e nos vasos que irrigam o fígado, rins e glândulas adrenais

(Zhang e Bourque, 2003). Quando ativados, estes receptores se comunicam através dos nervos vago e esplâncnico (Vallet e Baertschi, 1982) com o sistema nervoso central (SNC), induzindo respostas antecipatórias de sede e liberação de VP a fim de diminuir as alterações homeostáticas causadas pela ingestão de sódio antes mesmo destas promoverem alterações na osmolaridade plasmática (Niijima, 1969; Adachi, 1984; Kobashi e Adachi, 1993; Osaka, Kobayashi e Inoue, 2002; Stricker e Hoffmann, 2007; Baertschi e Pence, 2017; Huang, Sved e Stricker, 2017).

Centralmente, alterações na osmolaridade plasmática são percebidas por regiões desprovidas de barreira hematoencefálica denominadas órgãos circumventriculares (OCVs) devido sua localização próxima aos ventrículos cerebrais (Bourque *et al.*, 2007; Bourque, 2008). Dentre estes se destacam os neurônios localizados no órgão subfornicial (SFO) e no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), que enviam projeções para regiões específicas do SNC, responsáveis pelo controle autonômico homeostático da PA e do equilíbrio hidroeletrólítico (Westerhaus e Loewy, 1999; McKinley *et al.*, 2001; Cottrell e Ferguson, 2004).

Evidências na literatura demonstram que os neurônios existentes nos OCVs, direta ou indiretamente respondem a aumentos agudos na osmolaridade onde a diminuição do volume celular abre canais de cátions não-seletivos inativados por estiramento (Bourque, Voisin e Chakfe, 2002; Zhang e Bourque, 2003; Ciura, 2006; Naeini *et al.*, 2006), isso provoca uma despolarização celular, aumentando a excitabilidade destes neurônios e frequência de disparo dos potenciais de ação. Quando detectadas estas alterações de osmolaridade no CEC, desencadeiam-se ajustes comportamentais e neurovegetativos para restabelecer a composição e/ou volume do CEC, como descrito anteriormente (Fitzsimons, 1978; Skøtt, 2003; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004).

Os osmorreceptores centrais são responsáveis pelo controle osmótico agudo da sede (Stricker e Sved, 2000; McKinley e Johnson, 2004) e secreção de VP, através de projeções monossinápticas para os neurônios magnocelulares do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo (Camacho e Phillips, 1981; Bourque, Olié e Richard, 1994; Oldfield *et al.*, 1994; McKinley *et al.*, 2001) e para o núcleo pré-óptico mediano (MnPO) (Stocker e Toney, 2005). Convergentemente, os grupamentos bulbares A1 e A2 se projetam monossinápticamente para o PVN (Sawchenko e Swanson, 1982) e transmitem informação sobre volume sanguíneo e

pressão sanguínea. Além disso, a ativação destes osmorreceptores pode desencadear alterações na PA e ANS através destes circuitos integrados (Morita *et al.*, 1993; Toney *et al.*, 2003; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004; Shi, Stocker e Toney, 2007; Bourque, 2008; Toney e Stocker, 2010; Blanch *et al.*, 2013). Os neurônios pré-motores simpáticos no PVN recebem aferências excitatórias dos OCVs presentes no prosencéfalo (Miselis, 1981; Shi, Stocker e Toney, 2007) e se projetam para centros excitatórios do bulbo e medula espinal que comandam a ANS (Swanson e Sawchenko, 1980; Chen and Toney, 2003). Assim, quando o PVN é ativado este é capaz de influenciar o tônus simpático (Kannan, Hayashida e Yamashita, 1989; Cato, 2004; Antunes *et al.*, 2006; Freeman e Brooks, 2006; Zhong *et al.*, 2008; Chen e Toney, 2017).

Um aumento na ingestão de sódio pode promover elevação de 1-2% na osmolaridade plasmática (Fang *et al.*, 2000; Habecker *et al.*, 2003; Simon, 2003) que são suficientes para ativar os osmorreceptores centrais. Diversos estudos demonstram que aumentos agudos na concentração de sódio plasmático e do fluido cerebroespinal (CSF) (Fitzsimons, 1980; Toney *et al.*, 2003) desencadeiam mecanismos neurais específicos que envolvem a diminuição da ANS para o território renal, a fim de promover vasodilatação renal (Shen, Graham e Vatner, 1991; Pedrino *et al.*, 2008; Pedrino, Monaco e Cravo, 2009). Já aumentos na osmolaridade induzidos por desidratação (Hall e Blass, 1975; Brooks, Freeman e O'Donoghay, 2004), desencadeiam mecanismos centrais que promovem o aumento da ANS para outros territórios, como torácico, esplâncnico e lombar, para a manutenção do tônus simpático e PA (Shi, Stocker e Toney, 2007; Holbein e Toney, 2015).

Cabe ressaltar que, inicialmente, a resposta simpatoinibitória específica para o leito renal acoplada à hipernatremia induzida pela ingestão de sódio, é dependente da integridade de diversas áreas do SNC, como o a região antero-ventrolateral do terceiro ventrículo (AV3V) (Wakitani *et al.*, 1985; Pedrino *et al.*, 2005; Colombari *et al.*, 2017), grupamentos noradrenérgicos A1 e A2 da região caudoventrolateral do bulbo (CVLM) e núcleo do trato solitário (NTS) (Pedrino *et al.*, 2008, 2012; da Silva *et al.*, 2013) e dos aferentes periféricos, como os baro e os quimiorreceptores (Pedrino, Monaco e Cravo, 2009; N.O. *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015; Pedrino *et al.*, 2016). Propõe-se então, que a ativação de osmorreceptores periféricos e talvez de neurônios simpatoinibitórios de baixo limiar de osmossensibilidade, promove uma

redução da descarga tônica para os nervos renais, o que leva a vasodilatação renal e consequente excreção de sódio (Toney *et al.*, 2003).

Contudo, Toney *et al.* (2003) propuseram ainda que, caso a osmolaridade aumente para níveis críticos ou por longos períodos e essa simpatoinibição não é adequada para promover natriurese e por fim restabelecer o equilíbrio hidroeletrólítico, regiões específicas do SNC são recrutadas a fim de promover simpatoexcitação (Toney *et al.*, 2003). Outros trabalhos na literatura evidenciam que este aumento da ANS tem como alvo os rins, bem como outros órgãos, onde promove um aumento na PA, aumento da perfusão renal e natriurese efetiva (Weiss *et al.*, 1996; Scrogin, Grygielko e Brooks, 2017). De fato, estudos pioneiros demonstraram que mudanças prolongadas na osmolaridade podem contribuir para a manutenção à longo prazo do tônus simpático aumentado (Fitzsimons, 1980; Verbalis, Baldwin e Robinson, 1986).

Do que até aqui exposto, podemos observar que o aumento da ingestão diária de sódio, pode levar à hiperosmolaridade central e, conseqüentemente, à ativação dos osmorreceptores centrais (OCVs), podendo então, desencadear em aumento de diversos reflexos simpáticos, apresentando assim forte influência nas conexões simpatoexcitatórias do SNC.

Participação do PVN na homeostase cardiovascular

Anatomicamente, o PVN é uma região hipotalâmica bilateral que se estende de forma rostrocaudal ao terceiro ventrículo e é o componente mais dorsal do complexo nuclear talâmico medial intralaminar (Paxinos e Watson, 2007). O PVN possui um papel essencial nas funções neuroendócrinas e autonômicas, inclusive o controle da atividade do eixo hipófise-córtex adrenal em resposta ao estresse, reflexo de ejeção do leite, secreção de hormônios tireoidianos, homeostase corporal, ingestão de alimentos e síntese de melatonina hipofisária. Este núcleo participa também no controle da função cardíaca, através do controle do reflexo cardíaco aferente (Zhong *et al.*, 2008) e regulação do volume sanguíneo (Cui, Coderre e Renaud, 2001).

O PVN pode ser dividido em duas regiões funcionais: a região magnocelular, que se relaciona com a hipófise posterior e possui função neuroendócrina, onde promove a secreção dos hormônios ocitocina (OT) e VP (Swanson, Sawchenko e

Lind, 1986; Pyner, 2009), e a região parvocelular, a qual possui neurônios geradores da ANS que se projetam diretamente para os neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na coluna intermédio lateral da medula espinal (IML) e ainda, para os neurônios pré-motores simpáticos presentes na região rostroventrolateral do bulbo (RVLM) (Swanson e Kuypers, 1980; Loewy, 1981; Sawchenko e Swanson, 1983; Lovick, Malpas e Mahony, 1993; Shafton, Ryan e Badoer, 1998; Pyner e Coote, 2000).

Os neurônios do PVN se conectam extensivamente com uma variedade de neurônios, sendo estes, hipotalâmicos, do tronco encefálico, das regiões límbicas e do córtex pré-frontal (Swanson e Kuypers, 1980; Swanson e Sawchenko, 1980; Sawchenko e Swanson, 1983). Assim, do PVN emergem pelo menos 4 projeções que podem contribuir para a simpatoexcitação seguida à ativação desse núcleo: i) projeção direta do PVN para o corno dorsal da IML, os neurônios pré-ganglionares da medula espinal (Loewy, 1981; Coote *et al.*, 1998); ii) projeções para o núcleo do trato solitário (NTS), que suprimem a atividade dos neurônios ativados por aumento da PA (Duan, Kopin e Goldstein, 1999); iii) projeção para o núcleo parabraqueallateral (nPBL), que por sua vez ativa a RVLM (Coote, 2007); iv) projeção excitatória direta para a RVLM (Stocker *et al.*, 2006). Adicionalmente, estudos demonstraram que estimulação farmacológica do PVN resulta em rápidos aumentos de frequência cardíaca (FC), PA e ANS para o leito renal (Kannan, Hayashida e Yamashita, 1989; Martin, Segura e Haywood, 1991; Martin e Haywood, 1993; Duan *et al.*, 1997; Kawabe *et al.*, 2009).

O PVN em conjunto com os OCVs possui importante papel na organização de respostas ao desbalanço osmótico (Swanson, Sawchenko e Lind, 1986; Kiss, 1988; Badoer, 2001; Coote, 2007; Pyner, 2009; Barrett-Jolley *et al.*, 2011). De fato, experimentos nos quais solução de salina hipertônica (SH) foi nanoinjetada no hipotálamo, observou-se uma resposta pressórica aumentada (Toney *et al.*, 2003; Qiu *et al.*, 2004; Bourque, 2008; Chu, Kannan e Qiu, 2010). Por outro lado, a infusão intracarotídea de solução hipotônica em ratos desidratados levou a uma diminuição de ANS lombar (ANSL) e PA e elevação de FC (Brooks, Qi and O'Donoghuy, 2005). Outros estudos *ex vivo* revelaram ainda que soluções hipotônicas reduzem a frequência de disparo dos neurônios magnocelulares (Bourque, Oliet e Richard, 1994) e parvocelulares do PVN (Feetham *et al.*, 2015; Feetham, Nunn and Barrett-

Jolley, 2015). Demonstrando assim, em conjunto com outros estudos (Toney *et al.*, 2003; Stocker *et al.*, 2006), que estes mecanismos de controle autonômico, possuem como finalidade manutenção da homeostase cardiovascular frente à desidratação.

Experimentalmente, a participação dos receptores de angiotensina II (Ang II) na excitação do PVN vem sendo demonstrada ao longo dos anos por alguns importantes grupos de pesquisa (Li, 2005; Freeman e Brooks, 2006; Osborn e Fink, 2010; Gabor e Leenen, 2012; Holbein e Toney, 2015; Ferguson, Washburn e Latchford, 2017; Holbein *et al.*, 2017). Em um desses estudos foi revelado que a simpatoexcitação renal causada pela infusão intracarotídea de salina hipertônica, é atenuada com o bloqueio do receptor de Ang II do tipo 1 (AT1), através da nanoinjeção de Losartan no PVN (Chen e Toney, 2001). A Ang II também excita a maioria dos neurônios do PVN que se projetam para o RVLM (Cato, 2004), indicando que o sinal osmoticamente induzido pela Ang II no PVN pode sensibilizar os neurônios da RVLM. Além disso, a ativação não específica do PVN estimula os neurônios vasomotores, via liberação de glutamato (Yang, Bertram e Coote, 2001). Indicando assim que glutamato e Ang II são neurotransmissores importantes na osmorregulação. O PVN é mantido tonicamente inativo através da atividade de neurônios GABAérgicos que o circundam (Martin and Haywood, 1993). De fato, experimentos em ratos anestesiados demonstraram que a nanoinjeção de muscimol, um agonista do receptor de ácido gama-aminobutírico do tipo A (GABA_AR) no PVN, levou a uma redução da PA, FC e ANSR de forma dose dependente (Adams *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2009; Holbein and Toney, 2015; Holbein *et al.*, 2017; Mendonça *et al.*, 2018). Respostas semelhantes são observadas com inibição aguda de outros núcleos envolvidos na osmorregulação, como o MnPO (Amaral *et al.*, 2014; Mourão *et al.*, 2016) e OVLT (Shi, Stocker e Toney, 2007), indicando que a manutenção destas respostas depende da integridade destes circuitos.

De particular interesse no presente trabalho, estudos demonstram que atividade neuronal do PVN se encontra elevada em diversos modelos de HSS (Li *et al.*, 2017), através de mecanismos sinápticos, incluindo a perda da inibição pelo GABA (Martin e Haywood, 1998) e aumento da modulação excitatória exercida por vias glutamatérgicas e angiotensinérgicas (Gabor e Leenen, 2012). Demonstrando este ser um núcleo chave de estudo para desvendar como a ativação crônica do

sistema central de controle da homeostase cardiovascular, mediada por uma dieta rica em sódio poderia contribuir para a manutenção da ANS exagerada em modelos de HSS.

Dieta rica em sódio nas fases iniciais e alterações cardiovasculares

Estudos sugerem que doenças que se desenvolvem na fase adulta estão relacionadas a determinadas exposições sofridas pelo indivíduo durante as fases, pré-natal, pós-natal e adolescência (Law *et al.*, 1991) sendo a exposição a quantidades elevadas de sódio nas fases iniciais da vida um modelo adicional de estudo. Vidonho *et al.* (2004) demonstraram que a prole adulta de mães tratadas com dieta rica em sódio durante a gravidez e lactação, possuem alterações à longo prazo na PA, sensibilidade a insulina, e aumento de lipídios plasmáticos (Vidonho *et al.*, 2004).

Sabe-se então que a dieta maternal durante o período perinatal possui um papel chave na programação da hipertensão na prole adulta (Vehaskari, Aviles e Manning, 2001), assim como a restrição de proteínas específicas (Bédard *et al.*, 2005), ou restrição de nutrientes. Outros fatores como restrição hídrica (Lisle *et al.*, 2003), deficiência de ferro (Woods *et al.*, 2001), ingestão elevada de gordura e sódio (Khan *et al.*, 2003; Vidonho *et al.*, 2004; Ross *et al.*, 2005), durante o período perinatal também podem ser associados com o desenvolvimento de hipertensão na prole adulta.

Apesar de muitos estudos demonstrarem a importância das fases iniciais da vida no desenvolvimento da HA na fase adulta, poucos são os estudos que avaliam como intervenções, principalmente relacionadas ao sódio, nas fases pós-natais contribuem para o desenvolvimento dessa patofisiologia, ou até mesmo alterações no sistema cardiovascular (Fang *et al.*, 2001; Ufnal *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2017). Estudo realizado por Moreira *et al.* evidenciou como a introdução de dieta rica em sódio (0,3M NaCl) durante 60 dias após o desmame, poderia contribuir para a patogênese da hipertensão (Moreira *et al.*, 2014), provocando um aumento da pressão arterial média (PAM), FC e diminuição da sensibilidade barorreflexa, nos animais adultos. Nesse sentido, é de grande relevância o estudo de como intervenções no período pós-natal e pós-desmame podem influenciar os parâmetros cardiovasculares e autonômicos e a partir de que

ponto o consumo excessivo de sódio neste período poderia se tornar um preditor para o desenvolvimento de DCVs e/ou contribuir para a HSS.

Embora muitos estudos tenham observado alterações no sistema cardiovascular, tanto na prole de mães submetidas à dieta rica em sódio durante gestação e amamentação, quanto no período pós-natal, tais achados não são suportados de forma consistente (Fang *et al.*, 2001; Porter, King e Honeycutt, 2007; Bibeau *et al.*, 2011; Ramos *et al.*, 2012; Gray *et al.*, 2013; Mizuno *et al.*, 2013; Maruyama *et al.*, 2015; Pitynski, Flynn e Skinner, 2015). Por exemplo, um estudo realizado por Porter *et al.* (2007) não observou aumento da PA dentre a prole adulta de mães supridas com uma dieta hipersódica (8% NaCl) durante a gravidez. Contudo, neste mesmo estudo foi observado um aumento da PA e sensibilidade da FC em resposta ao estresse na prole feminina (Porter, King and Honeycutt, 2007). Estas alterações cardiovasculares foram acompanhadas por um aumento na expressão de mRNA do hormônio liberador de corticotrofina no PVN. Sugerindo assim que os efeitos da ingestão materna de sódio, na saúde cardiovascular da prole adulta, podem ser influenciados pelo sexo.

Alguns estudos também já demonstraram que a ingestão materna de sódio está realmente associada a alterações sexo-específicas na responsividade do SRA na prole adulta (Ramos *et al.*, 2012), e que pode ocorrer hipertensão sexo específica nos machos, devido a alterações no desenvolvimento fetal do cérebro e intestino (Gray *et al.*, 2013). Já em modelos de restrição de crescimento intrauterino (Bibeau *et al.*, 2011), frente a uma dieta hipersódica, observa-se na prole diferenças entre machos e fêmeas, com maior expressão observada nos machos, na expressão dos receptores periféricos AT1 e AT2 de Ang II e de citocromo P450 da aldosterona sintase, uma enzima necessária para a produção de aldosterona na zona glomerulosa do córtex adrenal após ligação de Ang II com o receptor AT1 (Bassett, White and Rainey, 2004). Frente às evidências, os fatores que contribuem para resultados divergentes em relação aos efeitos da ingestão exagerada de sódio no sistema cardiovascular, são quantidade de sódio da dieta, duração da exposição dietética específica e gênero da prole.

Importantes estudos de modelos que se correlacionam uma dieta rica em sódio e hipertensão ou aumento da ANS são utilizados para avaliar o efeito do sódio sobre parâmetros cardiovasculares e ANS, como animais Dahl sensíveis ao sódio

(DS) (modelo genético), tratamento com mineralocorticoides associados a uma dieta elevada de sódio, ou infusão de Ang II associada à dieta rica em sódio (O'Donoghuy e Brooks, 2006; O'Donoghuy, Qi e Brooks, 2006; Osborn *et al.*, 2007; Osborn e Fink, 2010). Contudo, ainda são escassos os estudos que correlacionam uma dieta rica em sódio na fase pós-natal e possíveis alterações na ANS ou nos componentes simpatoexcitatórios do sistema central de controle osmótico, como o PVN.

O efeito protetor do estrógeno na hipertensão sensível ao sal.

A sensibilidade ao sal da PA aumenta o risco de hipertensão e DCVs. A prevalência da sensibilidade ao sal é maior em mulheres que estão na menopausa, seja ela natural ou cirúrgica (Schulman e Raji, 2006; Schulman *et al.*, 2006), sugerindo que a susceptibilidade ao desenvolvimento de HSS está diretamente ligada à ausência de hormônios sexuais femininos (Schulman *et al.*, 2006). Tais evidências são demonstradas em modelos experimentais de HSS, onde a ovariectomia (OVX) aumenta a resposta da PA ao sódio em diversos modelos, como; i) em ratos DS e resistentes ao sal (DR) (Maric, Sandberg e Hinojosa-Laborde, 2004; Maric *et al.*, 2008); ii) ratos mRen2.Lewis, uma cepa transgênica com superexpressão de renina (Chappell, Yamaleyeva e Westwood, 2006); iii) ratos DS numa dieta hipossódica (Harrison-Bernard, Schulman e Raji, 2003; Hinojosa-Laborde *et al.*, 2004); iv) ratos do modelo hipertensivo desoxicorticoesterona (DOCA)-sal (Crofton, Share e Brooks, 1989). Estes estudos evidenciam que o efeito hipertensor da OVX esteja ligado a perda do estrógeno, já que a reposição deste, com 17 β -estradiol, previne estes efeitos. Sugerindo então que os hormônios ovarianos são essenciais no balanço do sódio e regulação da PA.

Diferenças entre machos e fêmeas na expressão da HA e consequente lesão de órgãos, são observadas em modelos experimentais e em humanos (Reckelhoff, 2001; Foy *et al.*, 2018), sendo que os machos exibem um desenvolvimento mais acelerado de DCVs em relação às fêmeas. Estudos epidemiológicos demonstram ainda, que há uma incidência reduzida de DCVs em mulheres e animais experimentais pré-menopausa (Barrett-Connor, 1997; Hayward, Kelly e Collins, 2000; Sowers e Lester, 2000; Crabbe *et al.*, 2003; Pechère-Bertschi e Burnier, 2004). Este efeito cardioprotetor do estrógeno muitas vezes pode ser atribuído ao melhoramento do perfil lipídico e função endotelial, modulados pela presença do estrógeno (Mendelsohn e Karas, 1999).

Podemos observar ainda dimorfismo sexual em ratos com hipertensão neurogênica essencial (ratos espontaneamente hipertensos, SHR), onde os machos desenvolvem hipertensão de forma mais rápida comparado com as fêmeas (Dahl, 2004), e também com fêmeas SHR que parecem possuir menor sensibilidade ao desenvolvimento de HSS (Blizard *et al.*, 1991). Apesar dos modelos de HSS citados anteriormente evidenciarem o efeito cardioprotetor do estrógeno, a literatura aponta diferenças quanto ao estágio de vida em que as fêmeas são expostas a determinada intervenção e os possíveis reflexos sob os parâmetros cardiovasculares (Fang *et al.*, 2001; Brinson, Rafikova e Sullivan, 2014). Em estudo realizado comparando a influência da depleção de estrógeno sobre a pressão em fêmeas SHR e DS, submetidas à dieta rica em sódio, a OVX não promoveu aumentos na PA nas fêmeas SHR, indicando que estas teriam menor sensibilidade ao sal em relação a fêmeas DS (Brinson, Rafikova e Sullivan, 2014). Entretanto, quando a OVX é realizada antes da maturação sexual (3 semanas) em fêmeas SHR submetidas a uma dieta rica em sódio, resulta num aumento da PA (Fang *et al.*, 2001). Por outro lado, neste mesmo estudo, fêmeas SHR que não foram submetidas ao procedimento cirúrgico, apresentaram também um aumento da PA, quando a dieta rica em sódio foi iniciada com 3 semanas de idade (Fang *et al.*, 2001).

Em conjunto, os resultados citados anteriormente, sugerem que o período em que a OVX é realizada e a idade em que se inicia a dieta rica em sódio são determinantes críticos do impacto do sódio sobre a PA em fêmeas SHR. Sendo importante então estudar como a introdução de uma dieta rica em sódio na fase pré-natal, antes da maturação sexual, poderia influenciar neste efeito cardioprotetor do estrógeno sobre a PA e se este efeito se estende a possíveis alterações no tônus simpático.

Diante do que até aqui exposto, é lícito supor que uma dieta rica em sódio nas fases iniciais do período pós-natal poderia alterar parâmetros cardiovasculares e autonômicos simpáticos em machos e fêmeas na fase adulta. Assim, no presente estudo buscamos então avaliar os possíveis efeitos de uma dieta rica em sódio (0,3M, NaCl), no período pós-natal e pós desmame, por 30 dias sobre os parâmetros comportamentais, cardiovasculares e simpáticos bem como a contribuição do PVN para estas respostas em machos e fêmeas normotensos.

2. Objetivos

2.1. Objetivo Geral

O presente estudo buscou avaliar a participação do núcleo paraventricular (PVN) do hipotálamo sobre as respostas cardiovasculares e simpáticas em ratos machos e fêmeas normotensas, que foram submetidos ao protocolo de dieta hipersódica, no período pós-natal e pós-desmame.

2.2. Objetivos específicos

2.2.1. Avaliar os efeitos de uma dieta rica em sódio durante 30 dias, pós-natal e pós-desmame, no padrão de ingestão de fluidos (água e salina hipertônica) e ração, bem como ingestão induzida de sódio de ratos machos e fêmeas, não anestesiados;

2.2.2. Avaliar o efeito da inibição do núcleo Paraventricular do Hipotálamo sobre a pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e atividade nervosa simpática renal (ANSR) em ratos e ratas anestesiados que foram tratados com 0,3M NaCl (Grupo Experimental) ou água (Grupo Controle) durante 30 dias no período pós-natal.

3. Materiais e métodos

3.1 Animais experimentais

Todos os experimentos foram realizados em animais machos e fêmeas da linhagem Wistar de 21 dias (35-42g de peso corporal). O experimento de sobrecarga de sódio foi realizado em ratos fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais foram mantidos em salas climatizadas (temperatura 22-24 °C) com acesso *ad libitum* à ração (0,4% ou 0,067 mM NaCl; AIM-93; 148). Todos os protocolos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) da UFG, número de protocolo 023/2015.

3.2 Dieta rica em sódio

Para realizar o protocolo de sobrecarga de sódio, adicionamos à água dos animais experimentais NaCl (0,3 M; Synth, Diadema, SP, Brasil, 0,615 osmol/L). Aos animais pertencentes ao grupo controle foi ofertado água filtrada. A dieta se iniciou do 21º dia, após o desmame dos animais, e seguiu um período de 30 dias, no qual se encerrou o tratamento. Após este período, estabeleceu-se um período de recuperação de 15 dias no qual foi ofertada uma dieta normosódica (ração e água) para todos os grupos. Após o protocolo de dieta rica em sódio realizaram-se experimentos pós-tratamento em todos os animais dos grupos, durante um período de 10 dias como pode ser observado na Figura 1.

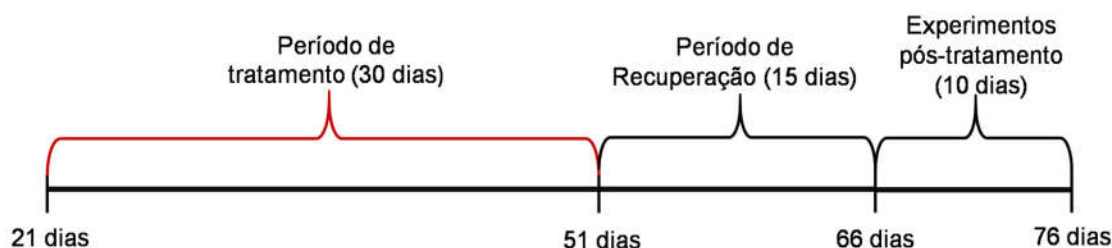


Figura 1. Delineamento experimental da dieta rica em sódio.

3.3 Acompanhamento de Ingestão de ração, fluido, peso corporal e ciclo estral das fêmeas

Um grupo de animais foram mantidos em caixas opacas individuais e a ingestão diária de fluido, ração e peso corporal foram mensuradas cinco dias por semana, totalizando 6 médias de semanas (período de tratamento 4 semanas e período de recuperação 2 semanas). A quantidade diária de fluido e ração ingerida foi determinada por subtração da quantidade fornecida no dia anterior, pela quantidade remanescente no dia seguinte. Após observação de abertura vaginal das fêmeas, o ciclo estral destas começou a ser acompanhado diariamente, no qual se utilizou uma ponteira de pipeta com salina estéril isotônica para realizar lavado vaginal. O material coletado foi colocado em lâminas de vidro e avaliado sobre luz de microscópio ótico no aumento de 20x. No microscópio foram retiradas fotomicrografias de 3 a 4 campos do lavado à fresco, para avaliar as diferentes fases do ciclo estral (Figura 2). Com atenção para realizar os experimentos agudos, no qual foram avaliados parâmetros cardiovasculares, somente no período diestro, pois existem alterações na sensibilidade barorreflexa em outras fases do ciclo estral, podendo promover alterações nas respostas cardiovasculares (Goldman *et al.*, 2009; Brooks *et al.*, 2012).


			
PROESTRO	ESTRO	METESTRO	DIESTRO
Desenvolvimento folicular	Níveis máximos de estrogênio		Atividade do corpo lúteo
Após regressão do corpo lúteo	Aumento dos níveis de Progesterona	Formação do corpo lúteo	Fase de repouso
Altos níveis de estrogênio	Pico de LH Ovulação e cópula	De 24 a 48 horas	Regressão do corpo lúteo ao final
Dura cerca de 12 horas	Período de atividade sexual (geralmente noturno)	Células nucleadas (jovens)	Dura cerca de 24 a 72 horas
Células nucleadas, células queratinizadas e reduzido números de leucócitos	Dura cerca de 24 horas Células queratinizadas	Células queratinizadas e reduzido números de leucócitos	Células nucleadas Número elevado de leucócitos Presença de muco

Figura 2. Esquema explicativo do ciclo estral e fotomicrografias representativas das fases do ciclo estral das fêmeas, no qual são observados os tipos de células características de cada fase. Aumento 20x. Autora: Melissa Tavares Almeida, Fonte: Westwood, 2008; Paccola *et. al.* 2013.

Além disso, nos três últimos dias do período tratamento, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas, nas quais foram mensurados a ingestão de solução salina hipertônica NaCl ou água, ingestão de ração, peso e volume urinário a fim de realizar um balanço hídrico entre volume ingerido de fluido e volume excretado.

3.4 Protocolo de restrição hídrica de 36h e repleção parcial (RH-RH) – Avaliação de apetite ao sódio.

Ao final do período de recuperação, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas, nas quais foram mensurados a ingestão de solução salina hipertônica NaCl (0,3 M; Synth, Diadema, SP, Brasil) e água, ingestão de ração, peso e volume urinário. Os animais permaneceram dois dias na gaiola para aclimação, ao passo que todas as coletas foram realizadas para habituação de manipulação dos animais. Após o período de 48h de aclimação iniciou-se o protocolo de restrição hídrica e repleção parcial (RH-RP), assim como descrito por (Sato, Yada e De Luca, 1996), representado na Figura 3. As mamadeiras com água e solução de salina hipertônica foram então removidas, com os animais tendo livre acesso somente a ração. Após 36h de restrição hídrica, foi ofertada somente água aos animais por um período de duas horas a fim de promover repleção parcial e saciação da sede e depois foi introduzida a mamadeira com solução salina, o que permite distinguir a sede do apetite ao sódio.

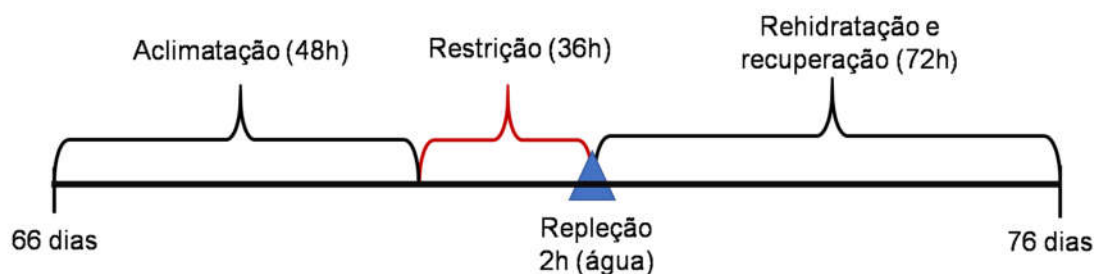


Figura 3. Delineamento experimental do protocolo de restrição hídrica e repleção parcial, realizado em gaiolas metabólicas após o período de recuperação, no qual foram coletados dados de ingestão de fluidos e ração, peso e volume urinário.

3.5 Nanoinjeções no Núcleo Paraventricular do Hipotálamo (PVN)

Em outro grupo de ratos submetidos à dieta rica em sódio, foi avaliada a participação do PVN na manutenção do tônus simpático renal. Após o período de recuperação (15 dias), os animais foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg de massa corpórea, i.v.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), após indução anestésica com isoflurano 2% em O₂ a 100%. Cateteres de polietileno (PE 10 soldado a PE 50) foram inseridos na aorta abdominal através artéria femoral e na veia cava inferior, através da veia femoral, para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e a infusão do anestésico, respectivamente. Após a canulação vascular, foi realizada traqueostomia, para reduzir a resistência das vias aéreas. Após os procedimentos cirúrgicos gerais, os animais foram posicionados em decúbito ventral em aparelho estereotáxico com bocal posicionado -3,5mm abaixo da linha interaural. Nanoinjeções bilaterais de 50 nL de soro fisiológico (NaCl 0,15 M, Synth, Diadema, SP, Brasil) e muscimol (agonista GABA_A, 4mM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) foram realizadas no PVN. As coordenadas estereotáxicas utilizadas foram obtidas e modificadas a partir do Atlas Paxinos e Watson (Paxinos and Watson, 2007). Como ilustrado na Figura 4, as alterações cardiovasculares e na ANSR evocadas pelas nanoinjeções de soro e muscimol foram cada uma, registradas por 30 minutos. Após os registros, foram realizadas nanoinjeções do corante Azul de Evans (Dinâmica, Diadema, SP, Brasil), nas mesmas regiões em que foram nanoinjetados previamente soro e muscimol, para posterior confirmação histológica do local de nanoinjeção. As nanoinjeções foram realizadas de acordo com as seguintes coordenadas estereotáxicas (em mm): Antero-posterior 1,5-1,9 caudal ao bregma; látero-medial: 0,4-1,0 a partir da linha média; dorso-ventral: 7,2-7,8 ventral à dura mater.

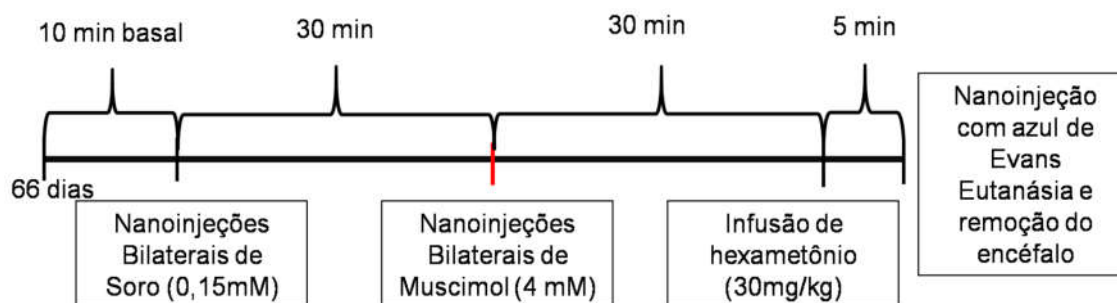


Figura 4. Delineamento experimental do registro de pressão arterial média, frequência cardíaca e atividade nervosa simpática nervosa renal e nanoinjeções no núcleo paraventricular do hipotálamo, após o período de recuperação.

3.6 Registro da Atividade Nervosa Simpática Renal (ANSR)

Para o registro da ANSR, após incisão retroperitoneal do flanco esquerdo, o nervo renal foi cuidadosamente dissecado e separado da artéria e veia renal e demais tecidos adjacentes. Após dissecção, o nervo renal foi posicionado sobre eletrodos de prata em uma configuração bipolar. A ANSR foi amplificada em 20.000 vezes e filtrada entre 30 e 1.000 Hz (Grass Technologies, P511 AC amplifier; Warwick, EUA). Posteriormente, os sinais amplificados e filtrados foram digitalizados em uma frequência de 2.000 amostras/s utilizando-se um conversor analógico digital (PowerLab System; ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA). Para quantificarmos o ruído do sinal obtido, ao final do experimento foi administrado via intravenosa 0,4mL do bloqueador ganglionar hexametônio (30 mg/kg; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) (Figura 4). Todas as fêmeas estavam no diestro de seu ciclo estral quando estes experimentos foram realizados.

3.7 Confirmação histológica dos sítios de nanoinjeção no PVN

Ao final dos experimentos, os animais foram eutanasiados com uma sobredose de uretana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Em seguida, os cérebros foram removidos e armazenados em solução de formaldeído 10% até a criotomia. Os cérebros foram seccionados em cortes coronais de 50 μ m de espessura utilizando um criostato (CM 1860, Leica, Wetzlar, Alemanha). Posteriormente, os cortes foram posicionados em lâminas de vidro e corados pela técnica de vermelho neutro. Após a secagem, os cortes foram recobertos com lamínulas para posterior análise dos sítios de nanoinjeção. Apenas os animais cujas nanoinjeções se

localizaram nas regiões correspondentes à região do PVN foram utilizados para as análises.

3.8 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos foram expressos como média \pm EPM (erro padrão da média). Os valores de ingestão, balanço hídrico e peso corporal foram analisados através de ANOVA *two-way* com pós-teste de Bonferroni. Para a análise dos valores de ingestão de fluidos e ração, volume urinário e fluxo urinário durante o protocolo RH-RP e das respostas cardiovasculares e autonômicas simpáticas induzidas pelas nanoinjeções de soro e muscimol no PVN foi utilizada ANOVA *one-way*, seguidas do pós-teste de Bonferroni. Foi assumida significância quando $p < 0,05$. As análises estatísticas e a confecção dos gráficos foram realizadas usando o GraphPad Prism v.07 para Windows.

4. Resultados

4.1. Acompanhamento de peso corporal e ingestão de fluido e ração

A figura 5 representa a média \pm EPM do peso (A e D), ingestão de ração (B e E) e fluidos (C e F) por peso corporal (pc) de machos e fêmeas avaliados no presente estudo.

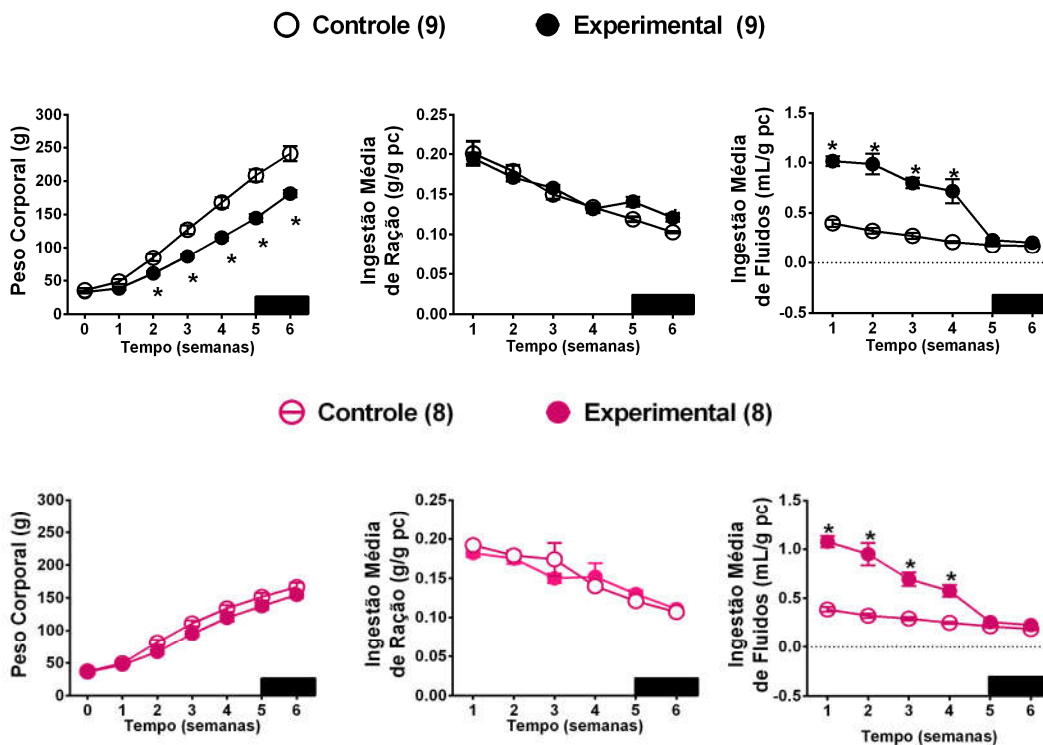


Figura 5. Média \pm EPM do peso (A e D), ingestão média semanal de ração (B e E) e fluido (C e F) dos animais controle e experimental submetidos à sobrecarga de sódio por 30 dias, durante o tratamento e recuperação (barra preta). (A-C machos e D-F fêmeas) * Diferente do controle, $p < 0,05$.

Ao final do tratamento (30 dias), observou-se que os machos experimentais (MEXP) possuíam menor peso corporal em relação aos machos (MCTRL) controles (MEXP (n=9): $115,3 \pm 4,7$ g vs. MCTRL (n=9): $168,0 \pm 8,0$ g; $p < 0,05$; Figura 5A). Entretanto, tal diferença não foi observada entre os grupos de fêmeas experimentais (FEXP) e fêmeas controles (FCTRL) (FEXP (n=8): $119,5 \pm 5,3$ g vs. FCTRL (n=8): $134,1 \pm 5,2$ g; Figura 5D). Não observamos diferença estatística na ingestão diária de ração por grama de pc entre os grupos experimental e controle de machos e fêmeas (MEXP (n=9): $0,158 \pm 0,004$ ml/g/pc vs. MCTRL (n=9): $0,1505 \pm 0,006$ ml/g/pc; FCTRL (n=8): $0,174 \pm 0,021$ g/g/pc vs. FEXP (n=8): $0,151 \pm 0,006$ g/g/pc; Figura 5 B e E). Observamos também que os animais experimentais ingeriram maior quantidade de fluido por grama de pc em relação aos animais controles (MEXP (n=9): $0,717 \pm 0,120$ mL/g/pc vs. MCTRL (n=9): $0,209 \pm 0,009$ mL/g/pc; FEXP (n=8): $0,576 \pm 0,060$ mL/g/pc vs. FCTRL (n=8): $0,251 \pm 0,011$ mL/g/pc, $p < 0,05$; Figura 5 C e D). Entretanto, na recuperação não houve diferença na ingestão diária de água (MEXP (n=9): $0,203 \pm 0,008$ mL/g pc vs. MCTRL (n=9): $0,171 \pm 0,005$ mL/g/pc; FEXP (n=8): $0,229 \pm 0,013$ mL/g/pc vs. FCTRL (n=8): $0,187 \pm 0,010$ mL/g/pc; Figura 5 C e D).

Na Tabela 1 podemos observar a média \pm EPM do peso e ingestão de ração por pc dos animais nos últimos três dias de tratamento dos grupos controle e experimental.

Tabela 1. Valores médios \pm EPM do Peso (g), Ingestão de Ração (g), Ingestão de NaCl (0,3M) ou água (mL) e volume urinário (mL) ao final do tratamento dos animais controle e experimentais.

Grupo	N	Peso (g)	Ração (g/pc)	Fluido (mL)	Volume Urinário (mL)
Machos H2O	9	168,0 \pm 8,0	0,134 \pm 0,004	33,4 \pm 2,6	5,6 \pm 0,8
Machos NaCl	9	115,3 \pm 4,7*	0,132 \pm 0,005	112,4 \pm 9,6*	85,0 \pm 10,2*&
Fêmeas H2O	8	134,1 \pm 5,2	0,140 \pm 0,005	28,3 \pm 2,7	4,1 \pm 1,5
Fêmeas NaCl	8	119,5 \pm 5,3	0,152 \pm 0,017	89,6 \pm 5,6*	56,8 \pm 5,2*

(*) Diferente do grupo controle; (&) Diferente das fêmeas experimentais $p < 0,05$. Pc: peso corporal

Para verificarmos se haviam alterações no balanço hídrico dos animais comparamos o volume ingerido (mL) (Ving) e volume excretado (mL) (Vexc) entre machos e fêmeas controles e experimentais, assim representado na Figura 6.

Entretanto observamos apenas diferenças entre o Ving das fêmeas experimentais em relação ao Vexc, com uma diminuição do volume excretado (FEXP (n=8): Ving 89,6 \pm 5,6mL vs. FEXP (n=8): Vexc 56,8 \pm 5,2mL, $p < 0,05$; Figura 6 B). Observamos ainda uma diminuição do volume excretado das fêmeas em relação aos machos experimentais (FEXP (n=8): Vexc 56,8 \pm 5,2mL vs. MEXP (n=9): Vexc 85,0 \pm 10,2mL $p < 0,05$; Figura 6 B). Não sendo observada uma diferença do balanço hídrico entre os machos (MEXP (n=9): Ving 112,4 \pm 9,6mL vs. MEXP (n=9): Vexc 85,0 \pm 10,2 mL; Figura 6 B).

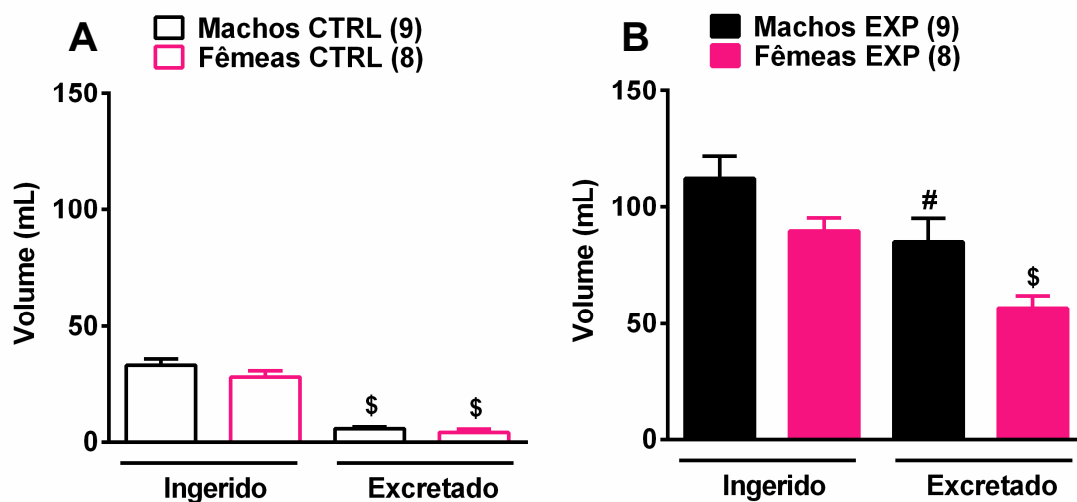


Figura 6. Média \pm EPM do volume ingerido e excretado (mL) dos grupos controles (A) e experimentais (B) de machos e fêmeas durante os três últimos dias de tratamento com NaCl (0,3M). \$ volume ingerido diferente do volume excretado; # volume excretado dos machos diferente do volume excretado das fêmeas experimentais, $p < 0,05$

4.2. Avaliação de Ingestão Induzida de Sódio

Após o protocolo experimental e período de recuperação realizou-se o protocolo de RH-RP de 36h para verificar parâmetros comportamentais dos animais frente à desidratação. A Figura 7 demonstra a média de peso (g), ingestão de salina 0,3M NaCl (mL), de água (mL) e ração (g), volume urinário (mL) e fluxo urinário (mL/hr) durante o período de seis dias dos ratos controles ($n=9$) e experimentais ($n=6$).

Na Figura 7, podemos observar que não houve diferença nos parâmetros de massa corporal (MCTRL: $255 \pm 10,1$ g vs. MEXP: $239,1 \pm 6,1$ g; Figura 7 A), ingestão de água (MCTRL: $0,1303 \pm 0,0105$ ml/g/pc vs. MEXP: $0,17391 \pm 0,0331$ ml/g/pc; Figura 7 C) ou solução salina (MCTRL: $0,0560 \pm 0,0152$ mL NaCl/g/pc vs. MEXP: $0,0354 \pm 0,0046$ mL NaCl/g/pc; Figura 7 D:), volume (MCTRL: $13,3 \pm 0,9$ mL vs. MEXP: $10 \pm 1,7$ mL; Figura 7 E:) e fluxo urinário (MCTRL: $0,5 \pm 0,0$ mL/h vs. MEXP: $0,1 \pm 0,0$ mL/hr; Figura 7 F) entre os grupos controle e experimental dos machos 12h após a reidratação. Por outro lado, observou-se um aumento da ingestão de ração (MCTRL: $0,0488 \pm 0,0029$ g/g/pc vs. MEXP: $0,0647 \pm 0,0098$ g/g/pc, $p < 0,05$; Figura 7 B), nos animais experimentais 12h após reidratação.

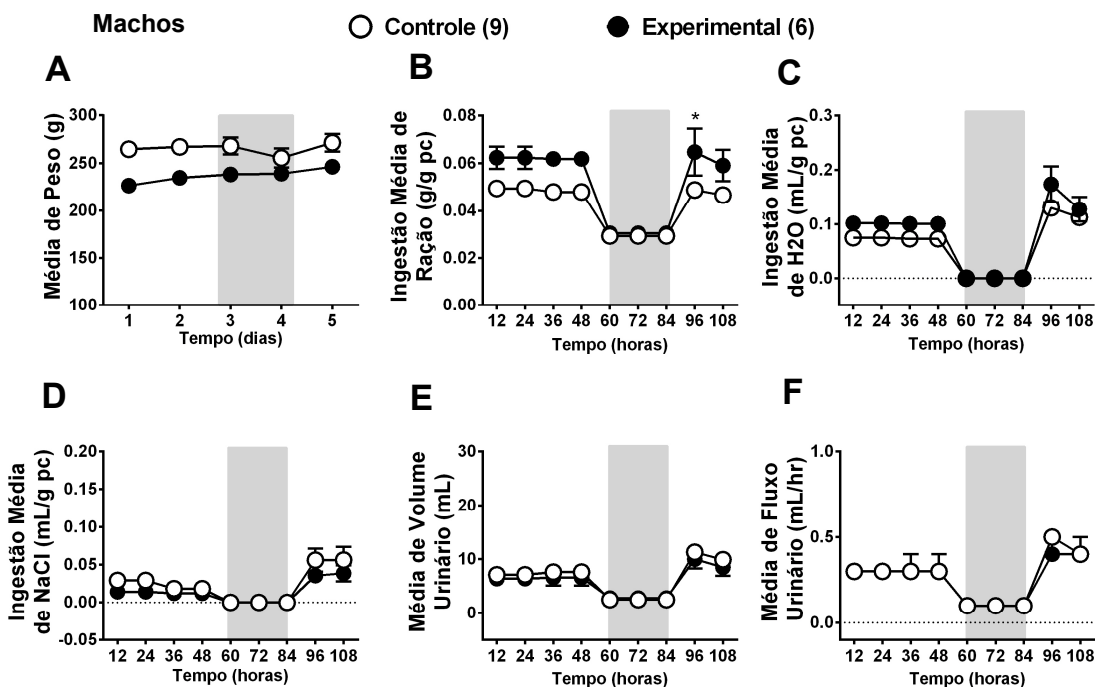


Figura 7. Média \pm EPM média do peso (A), ingestão de ração (B), água (C), salina (D), volume urinário (E) e fluxo urinário (F). A faixa cinza representa o período de restrição hídrica. * diferente do controle, $p < 0,05$.

Na Figura 8, podemos observar que não houve diferença nos parâmetros de massa corporal (FCTRL: $165,6 \pm 4,1$ g vs. FEXP: $161,1 \pm 4,4$ g; Figura 8 A), da ingestão de ração (FCTRL: $0,0631 \pm 0,0043$ g/g/pc vs. FEXP: $0,0647 \pm 0,0058$ g/g/pc; Figura 8 B), ingestão de água (FCTRL: $0,1743 \pm 0,0269$ mL/g/pc vs. FEXP: $0,2296 \pm 0,0202$ mL/g/pc; Figura 8 C:) ou solução salina (FCTRL: $0,1465 \pm 0,0255$ mL NaCl/g/pc vs. FEXP: $0,1495 \pm 0,0243$ mL NaCl/g/pc; Figura 8 D), volume (FCTRL: $16,7 \pm 2,4$ mL vs. FEXP: $11,3 \pm 1,6$ mL; Figura 8 E) e fluxo urinário (FCTRL: $0,7 \pm 0,1$ mL/h vs. FEXP: $0,5 \pm 0,1$ mL/hr; Figura 8 F) entre os grupos controle e experimental de fêmeas 12h após a reidratação.

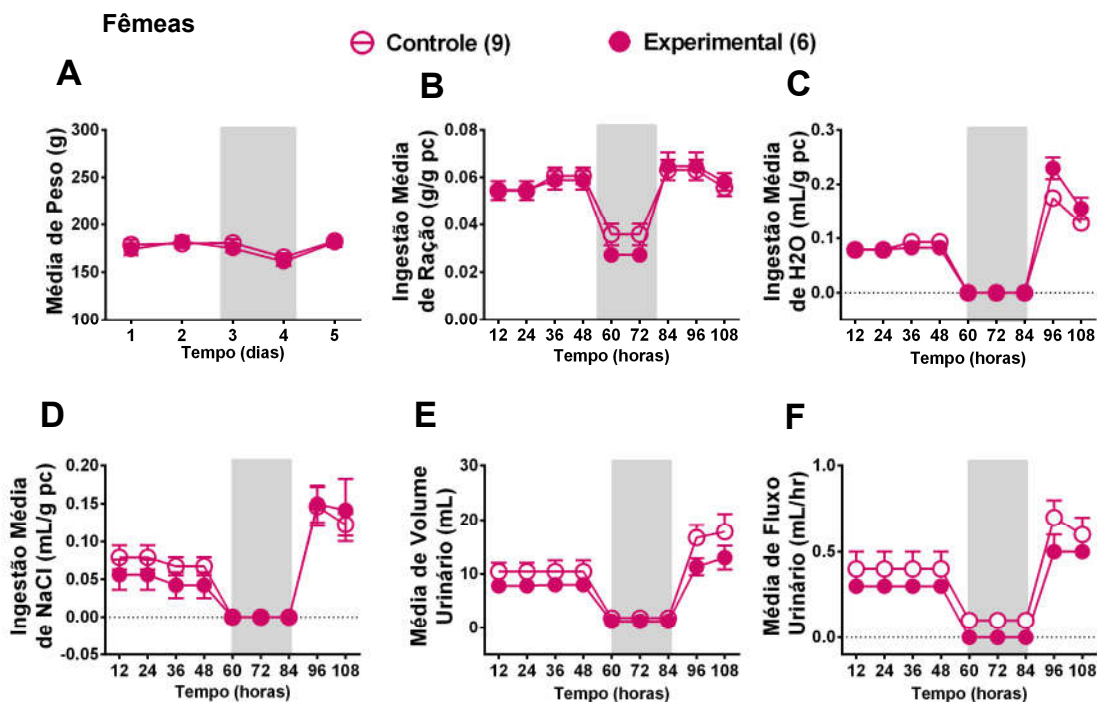


Figura 8. Média \pm EPM média do peso (A), ingestão de ração (B), água (C), salina (D), volume urinário (E) e fluxo urinário (F). A faixa cinza representa o período de restrição hídrica.

4.3 Alterações Cardiovasculares Induzidas pela Inibição do PVN

A Tabela 2 demonstra os valores basais de PAM, FC e ANSR dos animais anestesiados. Podemos observar que os machos anestesiados do grupo experimental apresentaram a PAM elevada em relação aos demais.

Tabela 2. Valores médios basais \pm EPM da PAM (mmHg), FC (bpm) e ANSR (volts) dos animais controles e animais experimentais.

Grupo	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	ANSR (V)
Machos H ₂ O	6	92,00 \pm 5,4	401,7 \pm 14,77	0,0403 \pm 0,0152
Machos NaCl	6	108,2 \pm 2,9*	394,5 \pm 11,14	0,0658 \pm 0,0231
Fêmeas H ₂ O	6	90,83 \pm 1,8	374,7 \pm 21,93	0,0318 \pm 0,00563
Fêmeas NaCl	6	102,7 \pm 4,462	388,5 \pm 18,92	0,0404 \pm 0,00635

(*) diferente do controle; $p < 0,05$.

Podemos observar nas figuras 9 e 10 o traçado típico das respostas de PAP (mmHg), FC (bpm), ANSR (u.a.) e a integral da ANSR (u.a.) após nanoinjeção bilateral de soro e muscimol no PVN dos animais do grupo controle (Figura 9) e do grupo experimental (Figura 10).

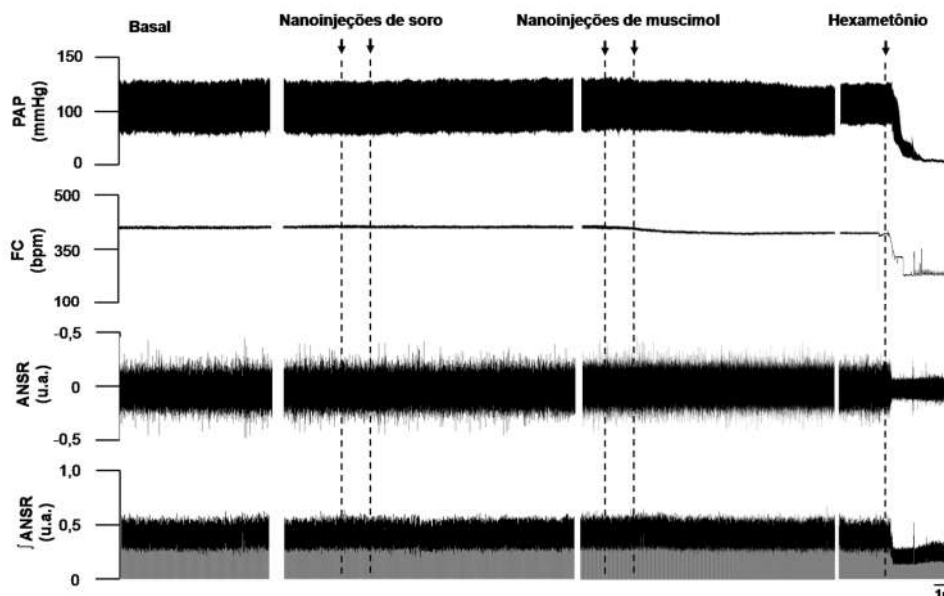


Figura 9. Traçado típico representativo das respostas de PAP (mmHg), FC (bpm), ANSR (u.a.) e a integral da ANSR (u.a.) após nanoinjeção bilateral de soro e muscimol no PVN dos animais do grupo controle.

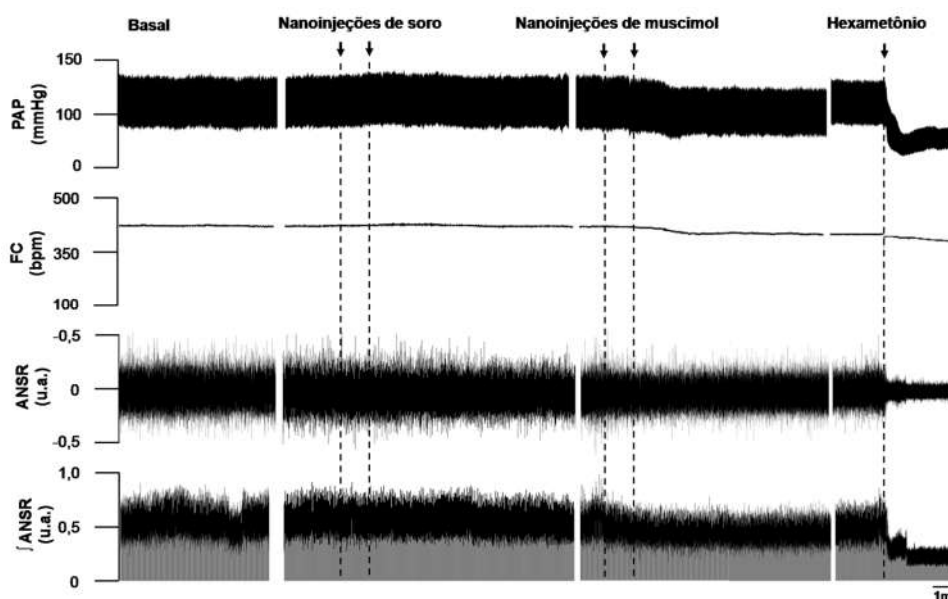


Figura 10. Traçado típico representativo das respostas de PAP (mmHg), FC (bpm), ANSR (u.a.) e a integral da ANSR (u.a.) após nanoinjeção bilateral de soro e muscimol no PVN dos animais do grupo experimental.

A Tabela 3 demonstra a média \pm EPM da variação de PAM, FC e ANSR após nanoinjeção bilateral de soro nos animais anestesiados. Podemos observar que o soro não promoveu alterações nos parâmetros avaliados em nenhum dos grupos.

Tabela 3. Valores médios \pm EPM da diferença da PAM (mmHg), FC (bpm) e ANSR (%) dos animais controles e animais experimentais após a nanoinjeção bilateral de soro.

Grupos	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)	ANSR (%)
Machos H2O	6	0,6 \pm 1,3	-3,4 \pm 0,6	0,8 \pm 1,7
Machos NaCl	6	0,8 \pm 0,3	-0,1 \pm 1,6	0,5 \pm 0,8
Fêmeas H2O	6	-1,9 \pm 0,9	-2,6 \pm 1,3	-0,5 \pm 1,0
Fêmeas NaCl	6	-0,7 \pm 0,5	-0,3 \pm 2,7	-0,1 \pm 1,1

Podemos observar na Figura 11 a sumarização dos resultados expressados como a média \pm EPM da variação PAM (mmHg), FC (bpm) e ANSR (%), após as nanoinjeções de muscimol no PVN nos grupos MCTRL (n=6) e MEXP (n=6) e FCTRL (n=6) e FEXP (n=6).

Nos experimentos anestesiados, os machos do grupo tratado demonstraram valores elevados de PAM basal em relação tanto a seus pares do grupo controle, quanto aos grupos de fêmeas (PAM: MEXP (n=6): 108,2 \pm 2,9 mmHg vs. MCTRL (n=6): 92 \pm 5,4 mmHg vs. FEXP (n=6): 102,7 \pm 4,462mmHg vs. FCTRL (n=6): 90,83 \pm 1,851mmHg; $p < 0,05$; Tabela 2). A inibição do PVN promoveu redução na PAM dos grupos experimentais quando comparados aos grupos controles: (Δ PAM: MEXP (n=6): -14,9 \pm 1,5 mmHg vs. MCTRL (n=6): -7,2 \pm 0,7 mmHg; FEXP (n=6): -12,9 \pm 1,7 mmHg vs. FCTRL (n=6): -4,8 \pm 0,6 mmHg; $p < 0,05$; Figura 9 A). Por outro lado, não foram observadas diferenças nas respostas de FC dos grupos avaliados (Δ FC: MEXP (n=6): -35,8 \pm 6,6 bpm vs. MCTRL (n=6): -21,6 \pm 2,9 bpm; FEXP (n=6): -27,8 \pm 3,5 bpm vs. FCTRL (n=6): -31,0 \pm 4,4 bpm; Figura 9 B). Além disso, a inibição aguda do PVN promoveu simpatoinibição renal nos animais experimentais comparados aos controles (Δ %ANSR: MEXP (n=6): -17,3 \pm 1,5 % vs. MCTRL (n=6): -6,8 \pm 1,0 %; FEXP (n=6): -18,1 \pm 0,5 % vs. FCTRL (n=6): -3,0 \pm 0,6 %; $p < 0,05$; Figura 9 C).

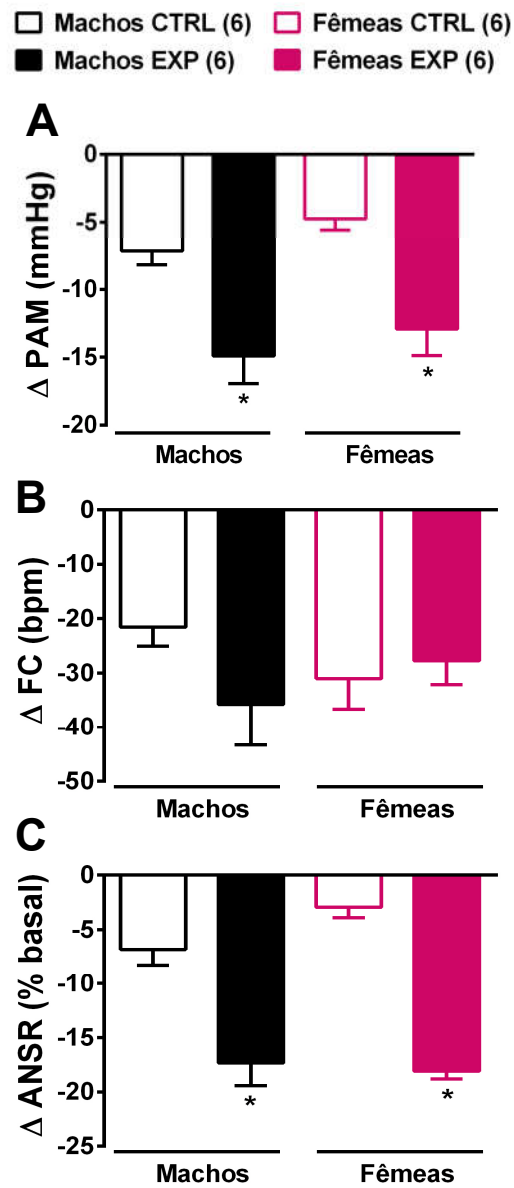


Figura 11. Média \pm EPM das variações de pressão arterial média (A), frequência cardíaca (B) e atividade nervosa simpática (%) (C), dos grupos controle e experimental de machos e fêmeas, após nanoinjeção bilateral de muscimol (4mM) no PVN. * diferente da dos grupos controles, $p < 0,05$.

4.4 Verificação histológica das Nanoinjeções no PVN

A Figura 12 A mostra uma fotomicrografia representativa do hipotálamo a qual indica o sítio de nanoinjeção no PVN. Representações esquemáticas do espalhamento do corante azul de Evans nos grupos de ratos que receberam as nanoinjeções no PVN são demonstradas na figura 12 B.

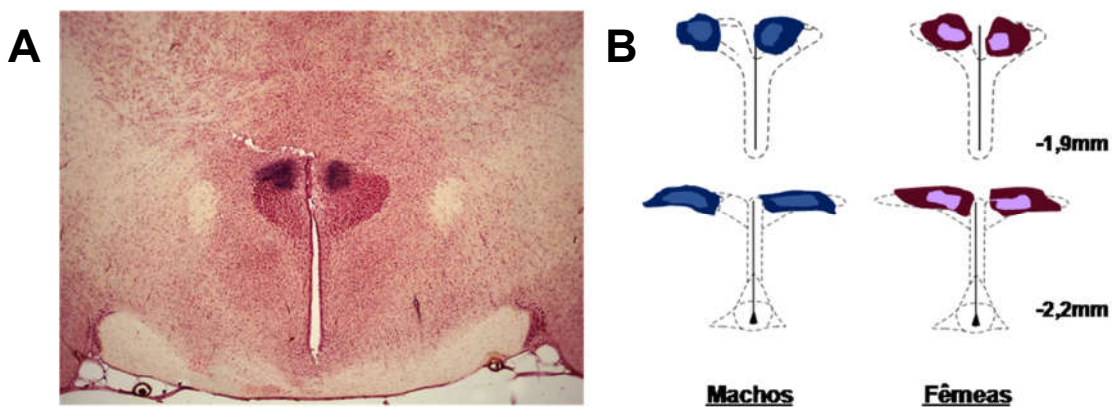


Figura 12. A) fotomicrografia representativa da seção coronal do PVN demonstrando o espalhamento do azul de Evans. B) regiões marcadas representam espalhamento dos sítios de nanoinjeções nos grupos.

5. Discussão

Estudos realizados em modelos animais (Vidinho *et al.*, 2004; Maruyama *et al.*, 2015) e em humanos (Luft *et al.*, 1979; Weinberger, 1996, 2001) sugerem que doenças que se desenvolvem na fase adulta estão relacionadas a determinadas exposições sofridas pelo indivíduo durante as fases, pré-natal, pós-natal e adolescência (Law *et al.*, 1991). Apesar de existirem diversas evidências da influência de uma dieta rica em sódio na fase pré-natal, na prole adulta sobre a hipertensão ou disfunções cardiovasculares, as vias neuronais envolvidas nestas alterações ainda precisam ser esclarecidas. Nossos resultados demonstram que i) ao final do tratamento as fêmeas experimentais possuem menor volume excretado em relação ao ingerido em comparação aos machos experimentais; ii) ao final do período de recuperação não observamos diferenças significativas na ingestão de sódio após o protocolo de RH-RP nos animais experimentais quando comparado aos controles; iii) a sobrecarga de sódio durante a fase pós-natal foi suficiente para promover aumento da PAM basal em machos adultos anestesiados experimentais comparados aos controles, entretanto tal aumento não foi observado nas fêmeas; iv) a inibição do PVN, com o agonista dos receptores GABA_A (muscimol), promoveu redução da ANSR e PAM nos ratos experimentais em relação aos controles tanto em machos quanto em fêmeas, sugerindo a participação deste núcleo na modulação simpática e cardiovascular frente à dieta rica em sódio por 30 dias em ratos adultos anestesiados.

No presente estudo observou-se que após o tratamento de 30 dias com dieta rica em sódio (0,3M NaCl), ocorreu uma alteração na relação de ingestão e excreção entre machos e fêmeas. Evidentemente, os animais submetidos a esta dieta ingeriram maior quantidade de SH. A SH promove um aumento do volume extracelular e aumento da osmolaridade plasmática (Bourque, Oliet e Richard, 1994). Estudos demonstraram que a hiperosmolaridade do CEC irá desencadear respostas comportamentais e neuro-humorais (Dunn *et al.*, 1973; McKinley, Denton e Weisinger, 1978; Silk *et al.*, 2003; Thrasher *et al.*, 2017; Zerbe e Robertson, 2017), como a sensação de sede, para aumentar a ingestão de água para diluição do sódio, inibe o apetite ao sódio (Weisinger, Denton e McKinley, 1983; Blackburn *et al.*, 1993, 1995), promove a liberação de VP, OT e peptídeo natriurético atrial (ANP), e natriurese (Haanwinckel *et al.*, 1995; Maack, 1996). Apesar da ingestão de SH inibir

o apetite ao sódio, o animal por ter apenas o NaCl como fonte hídrica, ingere SH em grandes quantidades devido ao estímulo de sede (Schmidt-Nielsen e Schmidt-Nielsen, 1950). Assim, ocorre excreção da carga de sódio ingerida na urina e maior retenção de água, via atuação da VP via seus receptores nos rins, para favorecer a osmorregulação (Akatsuka *et al.*, 1977; Stricker *et al.*, 2001; Stockand, 2010), o que vai de encontro aos nossos resultados, quando observamos um aumento da ingestão e volume urinário nos animais tratados.

Nossos resultados revelam que as fêmeas experimentais excretam menor volume urinário em relação aos machos experimentais. Entretanto, nossos dados não nos permitem avaliar se apesar de observarmos um volume urinário reduzido nas fêmeas experimentais, há de fato um aumento na excreção de Na⁺ em relação aos machos. Estudos realizados em machos na fase pós-natal e pós-desmame, com concentrações de SH diferentes e tempos de tratamento diferentes demonstram que há uma maior excreção de Na⁺ durante o período de tratamento (Moreira *et al.*, 2014; Gomes *et al.*, 2017). Contudo, estudo realizado em fêmeas SHR e DS submetidas a uma dieta rica em sódio (0,6M NaCl por 2 semanas) revelam que o volume urinário de fêmeas DS intactas era menor do que nas fêmeas DS submetidas a OVX. Ademais, em ratas SHR intactas o volume urinário era maior em relação às ratas SHR-OVX. Apesar das diferenças de volume urinário, neste estudo todos os grupos tratados com SH possuíam a mesma taxa de excreção de Na⁺ (Brinson, Rafikova e Sullivan, 2014), o que aponta para um papel controverso do estrógeno no volume urinário final, frente a uma dieta rica em sódio.

Diversos estudos demonstram o papel do estrógeno na modulação da secreção basal de VP, ANP e OT (Skowsky, Swan e Smith, 1979; Amico, Seif e Robinson, 1981; Barron, Schreiber e Lindheimer, 1986; Caligioni e Franci, 2002; Karjalainen *et al.*, 2004; Vilhena-Franco *et al.*, 2011). Foi demonstrado também que expansão isotônica do volume extracelular promove liberação de ANP e OT e diminui a secreção de VP (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004; Durlo *et al.*, 2004). Entretanto, um desafio osmótico promove liberação de ANP, OT e VP (Bourque, Oliet e Richard, 1994). Estudos já demonstraram que o estrógeno potencializa esta liberação de hormônios frente expansão do volume extracelular promovida pela infusão de SH (Hartley, Dickson e Forsling, 2004; Vilhena-Franco *et al.*, 2011), o que, por consequência irá levar a uma excreção mais eficiente do Na⁺ frente a um

desafio osmótico. Assim, é lícito supor que este aumento de VP promovido pela presença do estrógeno apontado na literatura poderia ser o principal responsável pela diminuição do volume excretado observado nas ratas submetidas à dieta hipersódica em nosso estudo.

O estrógeno, também conhecido como E2, é predominantemente sintetizado e secretado pelos ovários em mulheres pré-menopausa (Iorga *et al.*, 2017) e também é sintetizado em menor quantidade por outros tecidos, como o tecido adiposo, o cérebro, o endotélio vascular e as células musculares lisas aórticas (Simpson, 2003). Estes atuam de forma parácrina no tecido onde é sintetizado, enquanto que o E2 gonadal atua de forma endócrina em tecidos distantes de onde é produzido (Simpson, 2003). O E2 se liga aos receptores do tipo α (ER- α), β (ER- β) estes são receptores nucleares hormonais que, quando se ligam ao DNA, agem como um fator de transcrição ativando a via genômica de ação do E2. Além disso, o E2 pode se ligar a receptores existentes na membrana citoplasmática que estão acoplados à proteína G (GPR 30) (Filardo e Thomas, 2005) ou pode ativar de forma aguda a PI3-quinase e outras vias de sinalização (Brazil *et al.*, 2002), estes promovem a rápida ativação de fatores de transcrição nuclear, caracterizando a via não-genômica do E2 (Bopassa *et al.*, 2010). Os receptores de estrógeno são expressos em diferentes tecidos do corpo e apesar dos ER- α e ER- β ativarem genes em comum, podem ativar genes únicos e com efeitos opostos (Lindberg *et al.*, 2003). Evidências na literatura reportam que existem receptores ER- β nos neurônios magnocelulares do SON e PVN que, quando ativados pelo estrógeno promovem síntese e secreção de OT e VP (Laflamme *et al.*, 1998; Alves *et al.*, 2002; Hrabovszky *et al.*, 2004) e ER- α nos neurônios do OVLT e SFO (J., V. elstvan, 1998; Hrabovszky *et al.*, 2004) que, apesar de não possuírem um efeito direto na secreção de VP e OT, podem sensibilizar o estímulo osmótico a ser conduzido dos OCVs para os neurônios magnocelulares do PVN e SON (Summy-Long e Kadokaro, 2001; Vilhena-Franco *et al.*, 2011). É importante notar, que assim como descrito na literatura, fêmeas conseguem excretar quantidade similar de Na⁺ em relação aos machos, mas frente a menores valores de PA e pressão hidrostática intersticial (Khraibi, Liang e Berndt, 2001). E estudos demonstram ainda que há uma abundância de receptores de endotelina-1 do tipo B (ETB) na medula renal do ducto coletor de fêmeas em relação ao machos (Ge *et al.*, 2006; Kawanishi *et al.*, 2007; Jin

et al., 2013) e o aumento da ingestão de sódio promove o aumento da função destes receptores (Jin, Speed e Pollock, 2016). A interação da endotelina-1 (ET-1) com o ETB promove a inibição da reabsorção de Na⁺ no ducto coletor, promovendo então natriurese frente à ingesta elevada de sódio (Ge *et al.*, 2006), e a VP atua também na medula renal ativando transportadores de uréia e reciclagem da mesma (Fenton, 2009), tornando assim então o padrão de natriurese e retenção de água mais eficiente nas fêmeas (Kawanishi *et al.*, 2007; Johnston *et al.*, 2016). Além disso, OVX abole a diferença sexual observada na excreção de sódio frente sobrecarga de sódio (Nakano e Pollock, 2009). Tais evidências sugerem que o estrógeno contribui para a manutenção da homeostase hidroeletrólítica e osmorregulação, limitando a diurese osmótica natriurética, via aumento da liberação de VP e aumentando a eficiência da natriurese através da inibição da reabsorção de Na⁺ no ducto coletor. O que poderia ser uma hipótese do porque a dieta rica em sódio não promoveu um retardo no ganho de peso nas fêmeas em relação aos machos, como discutido adiante no presente estudo.

Recentemente, foi demonstrado que em camundongos machos submetidos a uma dieta rica em sódio (NaCl 4%), frente à sobrecarga de sódio constante, outros mecanismos entram em ação para manter o *clearance* de água livre negativo (retenção de água) e concentrar o Na⁺ na urina (Kitada *et al.*, 2017). Revelando a participação da uréia na conservação de água corporal, frente à excreção de Na⁺ (Gamble *et al.*, 1934; Kitada *et al.*, 2017). A dieta rica em sódio promove um aumento dos transportadores de uréia na medula interna renal (UT-A1) (Kitada *et al.*, 2017), o que ocasionará em maior acúmulo de uréia no interstício medular, facilitando o gradiente osmótico necessário para reabsorção de água durante a excreção do sódio (Kim *et al.*, 2008). Entretanto, este impulso para manter a conservação corpórea de água não depende somente da reciclagem de uréia, sendo necessária a geração de uréia hepato-muscular. O estudo realizado por Kitada *et al.* (2017) revelou que, nos camundongos submetidos à dieta hipersódica, este mecanismo de retenção hídrica leva a uma reorganização do gasto de energia: i) promovendo cetogênese; ii) reduzindo a gliconeogênese; iii) promovendo a oxidação de ácidos graxos e iv) levando a uma perda catabólica da massa muscular esquelética (Kitada *et al.*, 2017). Estes mecanismos possuem como finalidade a redução do gasto de energia na formação de glicose e priorização da formação de

uréia via nitrogênio advindo dos aminoácidos (principalmente a arginina), uma via de elevado gasto energético (de Blaauw, Deutz e Von Meyenfeldt, 1996; Weiner, Mitch e Sands, 2015;). É lícito supor então, que a diminuição de peso que ocorre nos machos experimentais em relação aos animais controles se dá pela alteração do metabolismo energético, para favorecer a conservação de água e que por fim leva a uma diminuição do armazenamento de ácidos graxos e perda de massa muscular magra.

Nossos resultados demonstraram ainda que animais tratados com 0,3M NaCl no período pós-natal não alteram a sensibilidade do apetite ao sódio frente desidratação celular. Isso entra em conflito com evidências apresentadas no estudo de Nicolaidis et al (1990) e Macchione et al., (2012) no qual a depleção do volume extracelular de ratas no período gestacional promoveu aumento do apetite ao sódio na prole adulta (Macchione *et al.*, 2012; Nicolaidis, Galaverna and Metzler, 2017). Por outro lado, os resultados Moreira et. al. (2014) indicaram que o tratamento com SH na fase pós-natal, leva a uma diminuição do apetite ao sódio (Moreira *et al.*, 2014). Tais estudos indicam que a introdução ou retirada deste estímulo durante as fases iniciais pode levar a uma possível sensibilização dos circuitos osmossensíveis. Entretanto o tempo de tratamento destes animais e modelo experimental foi diferente, indicando assim que o tempo de tratamento não foi suficiente para a hipernatremia promover alterações na sensibilidade do apetite ao sódio frente à desidratação extracelular. O melhor entendimento dos mecanismos que aumentam ou diminuem a ingestão de sódio, pode incluir possíveis aplicações terapêuticas, incluindo o controle da ingestão compulsiva do sódio presente na dieta humana que é potencializado pela industrialização de alimentos.

Evidências na literatura sugerem que a capacidade do sódio alimentar de impactar o controle central das respostas cardiovasculares, depende de neurônios pré-motores simpáticos presentes na região RVLM (Ito, Gordon e a F. Sved, 1999; Adams *et al.*, 2007; Stocker e Madden, 2009; Toney e Stocker, 2010). Os neurônios da região RVLM são tonicamente ativos e regulam o tônus vasomotor simpático basal, uma vez que, se projetam para os neurônios pré-ganglionares presentes na IML, que fazem sinapse com os neurônios pós-ganglionares simpáticos que, por sua vez, inervam o coração e os vasos (Dampney, 1994; Guyenet, 2006). No presente estudo, observamos valores basais de PAM aumentados nos machos experimentais

anestesiados, entretanto tal efeito não foi observado nas fêmeas. Apesar de não confirmarmos um aumento efetivo na PA no modelo de dieta hipersódica por 30 dias, sabe-se que a HSS é altamente dependente da simpatoexcitação. A sobrecarga de sódio potencializa a simpatoexcitação através de estímulo glutamatérgico na região RVLM (Ito, Gordon e a F. Sved, 1999; Adams *et al.*, 2007), advindo de projeções do PVN, que se encontra ativado por aumentos agudos na osmolaridade (Stocker *et al.*, 2006). Além do PVN, outras áreas hipotalâmicas como a região AV3V e SFO participam de respostas relacionadas à regulação cardiovascular e hidroeletrólítica, onde lesões nestas regiões provocam diminuições ou previnem aumentos na PA em modelos HSS (Sanders e Johnson, 1989; Pedrino *et al.*, 2005; Menani *et al.*, 2014). A redução da PAM frente à inibição do PVN, tanto nos machos quanto nas fêmeas submetidos à sobrecarga de sódio por 30 dias demonstrou que este núcleo participa na manutenção da PA, neste modelo e que, pelo menos nos machos também é responsável pela manutenção da PA elevada.

A redução da ANSR frente à inibição do PVN pelo muscimol, tanto nos machos quanto nas fêmeas submetidos à sobrecarga de sódio por 30 dias, demonstrou que este núcleo participa na manutenção do tônus simpático renal neste modelo. A Ang II é responsável pela excitação dos neurônios no PVN que se projetam para os neurônios RVLM (Cato, 2004) sugerindo que o sinal osmótico advindo dos OCVs pode progredir do PVN para a região RVLM via neurotransmissão angiotensinérgica. Além disso, através de estudos realizados com hibridização *in situ*, verificou-se que o transportador 2 da vesícula de glutamato (VGLUT2) está presente e aumentado nas projeções do PVN para o RVLM (Stocker *et al.*, 2006) indicando, portanto que há um aumento da modulação das vias excitatórias exercida por sinalizações glutamatérgicas e angiotensinérgicas (Osborn *et al.*, 2007; Gabor e Leenen, 2012). Corroborando com esses trabalhos, experimentos realizados para verificar a responsividade dos neurônios da RVLM em ratos tratados com uma dieta rica em sódio de NaCl 1% por 14 dias, evidenciaram que o sódio induz um aumento de respostas simpatoexcitatórias, através da nanoinjeção de L-glutamato no RVLM, e respostas simpatoinibitórias, promovidas através da nanoinjeção de GABA no RVLM e, ainda que estas respostas levariam tempo para serem estabelecidas (Adams *et al.*, 2007). Em conjunto, esses estudos indicam que mudanças potencializadas da PA podem ser mediadas por variações

simultâneas na ANS e que estas respostas se desenvolvem de forma lenta e gradativamente ao longo do tempo.

Assim, a sobrecarga de sódio além de provocar aumento de respostas simpatoexcitatórias e simpatoinibitórias, nos casos de HSS promove; i) aumento das concentrações de Na⁺ no CSF (Gomes *et al.*, 2017), o que por sua vez leva a uma ativação dos OCVs que irá levar a uma elevação da descarga simpática contínua dos neurônios PVN-RVLM (Vivas, Chiaraviglio e Carrer, 1990; Huang, Veerasingham e Leenen, 1998; Stocker *et al.*, 2015); ii) eleva de forma crônica a Ang II central (Brooks, Scrogin e McKeogh, 2001); iii) aumenta a atividade dos receptores AT1 ou de aminoácidos excitatórios (EAA) presentes nas projeções PVN-RVLM (Brooks, Freeman e O'Donoghay, 2004); iv) pode diminuir a atividade de neurotransmissores inibitórios no PVN, como o GABA (Martin e Haywood, 1998; Cato, 2004), contribuindo para o ganho ou aumento de sensibilidade da relação direta entre hiperosmolaridade e ANS aumentada.

Semelhante ao observado em humanos, animais experimentais podem demonstrar variados níveis de sensibilidade ou resistência ao sódio (Dahl, 1962; Rapp, 1982). De modo geral, os animais são considerados resistentes ao sódio (RS), não desenvolvendo mudanças na PA frente à introdução de elevadas concentrações de sódio na dieta. Em estudo de Gomes *et al.* (2017), o tratamento com solução 0,9% Na⁺ (4% NaCl) durante 12 semanas após o desmame, provocou hipertensão neurogênica sensível ao sódio, com aumento do Na⁺ e potássio no CSF e aumento do impulso simpático (Gomes *et al.*, 2017). Já outro estudo, realizado por Ufnal *et al.* (2011) no qual foi realizado o tratamento por 8 semanas após o desmame com concentração similar a 0,83% de Na⁺ na dieta não observou-se um aumento da PA ou alterações cardiovasculares (Ufnal *et al.*, 2011). Frente às evidências, os fatores que contribuem para resultados divergentes em relação aos efeitos da ingestão de sódio no sistema cardiovascular são quantidade de sódio na dieta e duração da exposição dietética específica. Como referido anteriormente, o desenvolvimento de repostas tanto pressóricas quanto de aumento de ANS devido à ativação crônica de osmorreceptores, é lenta e tempo-dependente (Adams *et al.*, 2007).

Ao contrário do que foi observado nos machos, a dieta rica em sódio por 30 dias não promoveu aumento significativo da PAM basal nas fêmeas anestesiadas.

Isso pode ser explicado devido ao efeito de resistência ao sódio promovido pelo estrógeno já demonstrado em diversos estudos (Hinojosa-Laborde *et al.*, 2004; Chappell, Yamaleyeva e Westwood, 2006; Schulman e Raij, 2006). A prevalência da sensibilidade ao sal é maior em mulheres que estão na menopausa, seja ela natural ou cirúrgica (Schulman e Raij, 2006; Schulman *et al.*, 2006), sugerindo que a susceptibilidade ao desenvolvimento de HSS está diretamente ligada à ausência de hormônios sexuais femininos (Schulman *et al.*, 2006).

De fato, estudos demonstram em ratos e camundongos o efeito cardioprotetor do estrógeno em fêmeas jovens OVX com reposição de estrógeno em modelos de HSS (Sangaralingham, Yat Tse e Pang, 2007; Chappell, Westwood e Yamaleyeva, 2008; Maric *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2010; Magota *et al.*, 2012; Katsuda *et al.*, 2014), observando-se diminuição da pressão arterial ou reversão do quadro de HSS. E em modelos de hipertensão Ang II-sódio e aldosterona-sódio (Arias-Loza *et al.*, 2007; Kittikulsuth, Looney e Pollock, 2013), com diminuição dos efeitos perivasculares e remodelamento cardíaco, diminuição de proteinúria, e receptores de Ang II em alguns tecidos.

A HSS tem sido bastante correlacionada com o SRA, no qual em diversos modelos de hipertensão este sistema se encontra superativado (Brosnihan *et al.*, 1999; Radin *et al.*, 2002; Chappell *et al.*, 2003; Fortepiani *et al.*, 2003; Maric, Sandberg e Hinojosa-Laborde, 2004; Maric *et al.*, 2008). No modelo de ratas congênicas da cepa mRen(2).Lewis submetidas a uma dieta hipersódica, a depleção de estrógeno promoveu um aumento da PA, e este aumento estava associado ao aumento da excreção de endotelina-1, redução de óxido nítrico sintetase endotelial (eNOS) renal e elevados níveis de Ang II e da enzima conversora de angiotensina (ECA), responsável por converter angiotensina I em Ang II (Chappell, Yamaleyeva and Westwood, 2006). Tal efeito é bloqueado pela reposição de estrógeno como demonstrado também em outros estudos (Harrison-Bernard, Schulman e Raij, 2003; Hinojosa-Laborde *et al.*, 2004; Maric *et al.*, 2008; Shenoy *et al.*, 2009). Além da inibição dos efeitos do SRA, estudos sugerem também que um dos principais mecanismos subjacentes ao efeito cardioprotetor do estrógeno seja a via de aumento da produção de óxido nítrico, o que leva a uma melhora da função endotelial (Murphy e Steenbergen, 2007) e manejo da excreção de sódio (Mattson, Roman e Cowley, 1992; Kone e Baylis, 2017). Postulamos então que o estrógeno

em nosso modelo pode auxiliar na diminuição do efeito de aumento da PAM basal, observado nos machos, promovido pelo aumento prolongado da ingestão de sódio, principalmente através de mecanismos que melhoram a natriurese e função endotelial. Entretanto não foi o suficiente para prevenir o aumento da modulação no tônus simpático exercido pelo PVN nestas ratas tratadas. Indicando que assim como observado na literatura (Fangét *al.*, 2001) no qual a idade em que se inicia a dieta rica em sódio em fêmeas, é determinante crítico do impacto do sódio sobre a PA ou então moduladores da PA como a ANS.

Em conjunto, os resultados observados adicionam novas informações à literatura e sugerem o envolvimento do PVN na manutenção do tônus simpático renal elevado e pressão arterial induzida pela dieta rica em sódio nas fases pós-natais em ratos adultos anestesiados.

6. Considerações finais

Apesar de não podermos afirmar que o tratamento com sódio por 30 dias após o desmame ter levado a uma hipertensão, nossos resultados demonstram que o tempo de 30 dias foi suficiente para promover alterações nos níveis basais da PAM nos machos. Tais resultados não foram observados nas fêmeas indicando um possível efeito cardioprotetor do estrógeno. Nossos dados demonstraram ainda que o PVN participe na manutenção da PA e do tônus simpático frente às alterações desencadeadas por sobrecarga de sódio. Em conjunto, os resultados observados sugerem que regiões de controle cardiovascular e simpático como o PVN pode estar mais envolvido na modulação do tônus simpático em resposta à alterações na homeostase hidromineral durante as fases iniciais da vida e que provavelmente o estrógeno auxiliou na diminuição do efeito pressórico promovido pelo aumento prolongado da ingestão de sódio, mas não foi suficiente para prevenir o aumento da modulação no tônus simpático exercido pelo PVN. Assim, é de grande relevância científica o estudo de mecanismos pelos quais o aumento da ingestão de sódio poderia levar a um possível aumento da atividade simpática.

7. Referências

Adachi, A. (1984) 'Thermosensitive and osmoreceptive afferent fibers in the hepatic branch of the vagus nerve', *Journal of the Autonomic Nervous System*. doi: 10.1016/0165-1838(84)90023-7.

Adams, J. M. *et al.* (2007) 'Increased dietary salt enhances sympathoexcitatory and sympathoinhibitory responses from the rostral ventrolateral medulla', *Hypertension*. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.107.091843.

Akatsuka, N. *et al.* (1977) 'Effects of steady-state plasma vasopressin levels on the distribution of intrarenal blood flow on electrolyte excretion.', *The Journal of Physiology*. doi: 10.1113/jphysiol.1977.sp011782.

Alves, S. E. *et al.* (2002) 'Differential colocalization of estrogen receptor (ER) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain: An immunocytochemical study', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.95.6.3281.

Amaral, N. O. *et al.* (2014) 'Median preoptic nucleus mediates the cardiovascular recovery induced by hypertonic saline in hemorrhagic shock', *Scientific World Journal*. doi: 10.1155/2014/496121.

Amico, J. A., Seif, S. M. and Robinson, A. G. (1981) 'Oxytocin in Human Plasma: Correlation with Neurophysin and Stimulation with Estrogen', *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1210/jcem-52-5-988.

Andersen, L. J. *et al.* (2017) 'Gastrointestinal osmoreceptors and renal sodium excretion in humans', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.2000.278.2.r287.

Antunes-Rodrigues, J. *et al.* (2004) 'Neuroendocrine control of body fluid metabolism.', *Physiological reviews*. doi: 10.1152/physrev.00017.2003.

- Antunes, V. R. *et al.* (2006) 'A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation', *Journal of Physiology*. doi: 10.1113/jphysiol.2006.115766.
- Arias-Loza, P. A. *et al.* (2007) 'Both estrogen receptor subtypes, α and β , attenuate cardiovascular remodeling in aldosterone salt-treated rats', *Hypertension*. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.106.084798.
- Badoer, E. (2001) 'Hypothalamic paraventricular nucleus and cardiovascular regulation.', *Clin Exp Pharmacol Physiol*. doi: 10.1046/j.1440-1681.2001.03413.x.
- Baertschi, A. J. and Pence, R. A. (2017) 'Gut-brain signaling of water absorption inhibits vasopressin in rats', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.1995.268.1.r236.
- Barrett-Connor, E. (1997) 'Sex differences in coronary heart disease: Why are women so superior? The 1995 Ancel Keys Lecture', *Circulation*. doi: 10.1161/01.CIR.95.1.252.
- Barrett-Jolley, R. *et al.* (2011) 'Function and Pharmacology of Spinally-Projecting Sympathetic Pre-Autonomic Neurones in the Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus', *Current Neuropharmacology*. doi: 10.2174/157015911795596531.
- Barron, W. M., Schreiber, J. and Lindheimer, M. D. (1986) 'Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat.', *The American journal of physiology*. doi: 10.1152/ajpendo.1986.250.4.E352.
- Bassett, M. H., White, P. C. and Rainey, W. E. (2004) 'The regulation of aldosterone synthase expression', in *Molecular and Cellular Endocrinology*. doi: 10.1016/j.mce.2003.10.011.
- Bédard, S. *et al.* (2005) 'Modulation of body fluids and angiotensin II receptors in a

rat model of intra-uterine growth restriction', *The Journal of Physiology*. doi: 10.1113/jphysiol.2004.064683.

Bibeau, K. *et al.* (2011) 'Differential responses to salt supplementation in adult male and female rat adrenal glands following intrauterine growth restriction', *Journal of Endocrinology*. doi: 10.1530/JOE-10-0421.

de Blaauw, I., Deutz, N. E. and Von Meyenfeldt, M. F. (2017) 'In vivo amino acid metabolism of gut and liver during short and prolonged starvation', *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. doi: 10.1152/ajpgi.1996.270.2.g298.

Blackburn, R. E. *et al.* (1993) 'Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: Evidence for a differential sensing of plasma sodium and osmolality', *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*.

Blackburn, R. E. *et al.* (1995) 'Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats', *American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*.

Blaine, E. H. *et al.* (1975) 'A central osmosensitive receptor for renal sodium excretion.', *The Journal of Physiology*. doi: 10.1113/jphysiol.1975.sp010809.

Blanch, G. T. *et al.* (2013) 'Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality', *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00191.2012.

Blizard, D. A. *et al.* (1991) 'The effect of a high salt diet and gender on blood pressure, urinary protein excretion and renal pathology in shr rats', *Clinical and Experimental Hypertension*. doi: 10.3109/10641969109042072.

Bopassa, J. C. *et al.* (2010) 'A novel estrogen receptor GPER inhibits mitochondria permeability transition pore opening and protects the heart against ischemia-reperfusion injury', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. doi: 10.1152/ajpheart.00588.2009.

Bourque, C. W. *et al.* (2007) 'Neurophysiological characterization of mammalian osmosensitive neurones', in *Experimental Physiology*. doi: 10.1113/expphysiol.2006.035634.

Bourque, C. W. (2008) 'Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation', *Nature Reviews Neuroscience*. doi: 10.1038/nrn2400.

Bourque, C. W., Oliet, S. H. R. and Richard, D. (1994) 'Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation', *Frontiers in Neuroendocrinology*. doi: 10.1006/frne.1994.1010.

Bourque, C. W., Voisin, D. L. and Chakfe, Y. (2002) 'Stretch-inactivated cation channels: Cellular targets for modulation of osmosensitivity in supraoptic neurons', in *Progress in Brain Research*. doi: 10.1016/S0079-6123(02)39009-5.

Bragulat, E., Alejandro de la Sierra, *et al.* (2012) 'Endothelial Dysfunction in Salt-Sensitive Essential Hypertension', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.hyp.37.2.444.

Bragulat, E., Giner, V., *et al.* (2012) 'Renin-Angiotensin System Genetic Polymorphisms and Salt Sensitivity in Essential Hypertension', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.hyp.35.1.512.

Brazil, D. P. *et al.* (2002) 'Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase', *Nature*. doi: 10.1038/35035131.

Brinson, K. N., Rafikova, O. and Sullivan, J. C. (2014) 'Female sex hormones protect against salt-sensitive hypertension but not essential hypertension', *American Journal*

of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. doi: 10.1152/ajpregu.00061.2014.

Brooks, V. L. *et al.* (2012) 'Baroreflex function in females: Changes with the reproductive cycle and pregnancy', *Gender Medicine*. doi: 10.1016/j.genm.2012.02.004.

Brooks, V. L., Freeman, K. L. and O'Donaughy, T. L. (2004) 'Acute and chronic increases in osmolality increase excitatory amino acid drive of the rostral ventrolateral medulla in rats.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00104.2004.

Brooks, V. L., Qi, Y. and O'Donaughy, T. L. (2005) 'Increased osmolality of conscious water-deprived rats supports arterial pressure and sympathetic activity via a brain action', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00638.2004.

Brooks, V. L., Scrogin, K. E. and McKeogh, D. F. (2001) 'The interaction of angiotensin II and osmolality in the generation of sympathetic tone during changes in dietary salt intake. An hypothesis.', *Annals of the New York Academy of Sciences*. doi: 10.1111/j.1749-6632.2001.tb03692.x.

Brosnihan, K. B. *et al.* (1999) 'Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system', *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. doi: 10.1590/S0100-879X1999000400001.

Caligioni, C. S. and Franci, C. R. (2002) 'Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy', *Life Sciences*. doi: 10.1016/S0024-3205(02)02139-2.

Camacho, A. and Phillips, M. I. (1981) 'Horseradish peroxidase study in rat of the neural connections of the organum vasculosum of the lamina terminalis',

Neuroscience Letters. doi: 10.1016/0304-3940(81)90391-8.

Cannon, W. B. (2017) 'ORGANIZATION FOR PHYSIOLOGICAL HOMEOSTASIS', *Physiological Reviews*. doi: 10.1152/physrev.1929.9.3.399.

Carlson, S. H., Beitz, A. and Osborn, J. W. (2017) 'Intragastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.1997.272.3.r750.

Cato, M. J. (2004) 'Angiotensin II Excites Paraventricular Nucleus Neurons That Innervate the Rostral Ventrolateral Medulla: An In Vitro Patch-Clamp Study in Brain Slices', *Journal of Neurophysiology*. doi: 10.1152/jn.01055.2003.

Chappell, M. C. *et al.* (2003) 'Estrogen or the AT1 Antagonist Olmesartan Reverses the Development of Profound Hypertension in the Congenic mRen2.Lewis Rat', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.0000085210.66399.A3.

Chappell, M. C., Westwood, B. M. and Yamaleyeva, L. M. (2008) 'Differential effects of sex steroids in young and aged female mRen2.Lewis rats: A model of estrogen and salt-sensitive hypertension', *Gender Medicine*. doi: 10.1016/j.genm.2008.03.007.

Chappell, M. C., Yamaleyeva, L. M. and Westwood, B. M. (2006) 'Estrogen and salt sensitivity in the female mRen(2).Lewis rat', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00051.2006.

Chen, Q. H. and Toney, G. M. (2001) 'AT(1)-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.2001.281.6.R1844.

Chen, Q. H. and Toney, G. M. (2003) 'Identification and characterization of two functionally distinct groups of spinal cord-projecting paraventricular nucleus neurons with sympathetic-related activity', *Neuroscience*. doi: 10.1016/S0306-4522(03)00033-2.

Chen, Q. H. and Toney, G. M. (2017) 'AT₁ receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.2001.281.6.r1844.

Choi, H. Y., Park, H. C. and Ha, S. K. (2015) 'Salt sensitivity and hypertension: A paradigm shift from kidney malfunction to vascular endothelial dysfunction', *Electrolyte and Blood Pressure*. doi: 10.5049/EBP.2015.13.1.7.

Chu, C. P., Kannan, H. and Qiu, D. L. (2010) 'Effect of hypertonic saline on rat hypothalamic paraventricular nucleus parvocellular neurons in vitro', *Neuroscience Letters*. doi: 10.1016/j.neulet.2010.07.019.

Ciura, S. (2006) 'Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Required for Intrinsic Osmoreception in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons and for Normal Thirst Responses to Systemic Hyperosmolality', *Journal of Neuroscience*. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0877-06.2006.

Cohen, J. a *et al.* (2010) 'Influence of estrogen depletion and salt loading on renal angiotensinogen expression in the mRen(2).Lewis strain.', *American journal of physiology. Renal physiology*. doi: 10.1152/ajprenal.00138.2010.

Colombari, D. S. *et al.* (2000) 'Afferent pathways in cardiovascular adjustments induced by volume expansion in anesthetized rats.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*.

Colombari, D. S. A. *et al.* (2017) 'Afferent pathways in cardiovascular adjustments

induced by volume expansion in anesthetized rats', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi:

10.1152/ajpregu.2000.279.3.r884.

Colombari, D. S. and Cravo, S. L. (1999) 'Effects of acute AV3V lesions on renal and hindlimb vasodilation induced by volume expansion.', *Hypertension*. doi:

10.1161/01.HYP.34.4.762.

Contreras, R. J. *et al.* (2000) 'High dietary NaCl early in development enhances mean arterial pressure of adult rats', *Physiology and Behavior*. doi: 10.1016/S0031-9384(00)00331-0.

Coote, J. H. *et al.* (1998) 'Control of sympathetic outflows by the hypothalamic paraventricular nucleus', in *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. doi: 10.1111/j.1440-1681.1998.tb02235.x.

Coote, J. H. (2007) 'Landmarks in understanding the central nervous control of the cardiovascular system', in *Experimental Physiology*. doi:

10.1113/expphysiol.2006.035378.

Da Costa, N. K. *et al.* (1997) 'Chronic salt overload increases blood pressure and improves glucose metabolism without changing insulin sensitivity', *American Journal of Hypertension*. doi: 10.1016/S0895-7061(97)00090-3.

Cottrell, G. T. and Ferguson, A. V. (2004) 'Sensory circumventricular organs: Central roles in integrated autonomic regulation', *Regulatory Peptides*. doi:

10.1016/j.regpep.2003.09.004.

Crabbe, D. L. *et al.* (2003) 'Gender differences in post-infarction hypertrophy in end-stage failing hearts', *Journal of the American College of Cardiology*. doi:

10.1016/S0735-1097(02)02710-9.

Crofton, J. T., Share, L. and Brooks, D. P. (1989) 'Gonadectomy abolishes the sexual dimorphism in doc-salt hypertension in the rat', *Clinical and Experimental Hypertension*. doi: 10.3109/10641968909038168.

Cui, L. N., Coderre, E. and Renaud, L. P. (2001) 'Glutamate and GABA mediate suprachiasmatic nucleus inputs to spinal-projecting paraventricular neurons.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*.

Dahl, L. K. (1962) 'EFFECTS OF CHRONIC EXCESS SALT INGESTION: EVIDENCE THAT GENETIC FACTORS PLAY AN IMPORTANT ROLE IN SUSCEPTIBILITY TO EXPERIMENTAL HYPERTENSION', *Journal of Experimental Medicine*. doi: 10.1084/jem.115.6.1173.

Dahl, L. K. (2004) 'Role of the gonads in hypertension-prone rats', *Journal of Experimental Medicine*. doi: 10.1084/jem.142.3.748.

Dampney, R. A. L. (1994) 'The subretrofacial vasomotor nucleus: Anatomical, chemical and pharmacological properties and role in cardiovascular regulation', *Progress in Neurobiology*. doi: 10.1016/0301-0082(94)90064-7.

Dooley, C. P. and Valenzuela, J. E. (1984) 'Duodenal volume and osmoreceptors in the stimulation of human pancreatic secretion.', *Gastroenterology*.

Duan, Y. F. *et al.* (1997) 'Cardiorespiratory components of defense reaction elicited from paraventricular nucleus', *Physiology and Behavior*. doi: 10.1016/S0031-9384(96)00410-6.

Duan, Y. F., Kopin, I. J. and Goldstein, D. S. (1999) 'Stimulation of the paraventricular nucleus modulates firing of neurons in the nucleus of the solitary tract.', *The American journal of physiology*.

Dunn, F. L. *et al.* (1973) 'The role of blood osmolality and volume in regulating

vasopressin secretion in the rat', *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI107521.

Durlo, F. V. *et al.* (2004) 'Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats', *Experimental Physiology*. doi: 10.1113/expphysiol.2004.027243.

Emmeluth, C. *et al.* (1996) 'Natriuresis caused by increased carotid Na⁺ concentration after renal denervation', *American Journal of Physiology*.

Evangelista, L. A. *et al.* (2014) 'Bioquímica Clínica para o Laboratório: Princípios e Interpretações', *Rev Bras Epidemiol*. doi: 10.1590/S1415-52732003000400008.

Fang, Z. *et al.* (2000) 'Circadian rhythm of plasma sodium is disrupted in spontaneously hypertensive rats fed a high-NaCl diet.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*.

Fang, Z. *et al.* (2001) 'Estrogen depletion induces NaCl-sensitive hypertension in female spontaneously hypertensive rats.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*.

Feetham, C. H. *et al.* (2015) 'TRPV4 and KCa ion channels functionally couple as osmosensors in the paraventricular nucleus', *British Journal of Pharmacology*. doi: 10.1111/bph.13023.

Feetham, C. H., Nunn, N. and Barrett-Jolley, R. (2015) 'The depressor response to intracerebroventricular hypotonic saline is sensitive to TRPV4 antagonist RN1734', *Frontiers in Pharmacology*. doi: 10.3389/fphar.2015.00083.

Fenton, R. A. (2009) 'Essential role of vasopressin-regulated urea transport processes in the mammalian kidney', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. doi: 10.1007/s00424-008-0612-4.

Ferguson, A. V., Washburn, D. L. S. and Latchford, K. J. (2017) 'Hormonal and Neurotransmitter Roles for Angiotensin in the Regulation of Central Autonomic Function', *Experimental Biology and Medicine*. doi: 10.1177/153537020122600205.

Filardo, E. J. and Thomas, P. (2005) 'GPR30: A seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release', *Trends in Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1016/j.tem.2005.08.005.

Fitzsimons, J. T. (1978) 'Angiotensin, thirst, and sodium appetite: retrospect and prospect.', *Federation proceedings*.

Fitzsimons, J. T. (1980) 'Thirst and sodium appetite', *Endeavour*. doi: 10.1016/0160-9327(80)90055-1.

Fortepiani, L. A. *et al.* (2003) 'Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats', in *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.0000046924.94886.EF.

Foy, C. G. *et al.* (2018) 'Gender, blood pressure, and cardiovascular and renal outcomes in adults with hypertension from the Systolic Blood Pressure Intervention Trial', *Journal of Hypertension*. doi: 10.1097/HJH.0000000000001619.

Freeman, K. L. and Brooks, V. L. (2006) 'AT 1 and glutamatergic receptors in paraventricular nucleus support blood pressure during water deprivation', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00623.2006.

Fujita, T. *et al.* (1991) 'Effect of hypertonic saline infusion on renal vascular resistance in anesthetized dogs.', *The Japanese journal of physiology*.

Gabor, A. and Leenen, F. H. H. (2012) 'Cardiovascular effects of angiotensin II and glutamate in the PVN of Dahl salt-sensitive rats.', *Brain research*. doi:

10.1016/j.brainres.2012.01.060.

Gamble, J. L. *et al.* (2017) 'AN ECONOMY OF WATER IN RENAL FUNCTION REFERABLE TO UREA', *American Journal of Physiology-Legacy Content*. doi: 10.1152/ajplegacy.1934.109.1.139.

Ge, Y. *et al.* (2006) 'Collecting duct-specific knockout of the endothelin B receptor causes hypertension and sodium retention', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. doi: 10.1152/ajprenal.00190.2006.

Goldman, R. K. *et al.* (2009) 'Baroreflex sensitivity varies during the rat estrous cycle: role of gonadal steroids', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.91030.2008.

Gomes, P. M. *et al.* (2017) 'Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats', *Scientific Reports*. doi: 10.1038/s41598-017-05984-9.

Gray, C. *et al.* (2013) 'Excess Maternal Salt Intake Produces Sex-Specific Hypertension in Offspring: Putative Roles for Kidney and Gastrointestinal Sodium Handling', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0072682.

Guyenet, P. G. (2006) 'The sympathetic control of blood pressure', *Nat Rev Neurosci*. doi: 10.1038/nrn1902.

Guyton, A. C. (1991) 'Blood pressure control - Special role of the kidneys and body fluids', *Science*. doi: 10.1126/science.2063193.

Haanwinckel, M. A. *et al.* (1995) 'Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat.', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.92.17.7902.

Habecker, B. A. *et al.* (2003) 'Ganglionic tyrosine hydroxylase and norepinephrine transporter are decreased by increased sodium chloride in vivo and in vitro', *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. doi: 10.1016/S1566-0702(03)00133-4.

Hall, W. G. and Blass, E. M. (1975) 'Orogastric, hydrational, and behavioral controls of drinking following water deprivation in rats', *Journal of Comparative and Physiological Psychology*. doi: 10.1037/h0077162.

Harrison-Bernard, L. M., Schulman, I. H. and Rajj, L. (2003) 'Postovariectomy Hypertension Is Linked to Increased Renal AT1 Receptor and Salt Sensitivity', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.0000102180.13341.50.

Hartley, D. E., Dickson, S. L. and Forsling, M. L. (2004) 'Plasma vasopressin concentrations of Fos protein expression in the supraoptic nucleus following osmotic stimulation or hypovolaemia in the ovariectomized rat: Effect of oestradiol replacement', *Journal of Neuroendocrinology*. doi: 10.1111/j.0953-8194.2004.01150.x.

Hayward, C. S., Kelly, R. P. and Collins, P. (2000) 'The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function', *Cardiovascular Research*. doi: 10.1016/S0008-6363(00)00005-5.

He, F. J. and MacGregor, G. A. (2009) 'A comprehensive review on salt and health and current experience of worldwide salt reduction programmes', *Journal of Human Hypertension*. doi: 10.1038/jhh.2008.144.

He, F. J., Marrero, N. M. and MacGregor, G. A. (2008) 'Salt and blood pressure in children and adolescents', *Journal of Human Hypertension*. doi: 10.1038/sj.jhh.1002268.

He, J. *et al.* (2009) 'Gender difference in blood pressure responses to dietary sodium intervention in the GenSalt study', *Journal of Hypertension*. doi:

10.1097/HJH.0b013e328316bb87.

Helm, L. and Macdonald, I. A. (2015) 'Impact of beverage intake on metabolic and cardiovascular health', *Nutrition reviews*. doi: 10.1093/nutrit/nuv049.

Hinojosa-Laborde, C. *et al.* (2004) 'Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.0000142893.08655.96.

Holbein, W. W. *et al.* (2017) 'Burst Patterning of Hypothalamic Paraventricular Nucleus-Driven Sympathetic Nerve Activity in Angiotensin II-Salt Hypertension', *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology*. doi: 10.1152/ajpheart.00560.2017.

Holbein, W. W. and Toney, G. M. (2015) 'Activation of the hypothalamic paraventricular nucleus by forebrain hypertonicity selectively increases tonic vasomotor sympathetic nerve activity', *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00460.2014.

Hrabovszky, E. *et al.* (2004) 'Estrogen Receptor- β in Oxytocin and Vasopressin Neurons of the Rat and Human Hypothalamus: Immunocytochemical and in Situ Hybridization Studies', *Journal of Comparative Neurology*. doi: 10.1002/cne.20127.

Huang, B. S., Amin, M. S. and Leenen, F. H. H. (2006) 'The central role of the brain in salt-sensitive hypertension', *Current Opinion in Cardiology*. doi: 10.1097/01.hco.0000231398.64362.94.

Huang, B. S., Veerasingham, S. J. and Leenen, F. H. H. (2017) 'Brain "ouabain," ANG II, and sympathoexcitation by chronic central sodium loading in rats', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. doi: 10.1152/ajpheart.1998.274.4.h1269.

Huang, W., Sved, A. F. and Stricker, E. M. (2017) 'Water ingestion provides an early signal inhibiting osmotically stimulated vasopressin secretion in rats', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.2000.279.3.r756.

Iorga, A. *et al.* (2017) 'The protective role of estrogen and estrogen receptors in cardiovascular disease and the controversial use of estrogen therapy', *Biology of sex differences*. doi: 10.1186/s13293-017-0152-8.

Ito, S., Gordon, F. J. and Sved, a F. (1999) 'Dietary salt intake alters cardiovascular responses evoked from the rostral ventrolateral medulla.', *The American journal of physiology*.

Ito, S., Gordon, F. J. and Sved, A. F. (1999) 'Dietary salt intake alters cardiovascular responses evoked from the rostral ventrolateral medulla', *Am J Physiol*.

'IUPAC compendium of chemical terminology' (2013) *Choice Reviews Online*. doi: 10.5860/choice.39-4583.

J., S. P., V., L. M. and Istvan, M. (1998) 'Comparative distribution of estrogen receptor- α and - β mRNA in the rat central nervous system', *Journal of Comparative Neurology*. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19971201)388:4<507::AID-CNE1>3.0.CO;2-6.

Jin, C. *et al.* (2013) ' Sex differences in ET-1 receptor expression and Ca²⁺ signaling in the IMCD ', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. doi: 10.1152/ajprenal.00400.2013.

Jin, C., Speed, J. S. and Pollock, D. M. (2016) 'High salt intake increases endothelin B receptor function in the renal medulla of rats', *Life Sciences*. doi: 10.1016/j.lfs.2015.12.038.

Johnson, A. K. and Thunhorst, R. L. (1997) 'The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: Visceral sensory signals and mechanisms of central integration', *Frontiers in Neuroendocrinology*. doi: 10.1006/frne.1997.0153.

Johnston, J. G. *et al.* (2016) 'Loss of endothelin B receptor function impairs sodium excretion in a time- and sex-dependent manner', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. doi: 10.1152/ajprenal.00103.2016.

Kannan, H., Hayashida, Y. and Yamashita, H. (1989) 'Increase in sympathetic outflow by paraventricular nucleus stimulation in awake rats.', *The American journal of physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.1989.256.6.R1325.

Karjalainen, A. H. *et al.* (2004) 'Effects of estrogen replacement therapy on natriuretic peptides and blood pressure', *Maturitas*. doi: 10.1016/S0378-5122(03)00279-2.

Katsuda, Y. *et al.* (2014) 'Physiological changes induced by salt intake in female Spontaneously Diabetic Torii-Leprfa (SDT fatty) rat, a novel obese type 2 diabetic model', *Animal Science Journal*. doi: 10.1111/asj.12191.

Kawabe, T. *et al.* (2009) 'Mechanism of heart rate responses elicited by chemical stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat', *Brain Research*. doi: 10.1016/j.brainres.2008.10.059.

Kawanishi, H. *et al.* (2007) 'Involvement of the endothelin ETB receptor in gender differences in deoxycorticosterone acetate-salt-induced hypertension', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04580.x.

Kawasaki, T. *et al.* (1978) 'The effect of high-sodium and low-sodium intakes on blood pressure and other related variables in human subjects with idiopathic hypertension', *The American Journal of Medicine*. doi: 10.1016/0002-9343(78)90045-1.

Khan, I. Y. *et al.* (2003) 'Gender-linked hypertension in offspring of lard-fed pregnant rats', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.0000047511.97879.FC.

Khraibi, A. A., Liang, M. and Berndt, T. J. (2001) 'Role of gender on renal interstitial hydrostatic pressure and sodium excretion in rats', *American Journal of Hypertension*. doi: 10.1016/S0895-7061(01)02164-1.

Kim, Y.-M. *et al.* (2008) 'Urea and NaCl regulate UT-A1 urea transporter in opposing directions via TonEBP pathway during osmotic diuresis', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. doi: 10.1152/ajprenal.00143.2008.

King, A. J. *et al.* (2008) 'Whole body norepinephrine kinetics in ANG II-salt hypertension in the rat', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00819.2007.

Kiss, J. Z. (1988) 'Dynamism of chemoarchitecture in the hypothalamic paraventricular nucleus', *Brain Research Bulletin*. doi: 10.1016/0361-9230(88)90080-9.

Kitada, K. *et al.* (2017) 'High salt intake reprioritizes osmolyte and energy metabolism for body fluid conservation', *Journal of Clinical Investigation*. doi: 10.1172/JCI88532.

Kittikulsuth, W., Looney, S. W. and Pollock, D. M. (2013) 'Endothelin ETB receptors contribute to sex differences in blood pressure elevation in angiotensin II hypertensive rats on a high-salt diet', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. doi: 10.1111/1440-1681.12084.

Kobashi, M. and Adachi, A. (1993) 'Effect of portal infusion of hypertonic saline on neurons in the dorsal motor nucleus of the vagus in the rat', *Brain Research*. doi: 10.1016/0006-8993(93)91152-I.

Kone, B. C. and Baylis, C. (2017) 'Biosynthesis and homeostatic roles of nitric oxide

in the normal kidney', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. doi: 10.1152/ajprenal.1997.272.5.f561.

Kuramochi, G. and Kobayashi, I. (2000) 'Regulation of the urine concentration mechanism by the oropharyngeal afferent pathway in man', *American Journal of Nephrology*. doi: 10.1159/000013554.

Laflamme, N. *et al.* (1998) 'Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER α and ER β) throughout the rat brain: Anatomical evidence of distinct roles of each subtype', *Journal of Neurobiology*. doi: 10.1002/(SICI)1097-4695(19980905)36:3<357::AID-NEU5>3.0.CO;2-V.

Law, C. M. *et al.* (1991) 'Maternal and fetal influences on blood pressure', *Archives of Disease in Childhood*. doi: 10.1136/adc.66.11.1291.

Li, D.-P. (2005) 'Angiotensin II Attenuates Synaptic GABA Release and Excites Paraventricular-Rostral Ventrolateral Medulla Output Neurons', *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. doi: 10.1124/jpet.104.082495.

Li, Y. *et al.* (2017) 'High Salt Intake Augments Excitability of PVN Neurons in Rats: Role of the Endoplasmic Reticulum Ca²⁺ Store', *Frontiers in Neuroscience* | www.frontiersin.org. doi: 10.3389/fnins.2017.00182.

Lindberg, M. K. *et al.* (2003) 'Estrogen Receptor (ER)- β Reduces ER α -Regulated Gene Transcription, Supporting a "Ying Yang" Relationship between ER α and ER β in Mice', *Molecular Endocrinology*. doi: 10.1210/me.2002-0206.

Lisle, S. J. *et al.* (2003) 'Effect of maternal iron restriction during pregnancy on renal morphology in the adult rat offspring', *British Journal of Nutrition*. doi: 10.1079/BJN2003881.

Loewy, A. D. (1981) 'Descending pathways to sympathetic and parasympathetic

preganglionic neurons', *Journal of the Autonomic Nervous System*. doi: 10.1016/0165-1838(81)90068-0.

Lovick, T. A., Malpas, S. and Mahony, M. T. (1993) 'Renal vasodilatation in response to acute volume load is attenuated following lesions of parvocellular neurones in the paraventricular nucleus in rats', *Journal of the Autonomic Nervous System*. doi: 10.1016/0165-1838(93)90331-N.

Luft, F. C. *et al.* (1979) 'Cardiovascular and humoral responses to extremes of sodium intake in normal black and white men', *Circulation*. doi: 10.1161/01.CIR.60.3.697.

Maack, T. (1996) 'Role of atrial natriuretic factor in volume control', in *Kidney International*. doi: 10.1038/ki.1996.257.

Macchione, A. F. *et al.* (2012) 'Availability of a rich source of sodium during the perinatal period programs the fluid balance restoration pattern in adult offspring', *Physiology and Behavior*. doi: 10.1016/j.physbeh.2011.11.015.

MacHnik, A. *et al.* (2009) 'Macrophages regulate salt-dependent volume and blood pressure by a vascular endothelial growth factor-C-dependent buffering mechanism', *Nature Medicine*. doi: 10.1038/nm.1960.

Magota, K. *et al.* (2012) 'Estrogen attenuates coupling factor 6-induced salt-sensitive hypertension and cardiac systolic dysfunction in mice', *Hypertension Research*. doi: 10.1038/hr.2011.232.

Mann, J. F. E. *et al.* (1980) 'Central actions and brain receptor binding of angiotensin II: Influence of sodium intake', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.2.4.437.

Del Mar Lluch, M. *et al.* (1996) 'Erythrocyte sodium transport, intraplatelet pH, and calcium concentration in salt-sensitive hypertension', *Hypertension*. doi:

10.1161/01.HYP.27.4.919.

Maric, C. *et al.* (2008) 'Effect of dietary sodium on estrogen regulation of blood pressure in Dahl salt-sensitive rats', *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*. doi: 10.1152/ajpheart.01322.2007.

Maric, C., Sandberg, K. and Hinojosa-Laborde, C. (2004) 'Glomerulosclerosis and tubulointerstitial fibrosis are attenuated with 17 β -estradiol in the aging Dahl salt sensitive rat', *Journal of the American Society of Nephrology*. doi: 10.1097/01.ASN.0000128219.65330.EA.

Martin, D. S. and Haywood, J. R. (1993) 'Hemodynamic responses to paraventricular nucleus disinhibition with bicuculline in conscious rats.', *The American journal of physiology*. doi: 10.1152/ajpheart.1993.265.5.H1727.

Martin, D. S. and Haywood, J. R. (1998) 'Reduced GABA inhibition of sympathetic function in renal-wrapped hypertensive rats.', *The American journal of physiology*.

Martin, D. S., Segura, T. and Haywood, J. R. (1991) 'Cardiovascular responses to bicuculline in the paraventricular nucleus of the rat', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.18.1.48.

Maruyama, K. *et al.* (2015) 'A maternal high salt diet disturbs cardiac and vascular function of offspring', *Life Sciences*. doi: 10.1016/j.lfs.2015.06.023.

Mattson, D. L., Roman, R. J. and Cowley, A. W. (1992) 'Role of nitric oxide in renal papillary blood flow and sodium excretion', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.19.6.766.

May, C. N., McAllen, R. M. and McKinley, M. J. (2000) 'Renal nerve inhibition by central NaCl and ANG II is abolished by lesions of the lamina terminalis.', *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology*.

McKinley, M. J. *et al.* (2001) 'Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis', in *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. doi: 10.1046/j.1440-1681.2001.03592.x.

McKinley, M. J. *et al.* (2017) 'Periventricular lesions block natriuresis to hypertonic but not isotonic NaCl loads', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. doi: 10.1152/ajprenal.1992.262.1.f98.

McKinley, M. J., Denton, D. A. and Weisinger, R. S. (1978) 'Sensors for antidiuresis and thirst-osmoreceptors or CSF sodium detectors?', *Brain Research*. doi: 10.1016/0006-8993(78)90619-4.

McKinley, M. J. and Johnson, A. K. (2004) 'The Physiological Regulation of Thirst and Fluid Intake', *News in Physiological Sciences*. doi: 10.1152/nips.01470.2003.

Menani, J. V. *et al.* (2014) *Preoptic–Periventricular Integrative Mechanisms Involved in Behavior, Fluid–Electrolyte Balance, and Pressor Responses, Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration*.

Mendelsohn, M. and Karas, R. H. (1999) 'The Protective Effects of Estrogen on the Cardiovascular System', *New England Journal of Medicine*. doi: 10.1056/NEJM199906103402306.

Mendis, S., Puska, P. and Norrving, B. (2011) 'Global atlas on cardiovascular disease prevention and control', *World Health Organization*. doi: NLM classification: WG 120.

Mendonça, M. M. *et al.* (2018) 'Involvement of GABAergic and adrenergic neurotransmissions on paraventricular nucleus of hypothalamus in the control of cardiac function', *Frontiers in Physiology*. doi: 10.3389/fphys.2018.00670.

Miselis, R. R. (1981) 'The efferent projections of the subfornical organ of the rat: A

circumventricular organ within a neural network subserving water balance', *Brain Research*. doi: 10.1016/0006-8993(81)90388-7.

Mizuno, M. *et al.* (2013) 'Prenatal programming of hypertension induces sympathetic overactivity in response to physical stress', *Hypertension*. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.199356.

Moreira, M. C. S. *et al.* (2014) 'High sodium intake during postnatal phases induces an increase in arterial blood pressure in adult rats', *British Journal of Nutrition*. doi: 10.1017/S0007114514002918.

Morita, H. *et al.* (1993) 'Hepatorenal reflex plays an important role in natriuresis after high-NaCl food intake in conscious dogs', *Circulation Research*. doi: 10.1161/01.RES.72.3.552.

Morris, M. and Alexander, N. (1989) 'Baroreceptor influences on oxytocin and vasopressin secretion', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.13.2.110.

Moubarac, J. C. *et al.* (2013) 'Consumption of ultra-processed foods and likely impact on human health. Evidence from Canada', *Public Health Nutrition*. doi: 10.1017/S1368980012005009.

Mourão, A. A. *et al.* (2016) 'Does the median preoptic nucleus contribute to sympathetic hyperactivity in spontaneously hypertensive rats?', *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. doi: 10.1016/j.autneu.2016.02.008.

Muntzel, M. S. *et al.* (2007) 'Dietary salt loading exacerbates the increase in sympathetic nerve activity caused by intravenous insulin infusion in rats', *Metabolism: Clinical and Experimental*. doi: 10.1016/j.metabol.2006.10.020.

Murphy, E. and Steenbergen, C. (2007) 'Cardioprotection in females: A role for nitric oxide and altered gene expression', *Heart Failure Reviews*. doi: 10.1007/s10741-

007-9035-0.

N.O., A. *et al.* (2014) 'Efferent pathways in sodium overload-induced renal vasodilation in rats', *PLoS ONE*. doi: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0109620>.

Naeini, R. S. *et al.* (2006) 'An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction', *Nature Neuroscience*. doi: 10.1038/nn1614.

Nakano, D. and Pollock, D. M. (2009) 'Contribution of endothelin A receptors in endothelin 1-dependent natriuresis in female rats.', *Hypertension*. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.108.123687.

NCD Risk Factor Collaboration (NCD-RisC) (2016) 'Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19·1 million participants.', *Lancet (London, England)*. doi: 10.1016/S0140-6736(16)31919-5.

Nicolaidis, S., Galaverna, O. and Metzler, C. H. (2017) 'Extracellular dehydration during pregnancy increases salt appetite of offspring', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.1990.258.1.r281.

Nijijima, A. (1969) 'Afferent discharges from osmoreceptors in the liver of the guinea pig', *Science*. doi: 10.1126/science.166.3912.1519.

Nishida, Y. *et al.* (1998) 'Suppression of renal sympathetic nerve activity during portal vein infusion of hypertonic saline.', *The American journal of physiology*.

Nishimoto, M. and Fujita, T. (2014) 'Renal mechanisms of salt-sensitive hypertension: contribution of two steroid receptor-associated pathways', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. doi: 10.1152/ajprenal.00477.2013.

O'Donaughy, T. L. and Brooks, V. L. (2006) 'Deoxycorticosterone acetate-salt rats: Hypertension and sympathoexcitation driven by increased NaCl levels', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.0000214362.18612.6e.

O'Donaughy, T. L., Qi, Y. and Brooks, V. L. (2006) 'Central action of increased osmolality to support blood pressure in deoxycorticosterone acetate-salt rats', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.0000238140.06251.7a.

Oberleithner, H. *et al.* (2007) 'Plasma sodium stiffens vascular endothelium and reduces nitric oxide release', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.0707791104.

Oldfield, B. J. *et al.* (1994) 'Fos production in retrogradely labelled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II', *Neuroscience*. doi: 10.1016/0306-4522(94)90219-4.

Osaka, T., Kobayashi, A. and Inoue, S. (2002) 'Vago-sympathoadrenal reflex in thermogenesis induced by osmotic stimulation of the intestines in the rat', *Journal of Physiology*. doi: 10.1113/jphysiol.2001.013475.

Osborn, J. W. *et al.* (2007) 'Circulating angiotensin II and dietary salt: Converging signals for neurogenic hypertension', *Current Hypertension Reports*. doi: 10.1007/s11906-007-0041-3.

Osborn, J. W. and Fink, G. D. (2010) 'Region-specific changes in sympathetic nerve activity in angiotensin II-salt hypertension in the rat', in *Experimental Physiology*. doi: 10.1113/expphysiol.2008.046326.

Passo, S. S., Thornborough, J. R. and Rothbaler, A. B. (2011) 'Natriuresis Following Fourth Ventricle Perfusion with High-sodium Artificial CSF', *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*. doi: 10.1139/y75-052.

Paxinos, G. and Watson, C. (2007) 'The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates Sixth Edition', *Elsevier Academic Press*. doi: 10.1016/0143-4179(83)90049-5.

Pechère-Bertschi, A. and Burnier, M. (2004) 'Female sex hormones, salt, and blood pressure regulation', *American Journal of Hypertension*. doi: 10.1016/j.amjhyper.2004.08.009.

Pedersen, S. F., Kapus, A. and Hoffmann, E. K. (2011) 'Osmosensory Mechanisms in Cellular and Systemic Volume Regulation', *Journal of the American Society of Nephrology*. doi: 10.1681/asn.2010121284.

Pedrino, G. R. *et al.* (2005) 'Anteroventral third ventricle lesions impair cardiovascular responses to intravenous hypertonic saline infusion', *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. doi: 10.1016/j.autneu.2004.09.005.

Pedrino, G. R. *et al.* (2008) 'Renal sympathoinhibition induced by hypernatremia: Involvement of A1 noradrenergic neurons', *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. doi: 10.1016/j.autneu.2008.06.006.

Pedrino, G. R. *et al.* (2012) 'A2 noradrenergic lesions prevent renal sympathoinhibition induced by hypernatremia in rats', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0037587.

Pedrino, G. R. *et al.* (2016) 'Do the carotid body chemoreceptors mediate cardiovascular and sympathetic adjustments induced by sodium overload in rats?', *Life Sciences*. doi: 10.1016/j.lfs.2016.03.045.

Pedrino, G. R., Monaco, L. R. and Cravo, S. L. (2009) 'Renal vasodilation induced by hypernatraemia: Role of α_1 -adrenoceptors in the median preoptic nucleus', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. doi: 10.1111/j.1440-1681.2009.05280.x.

- Pettersson, A. *et al.* (1986) 'Acute volume expansion as a physiological stimulus for the release of atrial natriuretic peptides in the rat', *Life Sciences*. doi: 10.1016/0024-3205(86)90249-3.
- Pitynski, D., Flynn, F. W. and Skinner, D. C. (2015) 'Does salt have a permissive role in the induction of puberty?', *Medical Hypotheses*. doi: 10.1016/j.mehy.2015.06.029.
- Porter, J. P., King, S. H. and Honeycutt, A. D. (2007) 'Prenatal high-salt diet in the Sprague-Dawley rat programs blood pressure and heart rate hyperresponsiveness to stress in adult female offspring', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00887.2006.
- Pyner, S. (2009) 'Neurochemistry of the paraventricular nucleus of the hypothalamus: Implications for cardiovascular regulation', *Journal of Chemical Neuroanatomy*. doi: 10.1016/j.jchemneu.2009.03.005.
- Pyner, S. and Coote, J. H. (2000) 'Identification of branching paraventricular neurons of the hypothalamus that project to the rostroventrolateral medulla and spinal cord', *Neuroscience*. doi: 10.1016/S0306-4522(00)00283-9.
- Qiu, D.-L. *et al.* (2004) 'Effect of hypertonic saline on rat hypothalamic paraventricular nucleus magnocellular neurons in vitro.', *Neuroscience letters*.
- Radin, M. J. *et al.* (2002) 'Gender modulates activation of renin-angiotensin and endothelin systems in hypertension and heart failure.', *Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985)*. doi: 10.1152/jappphysiol.00558.2001.
- Ramos, D. R. *et al.* (2012) 'Maternal high-sodium intake alters the responsiveness of the renin-angiotensin system in adult offspring', *Life Sciences*. doi: 10.1016/j.lfs.2012.04.011.
- Rapp, J. P. (1982) 'Dahl salt-susceptible and salt-resistant rats', *Hypertension*. doi:

10.1161/01.HYP.4.6.753.

Rapsomaniki, E. *et al.* (2014) 'Blood pressure and incidence of twelve cardiovascular diseases: Lifetime risks, healthy life-years lost, and age-specific associations in 1.25 million people', *The Lancet*. doi: 10.1016/S0140-6736(14)60685-1.

Rauch, A. L. *et al.* (1990) 'Regulation of plasma atrial natriuretic peptide by the central nervous system.', *The American journal of physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.1990.258.2.R531.

Reckelhoff, J. F. (2001) 'Gender differences in the regulation of blood pressure', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.37.5.1199.

Rodriguez-Iturbe, B. and Vaziri, N. D. (2007) 'Salt-sensitive hypertension - Update on novel findings', *Nephrology Dialysis Transplantation*. doi: 10.1093/ndt/gfl757.

Ross, M. G. *et al.* (2005) 'Programmed syndrome of hypernatremic hypertension in ovine twin lambs', in *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. doi: 10.1016/j.ajog.2005.01.006.

S., M. *et al.* (2011) 'Epigenetic modulation of the renal beta-adrenergic-WNK4 pathway in salt-sensitive hypertension', *Nature Medicine*. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/nm.2337>.

Sanders, B. J. and Johnson, A. K. (1989) 'Lesions of the anteroventral third ventricle prevent salt-induced hypertension in the borderline hypertensive rat', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.14.6.619.

Sangaralingham, S. J., Yat Tse, M. and Pang, S. C. (2007) 'Estrogen protects against the development of salt-induced cardiac hypertrophy in heterozygous proANP gene-disrupted mice', *Journal of Endocrinology*. doi: 10.1677/JOE-07-0130.

Sato, M. A., Yada, M. M. and De Luca, L. A. (1996) 'Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats', *Physiology and Behavior*. doi: 10.1016/0031-9384(96)00058-3.

Sawchenko, P. E. and Swanson, L. W. (1982) 'The organization of noradrenergic pathways from the brainstem to the paraventricular and supraoptic nuclei in the rat', *Brain Research Reviews*. doi: 10.1016/0165-0173(82)90010-8.

Sawchenko, P. E. and Swanson, L. W. (1983) 'The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat', *Journal of Comparative Neurology*. doi: 10.1002/cne.902180202.

Schmidt-Nielsen, B. and Schmidt-Nielsen, K. (1950) 'DO KANGAROO RATS THRIVE WHEN DRINKING SEA WATER?', *American Journal of Physiology-Legacy Content*, 160(2), pp. 291–294. doi: 10.1152/ajplegacy.1950.160.2.291.

Schulman, I. H. *et al.* (2006) 'Surgical menopause increases salt sensitivity of blood pressure', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.0000218857.67880.75.

Schulman, I. H. and Raji, L. (2006) 'Salt sensitivity and hypertension after menopause: Role of nitric oxide and angiotensin II', *American Journal of Nephrology*. doi: 10.1159/000092984.

Scrogin, K. E., Grygielko, E. T. and Brooks, V. L. (2017) 'Osmolality: a physiological long-term regulator of lumbar sympathetic nerve activity and arterial pressure', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.1999.276.6.r1579.

Scrogin, K. E., Hatton, D. C. and McCarron, D. A. (2017) 'The interactive effects of dietary sodium chloride and calcium on cardiovascular stress responses', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.1991.261.4.r945.

- Shafton, A. D., Ryan, A. and Badoer, E. (1998) 'Neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus send collaterals to the spinal cord and to the rostral ventrolateral medulla in the rat', *Brain Research*. doi: 10.1016/S0006-8993(98)00587-3.
- Shen, Y. T., Graham, R. M. and Vatner, S. F. (1991) 'Effects of atrial natriuretic factor on blood flow distribution and vascular resistance in conscious dogs.', *The American journal of physiology*.
- Shenoy, V. *et al.* (2009) ' 17β -Estradiol modulates local cardiac renin-angiotensin system to prevent cardiac remodeling in the DOCA-salt model of hypertension in rats', *Peptides*. doi: 10.1016/j.peptides.2009.09.005.
- Shi, P., Stocker, S. D. and Toney, G. M. (2007) 'Organum vasculosum laminae terminalis contributes to increased sympathetic nerve activity induced by central hyperosmolality', *AJP: Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00160.2007.
- Silk, T. *et al.* (2003) 'Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst', *Proceedings of the National Academy of Sciences*. doi: 10.1073/pnas.2136650100.
- Silva, E. F. *et al.* (2015) 'Involvement of sinoaortic afferents in renal sympathoinhibition and vasodilation induced by acute hypernatremia', *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. doi: 10.1111/1440-1681.12475.
- da Silva, E. F. *et al.* (2013) 'A1 Noradrenergic Neurons Lesions Reduce Natriuresis and Hypertensive Responses to Hypernatremia in Rats', *PLoS ONE*. doi: 10.1371/journal.pone.0073187.
- Simon, G. (2003) 'Experimental Evidence for Blood Pressure-Independent Vascular Effects of High Sodium Diet', *American Journal of Hypertension*. doi: 10.1016/j.amjhyper.2003.07.019.

Simpson, E. R. (2003) 'Sources of estrogen and their importance', in *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. doi: 10.1016/S0960-0760(03)00360-1.

Skøtt, O. (2003) 'Angiotensin II and control of sodium and water intake in the mouse.', *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.00106.2003.

Skowsky, W. R., Swan, L. and Smith, P. (1979) 'Effects of sex steroid hormones on arginine vasopressin in intact and castrated male and female rats', *Endocrinology*. doi: 10.1210/endo-104-1-105.

Sowers, J. R. and Lester, M. (2000) 'Hypertension, hormones, and aging', in *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. doi: 10.1067/mlc.2000.106453.

Stockand, J. D. (2010) 'Vasopressin regulation of renal sodium excretion.', *Kidney international*. doi: 10.1038/ki.2010.276.

Stocker, S. D. *et al.* (2006) 'Water deprivation activates a glutamatergic projection from the hypothalamic paraventricular nucleus to the rostral ventrolateral medulla', *Journal of Comparative Neurology*. doi: 10.1002/cne.20835.

Stocker, S. D. *et al.* (2015) 'Cerebrospinal Fluid Hypernatremia Elevates Sympathetic Nerve Activity and Blood Pressure via the Rostral Ventrolateral Medulla', *Hypertension*. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05936.

Stocker, S. D. and Madden, C. J. (2009) 'Excess Dietary Salt Intake Selectively Enhances the Excitability of Sympathetic Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla', *FASEB Journal*.

Stocker, S. D. and Toney, G. M. (2005) 'Median preoptic neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus respond to osmotic, circulating Ang II and baroreceptor input in the rat', *Journal of Physiology*. doi:

10.1113/jphysiol.2005.094425.

Strange, K. (2004) 'Cellular volume homeostasis', *Advances in Physiology Education*. doi: 10.1152/advan.00034.2004.

Strauss, M. B. *et al.* (1958) 'Surfeit and Deficit of Sodium: A Kinetic Concept of Sodium Excretion', *A.M.A Archives of Internal Medicine*. doi: 10.1001/archinte.1958.00260210013003.

Stricker, E. M. *et al.* (2017) 'Osmoregulation in water-deprived rats drinking hypertonic saline: effect of area postrema lesions', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.2001.280.3.r831.

Stricker, E. M. and Hoffmann, M. L. (2007) 'Presystemic signals in the control of thirst, salt appetite, and vasopressin secretion', *Physiology and Behavior*. doi: 10.1016/j.physbeh.2007.04.007.

Stricker, E. M. and Sved, A. F. (2000) 'Thirst', *Nutrition*. doi: 10.1016/S0899-9007(00)00412-3.

Summy-Long, J. Y. and Kadekaro, M. (2001) 'Role of circumventricular organs (CVO) in neuroendocrine responses: Interactions of CVO and the magnocellular neuroendocrine system in different reproductive states', in *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. doi: 10.1046/j.1440-1681.2001.03491.x.

Swanson, L. W. and Kuypers, H. G. J. M. (1980) 'The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods', *Journal of Comparative Neurology*. doi: 10.1002/cne.901940306.

Swanson, L. W. and Sawchenko, P. E. (1980) 'Paraventricular nucleus: A site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms', *Neuroendocrinology*. doi: 10.1159/000123111.

Swanson, L. W., Sawchenko, P. E. and Lind, R. W. (1986) 'Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: Implications for the stress response', *Progress in Brain Research*. doi: 10.1016/S0079-6123(08)60238-1.

Thrasher, T. N. *et al.* (2017) 'Thirst and vasopressin release in the dog: an osmoreceptor or sodium receptor mechanism?', *American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*. doi: 10.1152/ajpregu.1980.238.5.r333.

Toney, G. M. *et al.* (2003) 'Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity.', *Acta Physiologica Scandinavica*. doi: 10.1046/j.1365-201X.2003.01046.x.

Toney, G. M. and Stocker, S. D. (2010) 'Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: Implications for cardiovascular disease', *Journal of Physiology*. doi: 10.1113/jphysiol.2010.191940.

Ufnal, M. *et al.* (2011) 'Early high-sodium solid diet does not affect sodium intake, sodium preference, blood volume and blood pressure in adult Wistar-Kyoto rats', *British Journal of Nutrition*. doi: 10.1017/S0007114511000110.

Vehaskari, V. M., Aviles, D. H. and Manning, J. (2001) 'Prenatal programming of adult hypertension in the rat', *Kidney International*. doi: 10.1046/j.1523-1755.2001.00484.x.

Verbalis, J. G., Baldwin, E. F. and Robinson, A. G. (1986) 'Osmotic regulation of plasma vasopressin and oxytocin after sustained hyponatremia', *Am J Physiol*.

Vidonho, A. F. *et al.* (2004) 'Perinatal salt restriction: A new pathway to programming

insulin resistance and dyslipidemia in adult Wistar rats', *Pediatric Research*. doi: 10.1203/01.PDR.0000145258.75160.5B.

Vilhena-Franco, T. *et al.* (2011) 'Oestradiol potentiates hormone secretion and neuronal activation in response to hypertonic extracellular volume expansion in ovariectomised rats', *Journal of Neuroendocrinology*. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02133.x.

Vivas, L., Chiaraviglio, E. and Carrer, H. F. (1990) 'Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: Responses to changes in sodium concentration', *Brain Research*. doi: 10.1016/0006-8993(90)90091-O.

Wakitani, K. *et al.* (1985) 'Atriopeptins: correlation between renal vasodilation and natriuresis.', *The American journal of physiology*.

Wang, R.-J. *et al.* (2009) 'GABA(A) and GABA(B) receptor-mediated inhibition of sympathetic outflow in the paraventricular nucleus is blunted in chronic heart failure.', *Clinical and experimental pharmacology & physiology*. doi: 10.1111/j.1440-1681.2008.05101.x.

Weinberger, M. H. *et al.* (1986) 'Definitions and characteristics of sodium sensitivity and blood pressure resistance.', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.8.6.

Weinberger, M. H. (1996) 'Salt Sensitivity of Blood Pressure in Humans', *Hypertension*. doi: 10.1161/01.HYP.27.3.481.

Weinberger, M. H. (2001) 'Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans.', *Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.)*.

Weinberger, M. H. (2002) 'Salt sensitivity is associated with an increased mortality in both normal and hypertensive humans', *Journal of Clinical Hypertension*. doi:

10.1111/j.1524-6175.2002.00924.x.

Weinberger, M. H. (2006) 'Pathogenesis of salt sensitivity of blood pressure', *Current Hypertension Reports*. doi: 10.1007/s11906-006-0014-y.

Weiner, I. D., Mitch, W. E. and Sands, J. M. (2015) 'Urea and ammonia metabolism and the control of renal nitrogen excretion', *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. doi: 10.2215/CJN.10311013.

Weisinger, R. S., Denton, D. A. and McKinley, M. J. (1983) 'Self-administered intravenous infusion of hypertonic solutions and sodium appetite of sheep', *Behavioral Neuroscience*. doi: 10.1037/0735-7044.97.3.433.

Weiss, M. L. *et al.* (1996) 'Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion.', *Journal of the autonomic nervous system*.

Westerhaus, M. J. and Loewy, A. D. (1999) 'Sympathetic-related neurons in the preoptic region of the rat identified by viral transneuronal labeling', *Journal of Comparative Neurology*. doi: 10.1002/(SICI)1096-9861(19991122)414:3<361::AID-CNE6>3.0.CO;2-X.

Woods, L. L. *et al.* (2001) 'Maternal protein restriction suppresses the newborn renin-angiotensin system and programs adult hypertension in rats', *Pediatric Research*. doi: 10.1203/00006450-200104000-00005.

World Health Organization (2013) *A global brief on Hypertension - World Health Day 2013*, World Health Organization. doi: 10.1136/bmj.1.4815.882-a.

World Health Organization (2017) *WHO Cardiovascular diseases (CVDs) Fact sheet*, Who.

Yang, Z., Bertram, D. and Coote, J. H. (2001) 'The role of glutamate and vasopressin

in the excitation of RVL neurones by paraventricular neurones', *Brain Research*. doi: 10.1016/S0006-8993(01)02593-8.

Zerbe, R. L. and Robertson, G. L. (2017) 'Osmoregulation of thirst and vasopressin secretion in human subjects: effect of various solutes', *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*. doi: 10.1152/ajpendo.1983.244.6.e607.

Zhang, Z. and Bourque, C. W. (2003) 'Osmometry in osmosensory neurons', *Nature Neuroscience*. doi: 10.1038/nn1124.

Zhong, M. K. *et al.* (2008) 'Paraventricular nucleus is involved in the central pathway of cardiac sympathetic afferent reflex in rats', *Experimental Physiology*. doi: 10.1113/expphysiol.2007.041632.

Anexo

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFG).