



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

**DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERNATREMIA: ALTERAÇÕES
AUTONÔMICAS E CARDIOVASCULARES**

NATHALIA ODA AMARAL

GOIÂNIA-GO
2018

**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:

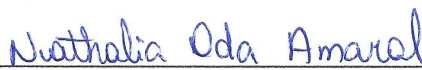
Nome completo do autor: NATHALIA ODA AMARAL

Título do trabalho: DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERNATREMIA: ALTERAÇÕES AUTONÔMICAS E CARDIOVASCULARES

3. Informações de acesso ao documento:

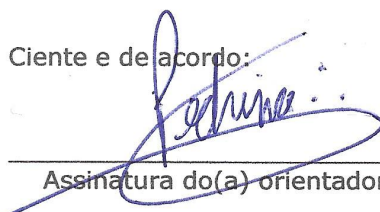
Concorda com a liberação total do documento ☒ SIM ☐ NÃO¹

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: 28 / 02 / 2018

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

²A assinatura deve ser escaneada.

NATHALIA ODA AMARAL

**DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERNATREMIA: ALTERAÇÕES
AUTONÔMICAS E CARDIOVASCULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de doutor em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Farmacologia e Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino

Co-orientadora: Prof. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari

GOIÂNIA-GO

2018

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

Amaral, Nathalia Oda
DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERNATREMIA: ALTERAÇÕES
AUTONÔMICAS E CARDIOVASCULARES [manuscrito] / Nathalia Oda
Amaral. - 2014.
XXV, 84 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino; co-orientador
Dra. Débora Simões de Almeida Colombari.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de
Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia,
Goiânia, 2014.

Bibliografia. Anexos.

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

1. Dieta hiperlipídica. 2. Metabolismo. 3. Programação fetal. 4.
Hipernatremia. 5. Ocitocina. I. Pedrino, Dr. Gustavo Rodrigues, orient.
II. Título.

CDU 612



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

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 59

Aos dois dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezoito, às catorze horas, no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas I da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino, Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira, Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes, Profa. Dra. Vanessa Cristiane de Santana Amaral e Profa. Dra. Ana Cristina Silva Rebelo para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada "DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERNATREMIA: ALTERAÇÕES AUTONÔMICAS E CARDIOVASCULARES", em nível de doutorado, área de concentração em Farmacologia e Fisiologia, de autoria de **Nathalia Oda Amaral**, discente do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da tese que em cerca de 30 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de arguição, procedeu-se à avaliação da tese. Tendo-se em vista o que consta na Resolução nº1491 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, a tese foi Aprovada, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da tese na Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às



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

27 12 horas e 45 minutos, encerrou-se a sessão de defesa de tese e, para
28 constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da
29 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada,
30 será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual
31 teor.

32
33 
34 **Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino**
35 **Presidente da Banca**

36 **Universidade Federal de Goiás**

37
38 
39 **Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira**
40 **Universidade Federal de Goiás**

41
42 
43 **Prof. Dr. Rodrigo Mello Gomes**
44 **Universidade Federal de Goiás**

45 
46 **Prof. Dra. Vanessa Cristiane de Santana Amaral**
47 **Universidade Estadual de Goiás**

48
49 
50 **Profa. Dra. Ana Cristina Silva Rebelo**
51 **Universidade Federal de Goiás**

NATHALIA ODA AMARAL

**DIETA HIPERLIPÍDICA E HIPERNATREMIA: ALTERAÇÕES
AUTONÔMICAS E CARDIOVASCULARES**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino
Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dra. Vanessa Cristiane de Santana Amaral
Universidade Estadual de Goiás

Profa. Dr. Rodrigo Mello Gomes
Universidade Federal de Goiás

Profa. Dr. Ana Cristina Silva Rebelo
Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: ____/____/____

Aos meus pais,

Sebastião Fernandes do Amaral

Elione Oda Amaral

Aos meus irmãos,

Anielly Oda Amaral

Renan Oda Amaral

Jullyane Oda Amaral

Obrigada por serem sempre a minha base e meu exemplo de vida, e pelo apoio e amor incondicional! Obrigada por sempre acreditarem em mim, principalmente nas inúmeras vezes em que eu mesma não acreditava.

Eu amo muito vocês!!!

Em especial,

Ao Gustavo Siqueira Vinhal

Meu esposo e melhor amigo. Obrigada por ter entrado na minha vida fazendo dela cada vez melhor. Você encheu de alegria e luz o meu coração e serei imensamente grata por cada momento bom que passamos juntos e por todos os outros que ainda vamos passar. Obrigada por sempre acreditar e confiar em mim e por me ajudar a chegar até onde cheguei.

Te amo demais!!!

Agradecimentos

Primeiramente a Deus e ao meu mentor espiritual, por sempre me dar força e discernimento para suportar todas as dificuldades e por me dar, nos momentos de escuridão, a luz para enxergar novamente o caminho. Sei que ainda há muito por vir, mas tenho certeza que o senhor estará comigo em todos os momentos que eu precisar.

Aos colegas de laboratório, sei que a convivência não é fácil, mas sou muito grata a cada um de vocês que me ajudaram da maneira que podiam. Agradeço em especial ao Paulo, Stéfanne e a Lara por cada momento que passamos juntos nessa longa caminhada e por todos os momentos em que me deram seu precioso tempo para me ouvir e me ajudar, sou muito grata de coração. Desejo a todos os colegas de laboratório muito sucesso e uma carreira brilhante, mas acima de tudo, sabedoria para saber separar, quando necessário, o que é realmente prioridade em suas vidas.

Aos amigos que mesmo nas inúmeras ausências, sempre se fizeram presentes na minha vida. Agradeço também a cada um de vocês.

Aos funcionários da UFG, dona Divina, Dina e Renato. Vocês são pessoas muito especiais que entraram na minha vida. Parabéns pela força e determinação. E obrigada por terem me ajudado cada um a sua maneira.

Ao meu orientador Gustavo R. Pedrino, pela oportunidade e pelo voto de confiança. Sei que esses 8 anos de convivência não foram fáceis. Mas serei eternamente grata por tudo que fez por mim. Acredito que muita coisa não tenha sido exatamente como você queria, mas espero que entenda que sempre tentei fazer o meu melhor da maneira que eu podia e dentro das minhas limitações. Eu aprendi muito com você e te desejo de coração toda felicidade do mundo e muito sucesso.

À minha co-orientadora Débora Simões de Almeida Colombari, ao professor Eduardo Colombari e todos os colegas do laboratório de fisiologia. Obrigada pela oportunidade em trabalhar e aprender com vocês. O período em que estive em Araraquara foi muito importante para o meu crescimento pessoal e acadêmico. Sou muito grata por tudo que aprendi e pelas pessoas maravilhosas que conheci.

Ao professor Daniel Zoccal por toda a ajuda durante os experimentos e por ter compartilhado comigo um pouquinho do seu imenso conhecimento.

Aos professores do CPNFC (Centro de Pesquisa em Neurociências e Fisiologia Cardiovascular) por me ajudarem no meu crescimento acadêmico e pelos momentos que passamos nessa longa caminhada. Jamais me esquecerei de vocês.

“Desejo-lhes, folhas da minha árvore, paz, amor, sorte e prosperidade. Hoje e sempre. Simplesmente porque cada pessoa que passa na nossa vida é única. Sempre deixa um pouco de si e leva um pouco de nós. Haverá os que levam muito, mas não haverá os que não nos deixam nada.

Esta é a maior responsabilidade da nossa vida e a prova evidente de que duas almas não se encontram por acaso.”

Conde Roberto

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍGLAS	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xxi
RESUMO.....	xxii
ABSTRACT.....	xxiv
CONTEXTUALIZAÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1 – Efeito da dieta hiperlipídica materna sobre os parâmetros metabólicos e autonômicos na prole.....	3
1.1 INTRODUÇÃO.....	3
1.2 OBJETIVOS.....	8
1.2.1. Objetivo geral.....	8
1.2.2. Objetivos específicos.....	8
1.3 METODOLOGIA.....	9
1.3.1. Modelos experimentais.....	9
1.3.2. Dietas.....	9
1.3.3. Delineamento experimental.....	10
1.3.4. Análises bioquímicas.....	11
1.3.5. Coleta de tecido adiposo.....	12
1.3.6. Preparação coração-bulbo-hipotálamo (<i>in situ</i>).....	12
1.3.7. Análise dos dados.....	14
1.4 RESULTADOS.....	15
1.4.1. Efeito da dieta hiperlipídica materna antes e durante gestação e lactação sobre os parâmetros metabólicos nas ratas.....	15

1.4.2. Efeito da obesidade materna sobre os parâmetros metabólicos na prole.....	17
1.4.3. Efeito da ativação do quimio e barorreflexo e da transecção pré-colicular sobre a atividade simpática e respiratória na prole de ratas submetidas à dieta hiperlipídica antes e durante gestação e lactação.....	20
1.5 DISCUSSÃO.....	29
1.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	35
CAPÍTULO 2 – Efeitos da ocitocina sobre a reatividade vascular e seu papel nas respostas induzidas pela hipernatremia.....	36
2.1 INTRODUÇÃO.....	51
2.2 OBJETIVOS.....	39
2.2.1. Objetivo geral.....	39
2.2.2. Objetivos específicos.....	39
2.3 METODOLOGIA.....	40
2.3.1. Modelos Experimentais.....	40
2.3.2. Análise molecular da expressão do gene para receptor de ocitocina na artéria renal.....	40
2.3.3. Efeito da ocitocina na resistência vascular renal.....	41
2.3.4. Efeito da ocitocina em anéis de artéria renal.....	43
2.3.5. Efeito do antagonista de receptores de ocitocina e desnervação renal nas respostas cardiovasculares e renais induzidas pela infusão de salina hipertônica.....	44
2.3.6. Análise molecular do peptídeo natriurético atrial no coração.....	45
2.3.7. Análise dos dados.....	46

2.4 RESULTADOS.....	47
2.4.1. Expressão do gene para receptor de ocitocina na artéria renal.....	47
2.4.2. Efeito da ocitocina na resistência vascular renal e em anéis de artérias renais.....	47
2.4.3. Efeito do bloqueio dos receptores de ocitocina e de vasopressina na vasodilatação renal e relaxamento vascular induzida pela ocitocina.....	51
2.4.4. Efeito da infusão de solução salina hipertônica na concentração de sódio plasmático e hemoglobina no sangue.....	54
2.4.5. Efeitos do bloqueio dos receptores de ocitocina e da desnervação renal sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela infusão de salina hipertônica.....	55
2.4.6. Efeitos do bloqueio dos receptores de ocitocina e da desnervação renal sobre a excreção urinária induzida pela infusão de salina hipertônica.....	58
2.4.7. Efeito do antagonista de receptores de ocitocina na expressão de RNAm para ANP cardíaco.....	59
2.5 DISCUSSÃO.....	61
2.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	65
CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
ANEXOS.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abd	Abdominal
AgRP	Proteína relacionada ao peptídeo Agouti
ANG	Angiotensina
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ARC	Núcleo arqueado
AT	Atosiban
bpm	Bursts per minutes (disparos por minutos)
CaCl₂	Cloreto de cálcio
CEUA	Comissão ética de uso de animais
CO₂	Gás carbônico
COBEA	Colégio brasileiro de experimentação animal
CVR	Condutância vascular renal
DH	Dieta hiperlipídica
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Dieta padrão
EC50	Concentração que promove 50% do efeito máximo
EPM	Erro padrão da média
f PNA	Frequência da atividade do nervo frênico
FC	Frequência cardíaca
Fenil	Fenilefrina
FMDH	Filhotes machos descendentes de mães com acesso a dieta hiperlipídica
FMDP	Filhotes machos descendentes de mães com acesso a dieta padrão
FSR	Fluxo sanguíneo renal
H₂O	Água
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IL – 6	Interleucina – 6
IMC	Índice de massa corpórea
KCl	Cloreto de potássio
KCN	Cianeto de potássio

KH₂PO₄	Fosfato de potássio monobásico
MC3/4R	Receptor de melanocortina
MgSO₄	Sulfato de magnésio
MgSO₄.7H₂O	Sulfato de magnésio heptahidratado
mmHg	Milímetros de mercúrio
Na⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NTS	Núcleo do trato solitário
O₂	Gás oxigênio
OT	Ocitocina
OTR	Receptor de ocitocina
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PNA	Atividade do nervo frênico
POMC	Neurônios proopiomelanocorticotrópicos
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
qRT-PCR	quantitative real time - polymerase chain reaction
RNA	Ácido ribonucléico
RVL	Região rostral ventrolateral do bulbo
RX	Desnervação renal
SH	Salina hipertônica
SNA	Atividade simpática
SNC	Sistema nervoso central
SRA	Sistema renina-angiotensina
TNF – α	Fator de necrose tumoral alfa
UFG	Universidade Federal de Goiás
UNESP	Universidade Estadual Paulista
VP	Vasopressina
α – MSH	Alfa-melanócito

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Macronutrientes presentes na dieta padrão (DP; A) e na dieta hiperlipídica (DH; B). Os valores estão expressos como porcentagem. “Outros” inclui celulose, água, sódio, etc.....	10
Figura 2	Esquema do delineamento experimental. “E” representa o período embrionário e “P” representa o período pós-natal.....	11
Figura 3	Esquema da preparação <i>in situ</i> coração bulbo-hipotálamo, conforme descrito em detalhes anteriormente. Modificado de Zoccal <i>et al.</i> , 2009.....	13
Figura 4	Valores da massa relativa dos tecidos adiposos ovarianos (A), retroperitoneal (B) e mesentérico (C) das ratas submetidas à Dieta Padrão (DP; n=6) e Dieta Hiperlipídica (DH; n=6) por um período de 6 semanas prévias (pré-gestacional) e durante gestação e lactação. m.c: massa corporal. Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados através do Teste <i>t</i> de Student não pareado; * diferente do DP; $p < 0,05$	16
Figura 5	Análises bioquímicas: Valores séricos de colesterol total (A), HDL (B), triacilgliceróis (C) e glicose (D) das ratas submetidas à Dieta Padrão (DP; n=5) e Dieta Hiperlipídica (DH; n=6) por um período de 6 semanas prévias (pré-gestacional) e durante gestação e lactação. Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro	

	padrão da média e foram analisados através do Teste <i>t</i> de Student não pareado; * diferente do DP; $p < 0,05$	17
Figura 6	Valores das massas relativas dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B) e mesentérico (C) dos FMDP (n=12) e FMDH (n=8) durante período prévio de 6 semanas (pré-gestacional) e durante gestação e lactação. m.c: massa corporal. Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados através do Teste <i>t</i> de Student não pareado. *Diferente de FMDP; $p < 0,05$	18
Figura 7	Análises bioquímicas: Valores séricos de colesterol total (A), HDL (B), triacilgliceróis (C) e Glicose (D) dos FMDP (n=12) e FMDH (n=8) durante período prévio de 6 semanas (pré-gestacional) e durante gestação e lactação. Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados através do Teste <i>t</i> de Student não pareado. *Diferente de FMDP; $p < 0,05$	19
Figura 8	Traçados representativos do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (f PNA e PNA), simpático torácico (f SNA e SNA) e abdominal (f ABD e ABD), em resposta a infusão de cianeto de potássio (KCN 30 μ g/60 μ L), nos FMDP (A) e FMDH (B) e os efeitos do KCN sobre a atividade nervosa simpática (SNA; C), atividade abdominal (ABD; D), frequência e amplitude da atividade do nervo frênico (PNA; E e F) nos FMDP (n=11) e	

FMDH (n=7). A barra em cinza representa o momento da resposta ao KCN. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média da variação percentual e foram analisados por análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). * Diferente do basal; # Diferente do FMDP; $p < 0,05$ 21

Figura 9 Traçados representativos do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (f PNA e PNA), simpático torácico (f SNA e SNA) e abdominal (f ABD e ABD), em resposta à hipercapnia (10% CO₂), nos FMDP (**A**) e FMDH (**B**) e os efeitos da hipercapnia sobre a atividade simpática (SNA; **C**), atividade abdominal (ABD; **D**), frequência e amplitude da atividade do nervo frênico (PNA; **E** e **F**) nos FMDP (n=11) e FMDH (n=7). A barra em cinza representa o momento da resposta à hipercapnia. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média da variação percentual e foram analisados por análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). * Diferente do basal; # Diferente do FMDP; $p < 0,05$ 23

Figura 10 Traçados representativos do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (f PNA e PNA), simpático torácico (f SNA e SNA) e abdominal (f ABD e ABD), em resposta a infusão de fenilefrina (Fenil - 10 μ g/100 μ L), nos FMDP (**A**) e FMDH (**B**) e os efeitos da infusão de fenilefrina sobre a atividade simpática (SNA; **C**), atividade abdominal (ABD; **D**), frequência e amplitude da

atividade do nervo frênico (PNA; **E** e **F**) nos FMDP (n=11) e FMDH (n=7). A barra em cinza representa o momento da resposta à fenilefrina. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média da variação percentual e foram analisados por análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). * Diferente do basal; # Diferente do FMDP; $p < 0,05$ 25

Figura 11 Traçado representativo do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (f PNA e PNA), simpático torácico (f SNA e SNA) e abdominal (f ABD e ABD) antes e após transecção pré-colicular (**A**) e seus efeitos sobre a atividade simpática (SNA; **B**), atividade abdominal (ABD; **C**), frequência e amplitude da atividade do nervo frênico (PNA; **D** e **E**) nos FMDP (n=11). A SNA e ABD foram expressas como média $\pm$ erro padrão da média da variação percentual. A frequência da PNA foi expressa como média $\pm$ erro padrão da média da frequência instantânea (bpm). A amplitude da PNA foi expressa como média $\pm$ erro padrão da média dos valores em microvolts (μV). Os valores foram analisados através do Teste *t* de Student pareado; * diferente do Basal; $p < 0,05$ 27

Figura 12 Traçado representativo do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (f PNA e PNA), simpático torácico (f SNA e SNA) e abdominal (f ABD e ABD) antes e após transecção pré-colicular (**A**) e seus efeitos sobre a atividade simpática (SNA; **B**), atividade

abdominal (ABD; **C**), frequência e amplitude da atividade do nervo frênico (PNA; **D e E**) nos FMDH (n=7). A SNA e ABD foram expressas como média $\pm$ erro padrão da média da variação percentual. A frequência da PNA foi expressa como média $\pm$ erro padrão da média da frequência instantânea (bpm). A amplitude da PNA foi expressa como média $\pm$ erro padrão da média dos valores em microvolts (μ V). Os valores foram analisados através do Teste *t* de Student pareado..... 28

Figura 13 Curva de melting mostrando a expressão gênica específica do OTR nas artérias renais de ratos após análise de qRT-PCR. Foi utilizada a expressão gênica da β -actina como controle..... 48

Figura 14 **A.** Traçado típico das alterações nos parâmetros cardiovasculares induzidos por injeção intravenosa de veículo (0,1 mL de NaCl 0,15 M) e ocitocina (0,008; 0,016 e 0,03 mg/kg, i.v.) em ratos anestesiados. **B.** Efeito da infusão de ocitocina ou do veículo na condutância vascular renal (RVC) em ratos anestesiados (n=6). A linha tracejada indica a injeção de ocitocina. PA = pressão arterial, PAM = pressão arterial média, FSR = fluxo sanguíneo renal, CVR = condutância vascular renal. * $p < 0,05$ em relação ao veículo..... 49

Figura 15 **A.** Traçado típico mostrando o relaxamento dose dependente induzido pela ocitocina em anéis de artéria renal de ratos. **B.** Curva de concentração-resposta do relaxamento da artéria renal isolado induzida pela oxitocina ($0,3 \times 10^{-6}$ até 3×10^{-6} M; n=6

- anéis feitos a partir de 5 ratos). A linha tracejada indica o momento de indução pela ocitocina..... 50
- Figura 16** Traçado típico mostrando as alterações nos parâmetros cardiovasculares induzidas pela infusão intravenosa de ocitocina (OT - 0,03 mg/kg, i.v.; em 0,1 mL) antes e após administração do antagonista de OT (Atosiban; 40 mg/kg, i.v.; **A**) ou antagonista de VP (Composto de Manning; 10 mg/kg, i.v.; **C**). Efeitos da infusão de veículo ou OT (0,008; 0,016 e 0,03 mg/kg, i.v.) antes e após a administração do antagonista de OT (**B**) e do antagonista de VP (**D**) sobre a condutância vascular renal (RVC; n=6). Os resultados são expressos como a média $\pm$ E.P.M. A linha pontilhada indica a infusão de OT. PA = pressão arterial, PAM = pressão arterial média, FSR = fluxo sanguíneo renal e CVR = condutância vascular renal. *Diferente do veículo (NaCl 0,15 M). † Diferente da OT. Ambos $p < 0,05$ 51
- Figura 17** Traçado típico mostrando o efeito do antagonista de OTR (**A**) e do antagonista do receptor de VP (**B**) sobre a relaxamento induzido pela OT (1 μ M) em anéis de artéria renal. Efeitos do pré-tratamento com antagonista de OT (**C**) e antagonista de VP (**D**) sobre o vasorelaxamento renal induzido por OT. † Diferente da OT, $p < 0,05$ 53
- Figura 18** Efeitos do tratamento com antagonista de OTR (Atosiban; AT), desnervação renal (RX) e a combinação de Atosiban com a desnervação renal (RX + AT), nas mudanças na concentração de

sódio plasmático (**A**) e hemoglobina no sangue (**B**) induzida pela infusão de SH (NaCl 3 M, 1,8 mL/kg, i.v.). As barras pretas indicam o momento da infusão de SH. *Diferente do basal. † Diferente do grupo controle, $p < 0,05$. Dados apresentados na tese de doutorado de Pedrino *et al.*, 2009..... 55

Figura 19 Efeitos do tratamento com antagonista de OTR (Atosiban; AT), desnervação renal (RX) e a combinação de Atosiban com a desnervação renal (RX + AT), nas mudanças cardiovasculares induzidas pela infusão de SH (NaCl 3 M, 1,8 mL/kg, i.v.). **A**) pressão arterial média (PAM). **B**) frequência cardíaca (FC). **C**) Fluxo sanguíneo renal (FSR). **D**) condutância vascular renal (CVR). As barras pretas indicam o momento da infusão de SH. As barras vermelhas indicam o período de infusão do antagonista de OTR ou solução salina (0,15 M de NaCl; Gupos Controle e Rx). * Diferente do basal. † Diferente do controle. \$ Diferente do Atosiban. # Diferente do RX, $p < 0,05$. Dados apresentados na tese de doutorado de Pedrino *et al.*, 2009..... 56

Figura 20 Efeitos do tratamento com antagonista de OTR (Atosiban; AT), desnervação renal (RX) e a combinação de Atosiban com a desnervação renal (RX + AT), nas mudanças urinárias induzidas pela infusão de SH (NaCl 3 M, 1,8 mL/kg, i.v.). **A**) Fluxo urinário. **B**) Concentração de sódio. **C**) Cumulativa urinária de sódio. **D**) Balanço de sódio. As barras pretas indicam o momento da infusão de SH. As barras vermelhas indicam o período de infusão

do antagonista de OTR ou solução salina (0,15 M de NaCl; Gupos Controle e Rx). *Diferente do basal. † Diferente do controle. \$ Diferente do Atosiban. # Diferente do RX, $p < 0,05$. Dados apresentados na tese de doutorado de Pedrino *et al.*, 2009..... 59

Figura 21 Efeito do bloqueio de OTR (Atosiban) sobre a expressão do RNAm do peptídeo natriurético atrial (ANP) em coração de ratos submetidos a infusão de SH (3 M de NaCl, 1,8 mL/kg, i.v. Os níveis de RNAm para ANP foram avaliadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão das triplicatas dos experimentos independentes. † Diferente do controle, $p < 0,05$ 60

LISTA DE TABELAS

Tabelas 1	Valores de massa inicial, massa após 6 semanas prévias com dieta (antes do acasalamento), massa final (1 semana após o desmame), ingestão alimentar diária e ingestão calórica diária (das 6 semanas iniciais) das ratas submetidas a Dieta Padrão (DP) e Dieta Hiperlipídica (DH) antes e durante gestação e lactação.....	16
Tabela 2	Valores da massa no desmame (dia 21) e massa final (dia 28) dos filhotes machos de mães submetidas à dieta padrão (FMDP – n=12) e dieta hiperlipídica (FMDH – n=8) durante período prévio de 6 semanas (pré-gestacional) e durante gestação e lactação.....	19
Tabela 3	Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), fluxo sanguíneo renal (FSR) e condutância vascular renal (CVR) dos animais dos grupos atosiban (AT), com desnervação renal (RX), pré-tratados com atosiban e denervação renal (RX + AT) e controle.....	57
Tabela 4	Valores basais do fluxo urinário (FU), concentração de sódio ($[Na^+]$), cumulativa urinária de sódio ($C[Na^+]$), e balanço de sódio (BNa^+) dos animais dos grupos atosiban (AT), com desnervação renal (RX), pré-tratados com atosiban e denervação renal (RX + AT) e controle.....	59

RESUMO

A hipertensão arterial é uma das patologias mais comuns que afetam a população. Dentre os fatores que podem propiciar a hipertensão o comportamento alimentar ganha destaque no que se referem aos hábitos alimentares não saudáveis presentes na dieta ocidental. Sendo assim, o presente trabalho procurou avaliar alguns aspectos dessa patologia em diversas situações, e os temas foram discutidos de forma separada em dois capítulos. No primeiro momento avaliou-se o efeito da dieta hiperlipídica materna sobre os parâmetros metabólicos e autonômicos na prole. Sabe-se que a obesidade induzida pela dieta materna pode modificar os caminhos regulatórios centrais do feto, principalmente a regulação em longo prazo do apetite, porém nenhum trabalho procurou avaliar a influência da dieta hiperlipídica (DH) materna sobre os parâmetros cardiovasculares e autonômicos na prole. Ratas Holtzman adultas (280 - 300 g) foram divididas em dois grupos. Um grupo recebeu dieta padrão (DP) e o outro grupo DH. Os animais tiveram acesso livre a DP ou DH durante 6 semanas prévias (período de pré-gestação) e durante período de gestação e lactação. Todos os filhotes foram desmamados após 21 dias de vida e tiveram livre acesso a DP. Após uma semana alguns filhotes e as mães foram submetidos ao teste glicêmico e posteriormente eutanasiadas para retirada de tecido adiposo e sangue. Os outros filhotes foram submetidos à preparação coração-bulbo-hipotálamo (*in situ*). A DH aumentou o tecido adiposo nas ratas, mas foi capaz de alterar apenas as concentrações metabólicas de triacilgliceróis nesses animais. Filhotes machos de mães com DH (FMDH) apresentaram aumento no tecido adiposo, aumento nos níveis de colesterol total e nos níveis de HDL. Filhotes machos de mães com DP (FMDP) apresentaram redução da atividade simpática após transecção pré-colicular. Esse efeito não foi observado nos FMDH. A infusão de KCN provocou aumentos similares entre FMDP e FMDH quanto à atividade abdominal (ABD), na frequência do nervo frênico (f PNA) e na atividade simpática torácica (SNA), porém, no grupo FMDH esse aumento na SNA foi menor. O KCN provocou um aumento na amplitude do nervo frênico (PNA) sendo maior em FMDH. A hipercapnia provocou nos filhotes um aumento na SNA, na ABD e na PNA e gerou uma diminuição na f PNA em ambos os grupos. A diminuição na f PNA foi mais acentuada em FMDH e o aumento da PNA foi maior em FMDH. A fenilefrina

provocou nos dois grupos uma diminuição na SNA, na ABD e na PNA, e gerou um aumento na f PNA. A simpatoinibição foi maior em FMDH. Esses resultados sugerem que a DH materna durante desenvolvimento fetal provavelmente altera as conexões centrais na prole. No segundo momento avaliou-se os efeitos da ocitocina sobre a reatividade vascular e seu papel nas respostas induzidas pela hipernatremia. Sabe-se que alterações no volume e/ou na composição dos compartimentos extracelulares evocam várias respostas autonômicas, cardiovasculares e hormonais que atuam em conjunto para modular a excreção renal de água e sódio. Os principais ajustes vegetativos são: vasodilatação renal e secreção de ocitocina. A regulação da osmolaridade e do volume é fundamental para sobrevivência. Apesar do vasto conhecimento na área nenhum estudo avaliou a interação entre a atividade simpática renal e a secreção de ocitocina sobre as respostas renais e cardiovasculares induzidas pela sobrecarga de sódio. Ratos Wistar machos (280-350 g) foram anestesiados e instrumentalizados para implantação de cateteres na bexiga, na veia e na artéria femoral e também para medição da pressão arterial média (PAM) e fluxo sanguíneo renal (FSR). Em ratos anestesiados (n = 6), a infusão de OT (0,03 µg/kg, i.v.) induziu vasodilatação renal. Em experimentações *ex vivo* a OT causou relaxamento da artéria renal. O bloqueio dos receptores de OT (OTR) reduziu essas respostas à OT, indicando um efeito direto desse peptídeo em seu receptor nesta artéria. O bloqueio dos receptores de ocitocina e a desnervação renal reduziu a vasodilatação renal e natriurese induzida pela sobrecarga de sódio aguda e a combinação do antagonista de receptores de ocitocina e a desnervação renal aboliram completamente a vasodilatação renal e reduziram ainda mais a natriurese induzida pela hipernatremia. Estes resultados sugerem que a OT e os nervos renais estão envolvidos na vasodilatação renal e natriurese induzida por hipernatremia aguda. O amplo conhecimento na área e a compreensão dos mecanismos regulatórios ativados tanto durante a obesidade quanto durante hiperosmolaridade permite uma maior possibilidade de desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas para a prevenção e tratamento da hipertensão.

Palavras chave: Dieta hiperlipídica; metabolismo; adiposidade; hipernatremia; ocitocina; nervos renais.

ABSTRACT

Hypertension is the most common pathologies which affect population. Of the factors that can promote hypertension, food behavior is highlighted in relation to unhealthy eating habits present in western diet. Thus, present study sought to evaluate some aspects of this pathology in several situations, and themes were discussed separately in two chapters. In the first moment, effect of maternal hyperlipidic diet on metabolic and autonomic parameters in offspring was evaluated. It is known which obesity induced by maternal diet can modify central regulatory pathways of the fetus, mainly long-term regulation of appetite, but no work sought to evaluate the influence of the maternal hyperlipidic diet (HD) on cardiovascular and autonomic parameters in the offspring . Female Holtzman rats (280-300 g) were divided into two groups. One group received standard diet (SD) and other HD. The animals had free access to SD or HD for 6 weeks prior and during gestation and lactation period. All pups were weaned after 21 days of life and had free access to SD. After one week some offspring and mothers were submitted to glycemic test and later euthanized for removal of adipose tissue and blood. Other offspring were submitted to *in situ* preparation. DH increased adipose tissue in all females, but was able to change only metabolic triacylglycerols concentration. Offspring of HFD dams (OffHFD) showed an increase in adipose tissue and total cholesterol and HDL levels. Offspring of SD dams (OffSD) showed decrease in sympathetic activity after pre-colicular transection. This effect was not observed in males offspring of mothers with HFD (OffHFD). KCN infusion caused similar increases in abdominal activity (ABD), in phrenic nerve frequency (PNA f) and sympathetic activity (SNA), but in OffHFD this increase in SNA was smaller. KCN caused increase in phrenic nerve amplitude (PNA) and was higher in OffHFD. Hypercapnia resulted in increase in SNA, ABD and PNA and decrease in PNA f in both groups. The decrease in PNA f was more pronounced in OffHFD and increased PNA was higher in OffHFD. Phenylephrine caused in both groups decrease in SNA, ABD and PNA, and generated an increase in PNA f. The reduction of SNA was higher in OffHFD. These results suggest that maternal HFD during fetal development alters central connections in offspring. In second moment oxytocin effects on vascular reactivity and its role in hypernatremia-induced responses were evaluated. Changes in volume and/or extracellular compartments composition are

known to evoke various autonomic, cardiovascular and hormonal responses that to modulate renal excretion of water and sodium. The main vegetative adjustments are: renal vasodilation and oxytocin secretion. Regulation of osmolarity and volume is critical for survival. Despite knowledge, no study evaluated interaction between renal sympathetic activity and oxytocin secretion on renal and cardiovascular responses induced by sodium overload. Male Wistar rats (280–350 g) were anesthetized with sodium thiopental (40 mg/kg, i.v.). Animals were also instrumented for measurement of mean arterial pressure (MAP) and renal blood flow (RBF). Renal vascular conductance (RVC) was calculated as the ratio of RBF by MAP. In anesthetized rats (n = 6), OT infusion (0.03 µg/kg, i.v.) induced renal vasodilation. *Ex vivo* experiments demonstrated that OT caused renal artery relaxation. Blockade of OT receptors (OTR) reduced these responses to OT, indicating a direct effect of this peptide on OTR on this artery. Hypertonic saline (3 M NaCl, 1.8 ml/kg b.wt., i.v.) was infused over 60 s. In sham rats (n=6), hypertonic saline induced renal vasodilation. The OXTR antagonist (AT; n=7) and renal denervation (RX) reduced the renal vasodilation induced by hypernatremia. Atosiban with renal denervation (RX+AT; n=7) completely abolished renal vasodilation induced by sodium overload. Intact rats excreted 51% of the injected sodium within 90 min. Natriuresis was slightly blunted by atosiban and renal denervation (42% and 42% of load, respectively), whereas atosiban with renal denervation reduced sodium excretion to 16% of the load. These results suggest that OT and renal nerves are involved in renal vasodilation and natriuresis induced by acute plasma hypernatremia. The understanding of regulatory mechanisms activated both during obesity and during hyperosmolarity allows greater possibility development new therapeutic tools for hypertension prevention and treatment.

Keywords: Hyperlipidic diet; metabolism; adiposity; hypernatremia; oxytocin; renal nerves.

CONTEXTUALIZAÇÃO

A hipertensão arterial, que é caracterizada como o aumento exacerbado e sustentado da pressão arterial ($PA \geq 140 \times 90\text{mmHg}$), é uma das patologias mais comuns que afetam o ser humano e aumenta o risco de aparecimento de outras doenças como infarto e insuficiência cardíaca congestiva. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, essa doença é responsável por aproximadamente 17,7 milhões de mortes por ano, representando 31% do total geral de óbitos (1,2). No Brasil, sua prevalência varia entre 22% e 44% para adultos, mais de 50% para indivíduos com 60 a 69 anos e 75% em indivíduos com idade superior a 70 anos (2). Dessa forma, a maior compreensão da fisiopatologia da hipertensão arterial é essencial para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas eficientes que visam aumentar a expectativa de vida dos pacientes e diminuir os gastos públicos relacionados a esta patologia.

A hipertensão é frequentemente associada às alterações funcionais e/ou estruturais dos órgãos-alvo (coração, cérebro, rins e vasos sanguíneos) e às alterações metabólicas (2). Apesar da origem da hipertensão ainda não ter sido completamente elucidada, algumas evidências clínicas e experimentais têm demonstrado a participação do sistema nervoso no desenvolvimento dessa doença em humanos e em modelos animais de hipertensão (3–6).

Duas linhas científicas tentam discutir os possíveis mecanismos para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão: a linha “Guytoniana” defendendo a hipótese de que alterações na função renal poderiam desencadear a hipertensão, e a linha “neurogênica” que acredita que alterações em áreas do sistema nervoso central (SNC) levariam a alterações no sistema nervoso autônomo gerando então a hipertensão. Porém, a hipertensão é uma doença multifatorial e que também pode ser influenciada por outros fatores como, por exemplo, predisposição genética, alimentação e inatividade física (7–11). Dessa forma, acredita-se que ambas as linhas de pesquisa sejam importantes para o entendimento dessa patologia. Dentre os inúmeros fatores que podem levar a hipertensão o comportamento alimentar ganha destaque no que se referem aos hábitos alimentares não saudáveis presentes na população mundial e que tem propiciado um número cada vez maior

de casos de hipertensão. Dentre esses hábitos não saudáveis destaca-se o alto consumo de uma dieta rica em gordura, que pode levar ao desenvolvimento da obesidade, e o alto consumo de uma dieta rica em sódio. Ambos podem ocasionar o desenvolvimento a longo prazo da hipertensão.

Já tem sido demonstrado em estudos clínicos ou experimentais que a obesidade provoca hipertensão por um aumento na reabsorção de sódio, devido a uma disfunção renal, alteração da relação pressão renal e natriurese, e também por modificações no sistema nervoso central (SNC) que podem resultar no aumento da atividade nervosa simpática (SNA) sobre vários órgãos como rins, vasos sanguíneos e coração (7,12–14). Outro aspecto importante a se destacar é que existem cada vez mais evidências de que a obesidade materna, principalmente induzida por dieta hiperlipídica, contribui fortemente para o desenvolvimento da obesidade infantil, aumentando a possibilidade de aparecimento de doenças na idade adulta como a hipertensão (10,15).

Outros estudos experimentais e epidemiológicos têm demonstrado que a dieta com alto teor de sódio é um importante fator contribuinte para o desenvolvimento da hipertensão (16–19). Aumentos da pressão arterial têm sido descritos em populações com altos consumos de sódio em suas dietas (17). Outra importante observação é que o comprometimento dos mecanismos de ajustes fisiológicos como, por exemplo, a redução da atividade simpática renal (20), vasodilatação renal (21,22) e secreção de ocitocina (23,24), que são ativados durante a hiperosmolaridade (provocada por um aumento na concentração plasmática de sódio), está associado com doenças cardiovasculares, em especial a hipertensão.

Sabendo da importância dessas alterações fisiológicas na ocorrência da hipertensão e que essa patologia já afeta grande parte da população mundial, o presente trabalho procurou avaliar alguns aspectos dessa patologia em diversas situações, e os temas foram discutidos de forma separada em dois capítulos. No primeiro momento avaliou-se o efeito da dieta hiperlipídica materna sobre os parâmetros metabólicos e autonômicos na prole e no segundo momento os efeitos da ocitocina sobre a reatividade vascular e seu papel nas respostas induzidas pela hipernatremia.

Capítulo 1

Efeito da dieta hiperlipídica materna sobre os parâmetros metabólicos e autonômicos na prole

1.1 Introdução

A obesidade provoca sérias consequências físicas, sociais e psicológicas e é caracterizada como uma doença multifatorial que abrange uma complexa interação entre fatores comportamentais, culturais, epigenéticos, metabólicos, e psicológicos e por esse motivo, sua etiologia não é de fácil identificação (15,25–28). A obesidade mundial quase triplicou desde 1975. Em 2016, mais de 1,9 bilhões de adultos, com 18 anos de idade, apresentavam excesso de peso (representando 39%). Destes, mais de 650 milhões eram obesos (13%). Neste mesmo período 41 milhões de crianças menores de 5 anos e mais de 340 milhões de crianças e adolescentes de 5 a 19 anos tinham sobrepeso ou obesidade em 2016 (29). Segundo dados divulgados pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no Brasil a incidência de obesidade é de 20,8% da população adulta, sendo que o percentual é mais alto entre as mulheres (24,4% contra 16,8% dos homens) e o sobrepeso atinge mais da metade (56,9%) dos adultos em todo o país (30).

A epidemia da obesidade não é apenas uma ameaça para a saúde da população, mas afeta a sustentabilidade financeira, elevando os custos médicos nos serviços de saúde pública, e afetando os custos indiretos e sociais, tais como: diminuição da qualidade de vida, problemas de ajustes sociais e perda de produtividade (31,32).

A obesidade tem contribuído fortemente para um aumento dos casos de hipertensão arterial que já atingiu aproximadamente 21,4% da população brasileira acima de 18 anos, o que corresponde à 31,3 milhões de indivíduos (30) aumentando o risco de doenças coronarianas, infarto e de insuficiência cardíaca congestiva. Nos últimos anos o melhor entendimento da fisiopatologia da co-ocorrência de obesidade e hipertensão está sendo o foco de diversos estudos nessa área (33,34). Alguns autores tem evidenciado que a obesidade visceral induz hipertensão por disfunção

renal (aumento na reabsorção de sódio), comprometimento da relação entre pressão renal e natriurese, alterações no funcionamento do SNC, resultando em aumento na SNA sobre órgãos alvo como vasos sanguíneos, rins e coração (7,12,14), e disfunções respiratórias (35,36).

Alguns estudos tem demonstrado que vários fatores, que podem ter interação entre si, atuam como facilitadores da hipertensão derivada da obesidade, como por exemplo, a ativação do sistema renina-angiotensina (SRA) periférico e no SNC, processo inflamatório crônico de baixa intensidade na periferia e no SNC e maiores níveis de leptina (37–44). Esses fatores promovem o aumento da atividade do sistema nervoso simpático e/ou reduções na função do barorreflexo, com consequente aumento da pressão arterial (12,14,40,41,43–46).

Estudos realizados nos últimos 50 anos demonstraram claramente a importância do SNC e do SRA no controle cardiovascular, principalmente no que se refere aos ajustes da pressão arterial tanto em condições normais quanto em fisiopatologias como hipertensão essencial ou secundária associada à obesidade (12,39,47). Evidências experimentais mostram que o SRA regula a atividade do sistema imune na periferia e no SNC. Alguns estudos já evidenciaram a ocorrência de uma neuroinflamação relacionada com o desenvolvimento e manutenção da hipertensão arterial em ratos obesos (34). Em animais obesos, uma inflamação crônica periférica (42) bem como em algumas regiões do SNC, como no hipotálamo (39,48), tem sido descrita. Pelo menos em regiões prosencefálicas, a maior atividade do SRA parece promover uma ativação crônica de micróglias no hipotálamo e uma astrogliose [células imunes residentes do SNC (34,49)], contribuindo para o aumento de fatores inflamatórios nestes núcleos (39,48).

Além da maior ativação do SRA, há um significativo aumento nos níveis séricos de leptina durante a obesidade (50–52) e parece haver uma forte interação entre eles, uma vez que a ativação do SRA aumenta os níveis de leptina (53) e o bloqueio de receptores AT1 no prosencéfalo reduz seu efeito simpatoexcitatório (37). A leptina é liberada principalmente pelos adipócitos (tecido adiposo branco), um órgão endócrino responsável não apenas pelo armazenamento de energia, mas também pela síntese e liberação de diversas outras substâncias, tais como adiponectina, fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), alguns hormônios sexuais, e interleucina-6.

Outros órgãos também produzem leptina, porém em menor quantidade, são eles: estômago, placenta e glândulas mamárias (54–56).

Sabe-se que, em indivíduos não obesos, altos níveis de leptina reduzem a ingestão alimentar. Isso ocorre através da ligação da leptina ao seu receptor Ob-Rb que faz parte da família de receptores das citocinas, que ativa o sistema JAK/STAT de transdução do sinal (57,58). A leptina reduz o apetite principalmente através da inibição da liberação do neuropeptídeo Y (NPY) e o peptídeo relacionado à proteína Agouti (AGRP), que são peptídeos orexígenos (59). Além disso, a leptina atua em neurônios pro-opiomelanocorticotrópicos (POMC) no hipotálamo, que uma vez ativados promovem a liberação do hormônio estimulante alfa-melanócito (α -MSH), os quais ativam receptores de melanocortina (MC3/4R) (12,60). A ativação desse sistema no SNC além de inibir o apetite, promove aumento da atividade simpática, da frequência cardíaca e da pressão arterial (12,13,37,61,62). Além da sua ação sobre o controle da ingestão alimentar e ativação da atividade simpática, alguns trabalhos tem demonstrado que a leptina também pode atuar sobre neurônios localizados no bulbo, modulando a atividade respiratória (63). Receptores de leptina foram encontrados em diversas regiões do SNC, incluindo o hipotálamo e o tronco encefálico (64).

Quando os primeiros trabalhos demonstraram que a administração exógena de leptina em camundongos *ob/ob* (obesos) provocava uma redução da hiperfagia e do peso corporal nesses animais, gerou-se uma grande expectativa acerca de sua utilidade no tratamento da obesidade em humanos. Porém, a administração exógena de leptina como tratamento da obesidade humana não reproduziu os resultados obtidos em animais de laboratório (65). Os indivíduos obesos apresentaram resistência à ação da leptina no SNC, o que explicaria o desenvolvimento da obesidade mesmo com altos níveis plasmáticos de leptina, porém, a resistência a leptina parece não afetar as vias de modulação da atividade simpática, por essa razão, os indivíduos obesos tornam-se hipertensos (12,66).

A prevalência de obesidade materna mais do que dobrou (7,6% para 15,6%) ao longo das últimas duas décadas (67). Há cada vez mais evidências de um papel causal da obesidade materna no desenvolvimento da obesidade infantil. Esta hipótese ganhou ainda mais força após relatos de uma associação entre o ganho de

peso excessivo na gravidez e o índice de massa corpórea (IMC) da criança ou do adolescente e de uma maior influência do IMC materno na adiposidade da prole (68,69). Estudos recentes demonstraram que 23,2% das crianças com idade inferior a 18 anos tem excesso de peso ou são obesas (70). A obesidade já afeta mais de 43 milhões de crianças com idades entre 0-5 anos em todo o mundo (71).

Há evidências de que a maior susceptibilidade à obesidade pode ocorrer como consequência de um "desenvolvimento programado" (72). Sabe-se que durante o período pré- e pós-natal, o SNC ainda está em fase de desenvolvimento e amadurecimento neuronal (73). Sendo assim, modificações durante essa fase podem influenciar de forma permanente as conexões neuronais, comprometendo as funções neurovegetativas e aumentando a possibilidade de aparecimento de doenças na idade adulta, como por exemplo o desenvolvimento de hipertensão arterial e obesidade (10,15,25,28,73–75).

Mecanismos epigenéticos que influenciam a expressão de genes têm sido propostos como mediadores dos efeitos da susceptibilidade à doença na prole (28,76,77). Estes mecanismos incluem alterações na metilação do DNA, modificações nas histonas, e na expressão de microRNAs, sem qualquer modificação na sequência de nucleotídeos do DNA. Esses mecanismos podem influenciar a expressão gênica durante os períodos de desenvolvimento intra-uterino e pós-natal precoce, predispondo indivíduos a um fenótipo obesogênico que persiste durante a idade adulta, levando a efeitos metabólicos negativos a longo prazo.

Os modelos se provaram indispensáveis na compreensão do desenvolvimento programado de doenças na fase adulta. Alguns são utilizados para indução de obesidade, possibilitando o estudo não somente da obesidade como também de suas co-morbidades como a hipertensão (78). Além dos modelos genéticos de obesidade como, por exemplo, ratos Zucker - com deleção do receptor de leptina (79) e o camundongos Ob/Ob - que não sintetiza a leptina (61) existem os modelos de obesidade que são induzidos por diferentes tipos de dieta, como a cafeteria (80), dieta padrão associada a uma solução de frutose (81) ou dieta hiperlipídica palatável, que consiste na combinação de dieta hiperlipídica com carboidratos simples (42,43,82). A dieta hiperlipídica palatável é semelhante à dieta rica em gordura e açúcar adotada nas sociedades ocidentais.

Alguns estudos evidenciaram que o consumo de uma dieta hiperlipídica induz alterações metabólicas, tais como hiperlipidemia, hiperleptinemia, aumento da glicemia, diminuição da sensibilidade à insulina, aumento da SNA, aumento da atividade do SRA, redução do barorreflexo e aumento da pressão arterial (12,42–44,83,84). E o alto consumo dessa dieta durante a gestação pode causar consequências na prole (85). Nesse sentido, já foi evidenciado experimentalmente que a prole de ratas obesas submetidas a um consumo prolongado de uma dieta hiperlipídica apresentavam hiperfagia, aumento da massa gorda e hiperleptinemia na vida adulta (86,87). Outros estudos indicam que o desequilíbrio nutricional durante a gravidez e a lactação pode levar a modificações permanentes da ingestão de alimentos devido à plasticidade no hipotálamo (88–95). Ademais, a prole adulta de camundongos com obesidade induzida por dieta hiperlipídica desenvolveu hipertensão arterial que foi associada com uma disfunção endotelial da artéria mesentérica (86). A hipertensão também foi associada com o aumento da adiposidade visceral e hiperleptinemia, sugerindo novamente a relação entre hipertensão e obesidade. Corroborando com esses achados, outro estudo do mesmo grupo demonstrou que a prole de ratas tratadas antes e durante a gestação e lactação com dieta hiperlipídica, apresentou aumento na pressão arterial, provavelmente devido a uma maior atividade simpática (96). Neste mesmo estudo, o efeito pressórico da leptina exógena estava aumentada e a sensibilidade ao barorreflexo diminuída (96).

Apesar do claro envolvimento da obesidade materna nas inúmeras alterações apresentadas pela prole, nenhum estudo avaliou o efeito da dieta hiperlipídica materna sobre a atividade simpática e respiratória na prole.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo geral:

Avaliar o efeito da dieta hiperlipídica materna administrada antes e durante gestação e lactação sobre os parâmetros metabólicos e autonômicos na prole.

1.2.2 Objetivos específicos:

Mais especificamente, procuramos:

- I. Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica materna sobre a glicemia, concentrações séricas de colesterol, triacilgliceróis, HDL e tecidos adiposos das ratas e da prole.
- II. Avaliar os efeitos da dieta hiperlipídica materna sobre a atividade simpática e respiratória na prole.

1.3 Metodologia

1.3.1 Modelos experimentais

Todos os protocolos apresentados a seguir estão de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão Ética e Uso de Animais (UNESP - CEUA, processos nº 20/2013)(Ver em anexo).

Foram utilizadas ratas e ratos Holtzman adultos com 3 meses de idade (280 - 350 g) procedentes do Biotério do Campus de Araraquara da UNESP. Todos os animais foram inicialmente mantidos em caixas plásticas coletivas (5 animais por caixa) com livre acesso a ração e água. Permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de doze horas (luzes acesas das 7 h às 19:00 h) durante todo o período experimental. Os animais ficaram habituados às condições do biotério durante uma semana antes do início dos experimentos. Os ratos machos ($n=15$) foram usados para reprodução e as ratas ($n=32$) para geração das proles.

1.3.2 Dietas

Duas dietas foram utilizadas no presente estudo, dieta padrão (DP) e dieta hiperlipídica (DH) palatável. A DP é composta por ração balanceada da marca Biobase® (Águas Frias, SC, Brasil) e contém: 23 g de proteína, 49 g de carboidrato, 4 g de gordura e 5 g de fibras a cada 100 g de ração, conforme fornecido pelo fabricante. A DH, foi preparada com ração Biobase®, amendoim torrado, chocolate ao leite e biscoito de maizena, na proporção de 3:2:2:1 (42,43,82) (Figura 1A). Esta DH contém 13 g de proteína, 40 g de carboidrato, 19 g de gordura e 4 g de fibra a cada 100 g de ração (Figura 1B), segundo exame bromatológico realizado com amostra da dieta. Todos os componentes desta dieta foram moídos, misturados e oferecidos aos animais em forma de pellets. O valor calórico das dietas foram, respectivamente, 2,25 kcal/g para a DP e 3,82 kcal/g DH. A massa corporal e a ingestão alimentar foram avaliadas 3 vezes por semana.

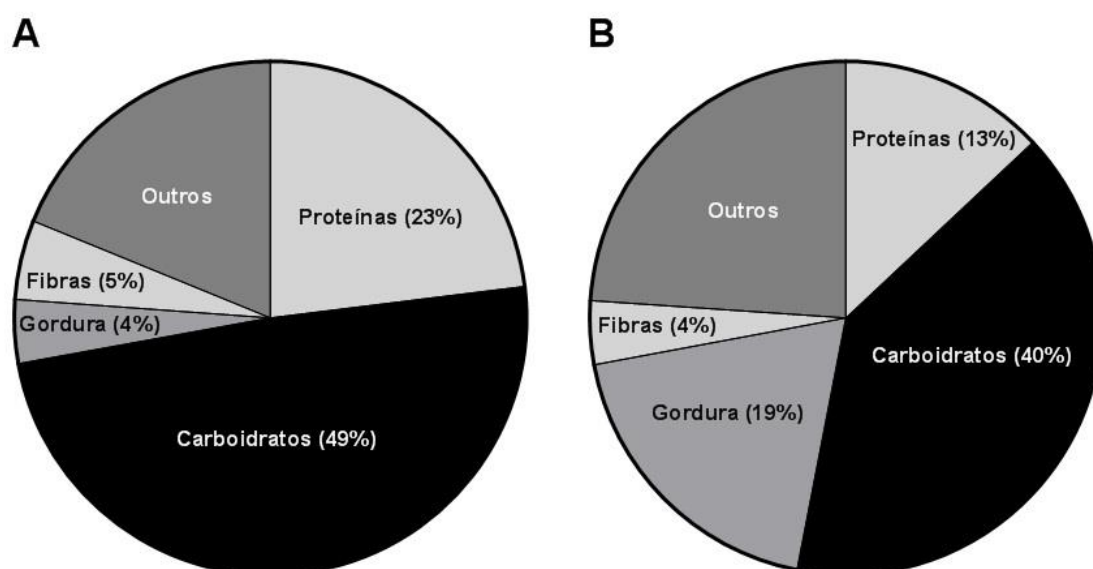


Figura 1: Macronutrientes presentes na dieta padrão (DP; **A**) e na dieta hiperlipídica (DH; **B**). Os valores estão expressos como porcentagem. “Outros” inclui celulose, água, sódio, etc.

1.3.3 Delineamento experimental

As ratas foram divididas em dois grupos: um grupo que tinha acesso a DP e outro grupo que tinha acesso a DH. As ratas foram submetidas à DP ou DH, dependendo do grupo, durante 6 semanas prévias (período pré-gestacional) e durante os períodos de gestação (21 dias) e lactação (21 dias) e foram mantidas na dieta até o dia da eutanásia (1 semana após desmame). Dias antes do período de acasalamento, foi realizado esfregaço vaginal nas fêmeas. Essa técnica consiste na coleta da secreção vaginal através de hastes flexíveis com ponta de algodão que foram inseridas cuidadosamente do orifício vaginal das fêmeas. Posteriormente, o material foi friccionado na lâmina histológica para visualização ao microscópio sem a necessidade do uso de lamínulas. A técnica foi usada para determinação do ciclo estral que permite a avaliação da atividade ovariana, a fim de investigar o dia em que as fêmeas estariam no estro, período em que elas apresentam receptibilidade ao macho. Uma vez averiguada, as fêmeas eram então colocadas juntas aos machos para cruzamento (três fêmeas e dois machos por caixa). No dia seguinte um novo esfregaço era realizado para confirmação de cópula através da presença de espermatozoides. As fêmeas com confirmação de cópula foram mantidas em caixas

individuais e alimentadas com as respectivas dietas, ou seja, DP ou DH dependendo do grupo.

A prole das ratas submetidas à DP ou DH foi pesada ao nascimento e no P28. Após 21 dias a prole foi desmamada, e foi ofertado para todos os filhotes a DP até terem atingido 28-32 dias onde apenas os machos foram submetidos à experimentação. As mães foram mantidas nas mesmas dietas que estavam recebendo previamente e foram eutanasiadas 1 semana após o desmame da prole (Figura 2). Todas as mães e um a 2 filhotes de cada ninhada foram submetidos à avaliação da glicemia e posteriormente eutanasiados para coleta de sangue e tecido adiposo e os outros machos da prole foram submetidos à preparação *in situ*, coração-bulbo-hipotálamo, conforme será descrito posteriormente.

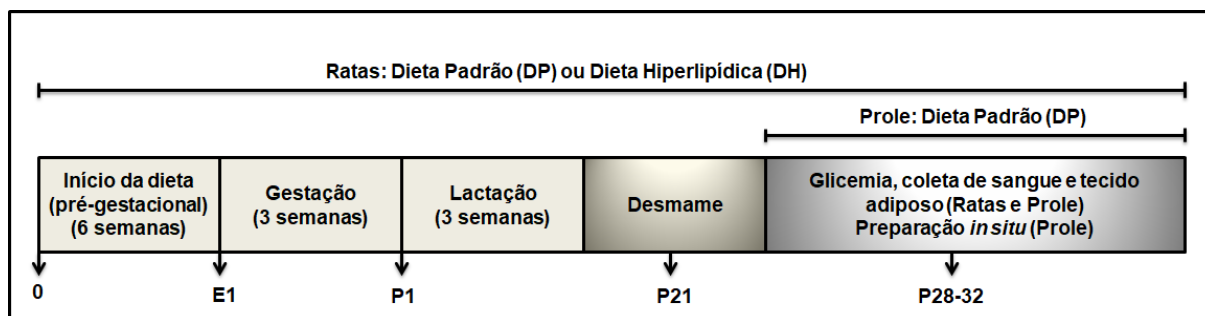


Figura 2: Esquema do delineamento experimental. “E” representa o período embrionário e “P” representa o período pós-natal.

1.3.4 Análises bioquímicas

Para realização do teste glicêmico os animais (mães e filhotes) ficaram em jejum por 8 horas e uma pequena amostra de sangue da veia caudal foi coletada e analisada por um kit de monitoramento de glicemia (Accu-Chek Active). Após 24 horas de recuperação os animais foram submetidos a um novo período de jejum, porém de 12 horas. Após jejum prolongado os animais foram decapitados para coleta de sangue troncular e retirada de tecido adiposo retroperitoneal, mesentérico, ovariano (mães) e epididimal (prole macho).

O sangue troncular foi centrifugado a 3000 rpm por 15 min e o soro foi armazenado a 4-8°C na geladeira por 2 dias. Foram realizadas as análises de triacilgliceróis (TGL), colesterol total e lipoproteínas de alta densidade (HDL). As concentrações séricas de TGL, colesterol total e HDL foram determinadas pelo

sistema de química seca, utilizando lâminas de vitros (vitros 250, Orto – Clinical Diagnostics, Johnson & Johnson) no laboratório de análises clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unesp.

1.3.5 Coleta de tecido adiposo

Os tecidos adiposos retroperitoneal, mesentérico, ovariano (mães) e epididimal (prole macho) foram imediatamente retirados e pesados após a eutanásia dos animais. A coleta de tecido adiposo foi realizada de acordo com as descrições de Cinti (2005).

1.3.6 Preparação coração-bulbo-hipotálamo (*in situ*)

Os filhotes machos de mães tratadas com DP e DH de ambos os protocolos experimentais foram submetidos à preparação *in situ*. Os animais foram decorticados e perfundidos artificialmente conforme descrito anteriormente por (97–99) (Figura 3). Os animais foram profundamente anestesiados com halotano (5%), sendo o grau de anestesia avaliado pela ausência de reflexo de retirada da pata ao pinçamento. A seguir foi realizada uma transecção total logo abaixo do diafragma, as vísceras removidas e, então, os animais foram submergidos em solução gelada (4°C) de Ringer (descrita abaixo). Os hemisférios cerebrais foram expostos pela remoção dos ossos parietais e os córtices cerebrais foram removidos até o tálamo por aspiração. A área pré-óptica, o núcleo septal e o hipotálamo foram preservados. A pele do animal foi removida para impedir que os pêlos obstruíssem o sistema de perfusão. Na sequência, o diafragma e a parte da caixa torácica foram retirados para acesso ao mediastino. O nervo frênico esquerdo foi isolado e os animais foram transferidos para uma câmara de registro. A perfusão da preparação foi realizada pela artéria aorta descendente, por meio de um cateter de dois lúmens. A partir de um dos lúmens, a preparação foi perfundida por meio de uma bomba peristáltica (Watson Marlow 505S, UK) com solução de Ringer (em mM: NaCl 120, NaHCO₃ 24, KCl 5, CaCl₂ 2,5, MgSO₄ 1,25, KH₂PO₄ 1,25 e glicose 10) contendo um agente oncótico (polietileno glicol, 1.5%, Sigma, Reino Unido), gaseificada constantemente com uma mistura carbogênica de 95% O₂ e 5% CO₂ (condição controle) ou de 90% O₂ + 10% CO₂ (condição hipercápica) e aquecida a 32°C e com pH 7,4. Antes de entrar na preparação, essa solução passou por um sistema de armadilha de bolhas

e por um filtro de nylon (tamanho do poro: 25 μm). O fluxo do sistema foi de 22 a 24 mL/min.

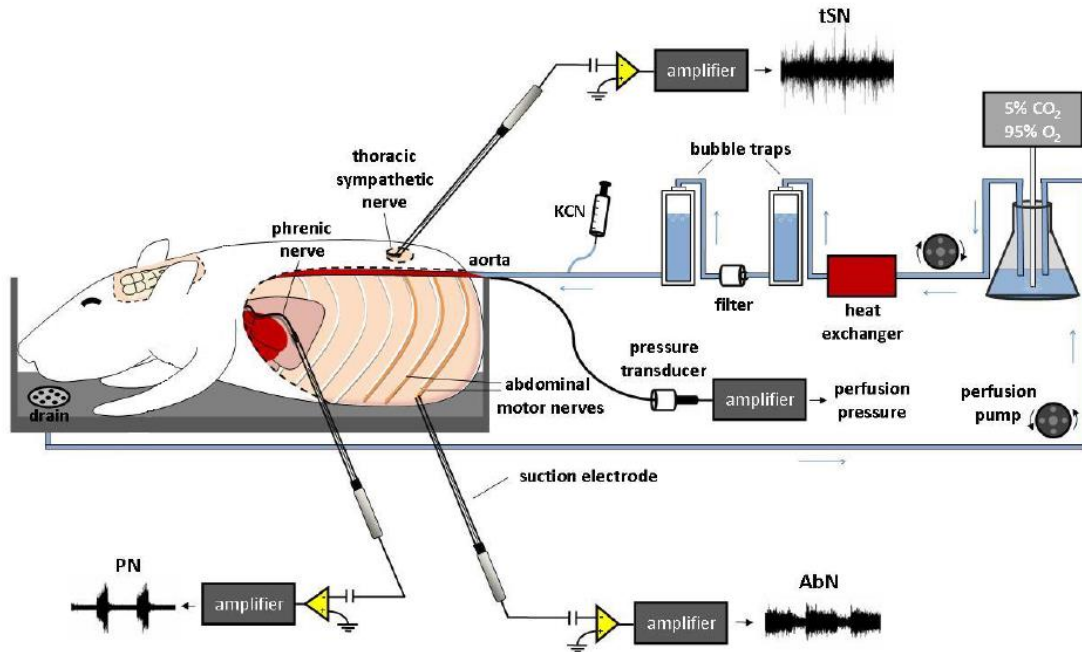


Figura 3: Esquema da preparação *in situ* coração bulbo-hipotálamo, conforme descrito em detalhes anteriormente. Modificado de (99).

Após o início dos movimentos respiratórios (movimentos da caixa torácica), um bloqueador neuromuscular (brometo de vecurônio, 40 $\mu\text{g/mL}$) foi adicionado à solução de perfusão para promover uma estabilização mecânica da preparação. O segundo lúmen da cânula foi usado para monitorar a pressão de perfusão da aorta. A atividade do nervo frênico (PNA) foi registrada na sua porção distal por meio de um eletrodo bipolar de sucção de vidro fixado em um micromanipulador 3D. O padrão em rampa e rítmico do PNA (padrão eupnêico) foi utilizado como um índice fisiológico da viabilidade da preparação *in situ*. A cadeia simpática torácica (T10-T12) foi visualizada através de um microscópio binocular e os registros foram feitos do coto distal do nervo usando um eletrodo de sucção de vidro bipolar. A viabilidade da SNA foi verificada pela presença de modulação respiratória e pelo seu aumento através da administração intra-arterial de cianeto de potássio (KCN; 30 $\mu\text{g}/60 \mu\text{L}$, injetada em *bolus*). O nervo abdominal foi registrado da mesma forma que os nervos anteriores por meio de eletrodo bipolar.

Os sinais foram amplificados (Neurolog NL104), filtrados (band-pass filter: 8 Hz–3 kHz) e adquiridos usando um sistema de aquisição de dados CED micro1401 A–D (CED, Cambridge Electronic Design, Cambridge, UK) e o software Spike 2 (CED) com *scripts* escritos para aquisição e análise dos dados. O ruído basal das preparações foi adquirido através do silenciamento completo dos nervos após desligamento do sistema de perfusão.

Os animais foram avaliados por um período basal de 20 min e submetidos a testes ao longo do experimento com um intervalo de 5-10 min entre cada estímulo. Inicialmente foi realizada a administração de KCN (30 µg/60 µL, injetada em *bolus*) para estimulação dos quimiorreceptores periféricos, seguido pela realização da hipercapnia (90% O₂ e 10% CO₂) por 5 min na solução de perfusão, para estimulação dos quimiorreceptores centrais, substituindo a mistura em normóxia (95% O₂ e 5% CO₂) posteriormente, e finalmente foi realizada a administração intra-arterial de fenilefrina (10 µg/100 µL, injetada em *bolus*), para estimulação dos barorreceptores. Após os testes foi realizada a transecção pré-colicular para avaliação da importância da região prosencefálica na modulação da atividade nos nervos descritos anteriormente.

Para a análise da SNA, PNA e Abd, foram avaliados a atividade basal média, expressa em % ou µV, antes e após transecção pré-colicular e variação percentual de cada estímulo realizado.

1.3.7 Análise dos dados

Os resultados foram apresentados como médias ± E.P.M. Os valores de perfil lipídico, tecido adiposo (ovariano, epididimal, mesentérico e retroperitoneal), ingestão calórica e basais foram analisados por teste *t* de Student para amostras independentes. Os valores das variações nas atividades dos nervos após o teste de baroreflexo e quimioreflexo periférico e central foram analisados por ANOVA de duas vias seguida do teste de Student-Newman-Keuls. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

1.4 Resultados

1.4.1 Efeitos da dieta hiperlipídica materna antes e durante gestação e lactação sobre os parâmetros metabólicos das ratas

Ratas Holtzman adultas que tiveram acesso a DP ou a DH apresentaram massas corpóreas similares no início, após 6 semanas de dieta e ao final do experimento (Tabela 1). As ratas submetidas a um período de 6 semanas prévias (pré-gestacional) de DH, apresentaram ingestão alimentar (g/dia) semelhante à das ratas com DP, porém, a ingestão calórica foi maior entre as ratas submetidas a DH quando comparadas as ratas submetidas a DP pelo mesmo período de tempo (DP: $42,7 \pm 1,5$ vs. DH: $69,0 \pm 1,9$ kcal/dia, $p < 0,05$; Tabela 1).

Tabela 1. Valores de massa inicial, massa após 6 semanas prévias com dieta (antes do acasalamento), massa final (1 semana após o desmame), ingestão alimentar diária e ingestão calórica diária (das 6 semanas iniciais) das ratas submetidas a Dieta Padrão (DP) e Dieta Hiperlipídica (DH) antes e durante gestação e lactação.

	DP (n=6)	DH (n=6)
Massa inicial (g)	$286,0 \pm 6,2$	$274,1 \pm 5,4$
Massa após 6 semanas (g)	$316,0 \pm 9,1$	$312,0 \pm 7,1$
Massa final (g)	$316,6 \pm 11,5$	$316,0 \pm 14,2$
Ingestão alimentar (g/dia)	$18,9 \pm 0,7$	$18,0 \pm 0,5$
Ingestão calórica (kcal/dia)	$42,7 \pm 1,5$	$69,0 \pm 1,9$ *

Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro da média. Teste *t* de Student; * diferente de DP; $p < 0,05$.

O grupo alimentado com DH (n=6) apresentou maiores massas relativa dos tecidos adiposos ovarianos (DP: $0,6 \pm 0,0$ vs. DH: $1,8 \pm 0,2$ g/100 g m.c. - massa corporal; $p < 0,05$; Figura 4A), retroperitoneal (DP: $0,5 \pm 0,0$ vs. DH: $1,6 \pm 0,1$ g/100 g m.c.; $p < 0,05$; Figura 4B) e mesentérico (DP: $0,7 \pm 0,0$ vs. DH: $1,3 \pm 0,2$ g/100 g m.c.; $p < 0,05$; Figura 4C) quando comparados ao grupo com DP (n=6).

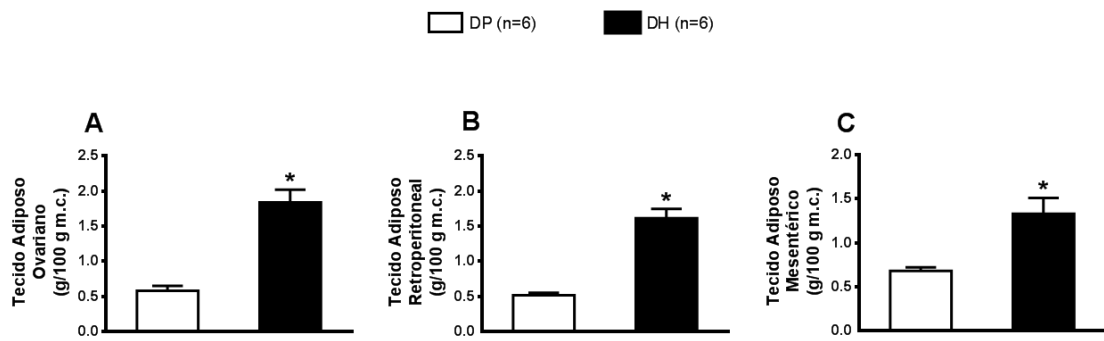


Figura 4: Valores da massa relativa dos tecidos adiposos ovarianos (A), retroperitoneal (B) e mesentérico (C) das ratas submetidas à Dieta Padrão (DP; n=6) e Dieta Hiperlipídica (DH; n=6) por um período de 6 semanas prévias (pré-gestacional) e durante gestação e lactação. m.c: massa corporal. Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados através do Teste *t* de Student não pareado; * diferente do DP; $p < 0,05$.

Em relação às análises bioquímicas, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com DP (n=5) e DH (n=6) nas concentrações séricas de colesterol total (Figura 5A), HDL (Figura 5B) e glicose (Figura 5D), porém houve uma diferença significativa entre os grupos nas concentrações séricas de triacilgliceróis (DP: $65,4 \pm 4,7$ vs. DH: $89 \pm 7,4$ mg/dL, $p < 0,05$; Figura 5C).

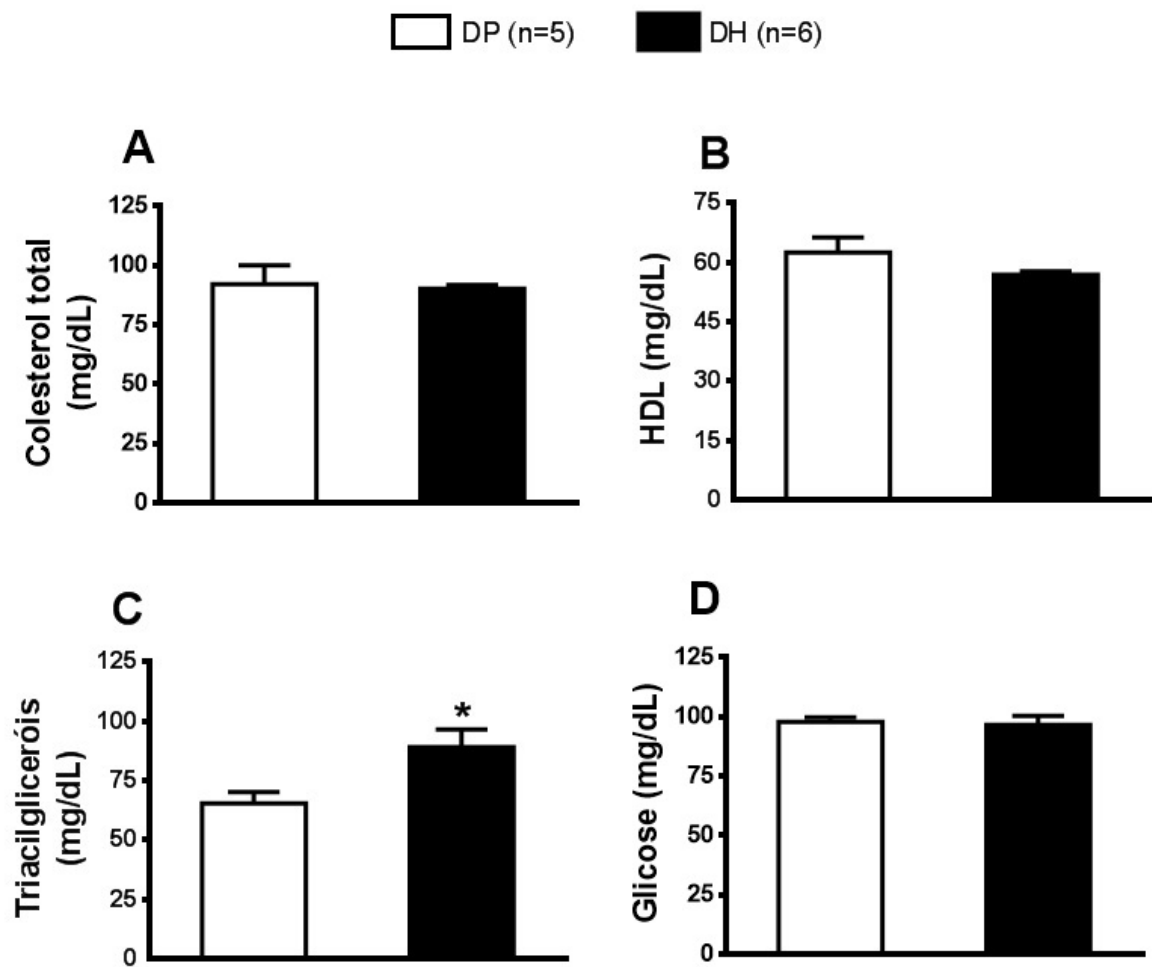


Figura 5: Análises bioquímicas: Valores séricos de colesterol total (A), HDL (B), triacilgliceróis (C) e glicose (D) das ratas submetidas à Dieta Padrão (DP; n=5) e Dieta Hiperlipídica (DH; n=6) por um período de 6 semanas prévias (pré-gestacional) e durante gestação e lactação. Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados através do Teste *t* de Student não pareado; * diferente do DP; $p < 0,05$.

1.4.2 Efeitos da obesidade materna sobre os parâmetros metabólicos da prole

Filhotes machos descendentes de mães que tiveram acesso à DH (FMDH; n=8) durante período prévio de 6 semanas (pré-gestacional) e durante gestação e lactação apresentaram maior massa corpórea no dia do desmame quando comparados aos filhotes machos descendentes de mães com DP (FMDP; n=12) durante o mesmo período de tempo (FMDP: $33 \pm 0,6$ vs. FMDH: $51,4 \pm 0,9$ g; $p <$

0,05; Tabela 2). No dia da eutanásia (1 semana após desmame) ambos os grupos (FMDP e FMDH) apresentaram massas semelhantes (Tabela 2).

Tabela 2. Valores da massa no desmame (dia 21) e massa final (dia 28) dos filhotes machos de mães submetidas à dieta padrão (FMDP – n=12) e dieta hiperlipídica (FMDH – n=8) durante período prévio de 6 semanas (pré-gestacional) e durante gestação e lactação.

	FMDP (n=12)	FMDH (n=8)
Massa no desmame (g)	33,0 ± 0,6	51,4 ± 0,9 *
Massa Final (g)	80,2 ± 2,8	79,2 ± 3,6

Os valores estão apresentados como média ± erro da média. Teste *t* de Student; * diferente de FMDP; $p < 0,05$.

Os FMDH (n=8) apresentaram maiores pesos relativos dos tecidos adiposos epididimais (FMDP: $0,2 \pm 0,0$ vs. FMDH: $0,2 \pm 0,0$ g/100 g m.c. - massa corporal; $p < 0,05$; Figura 6A), retroperitoneal (FMDP: $0,1 \pm 0,0$ vs. FMDH: $0,2 \pm 0,0$ g/100 g m.c.; $p < 0,05$; Figura 6B) e mesentérico (FMDP: $0,4 \pm 0,0$ vs. FMDH: $0,6 \pm 0,1$ g/100 g m.c.; $p < 0,05$; Figura 6C) quando comparados ao grupo com FMDP (n=12).

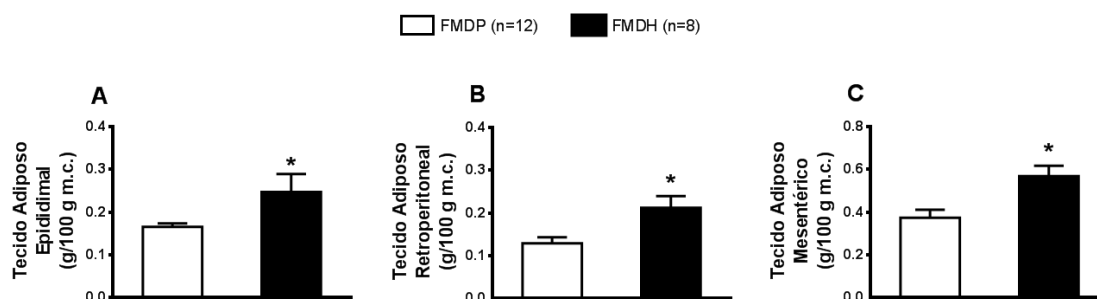


Figura 6: Valores das massas relativas dos tecidos adiposos epididimal (A), retroperitoneal (B) e mesentérico (C) dos FMDP (n=12) e FMDH (n=8) durante período prévio de 6 semanas (pré-gestacional) e durante gestação e lactação. m.c: massa corporal. Os valores estão apresentados como média ± erro padrão da média e foram analisados através do Teste *t* de Student não pareado. *Diferente de FMDP; $p < 0,05$.

Em relação às análises bioquímicas, foram observadas diferenças significativas entre os grupos nas concentrações séricas de colesterol total (FMDP: $80,0 \pm 1,4$ vs. FMDH: $105,7 \pm 4,0$ mg/dL, $p < 0,05$; Figura 7A) e HDL (FMDP: $47,9 \pm 0,8$ vs. FMDH: $54,1 \pm 1,4$ mg/dL, $p < 0,05$; Figura 7B). Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação às concentrações séricas de triacilgliceróis e glicose.

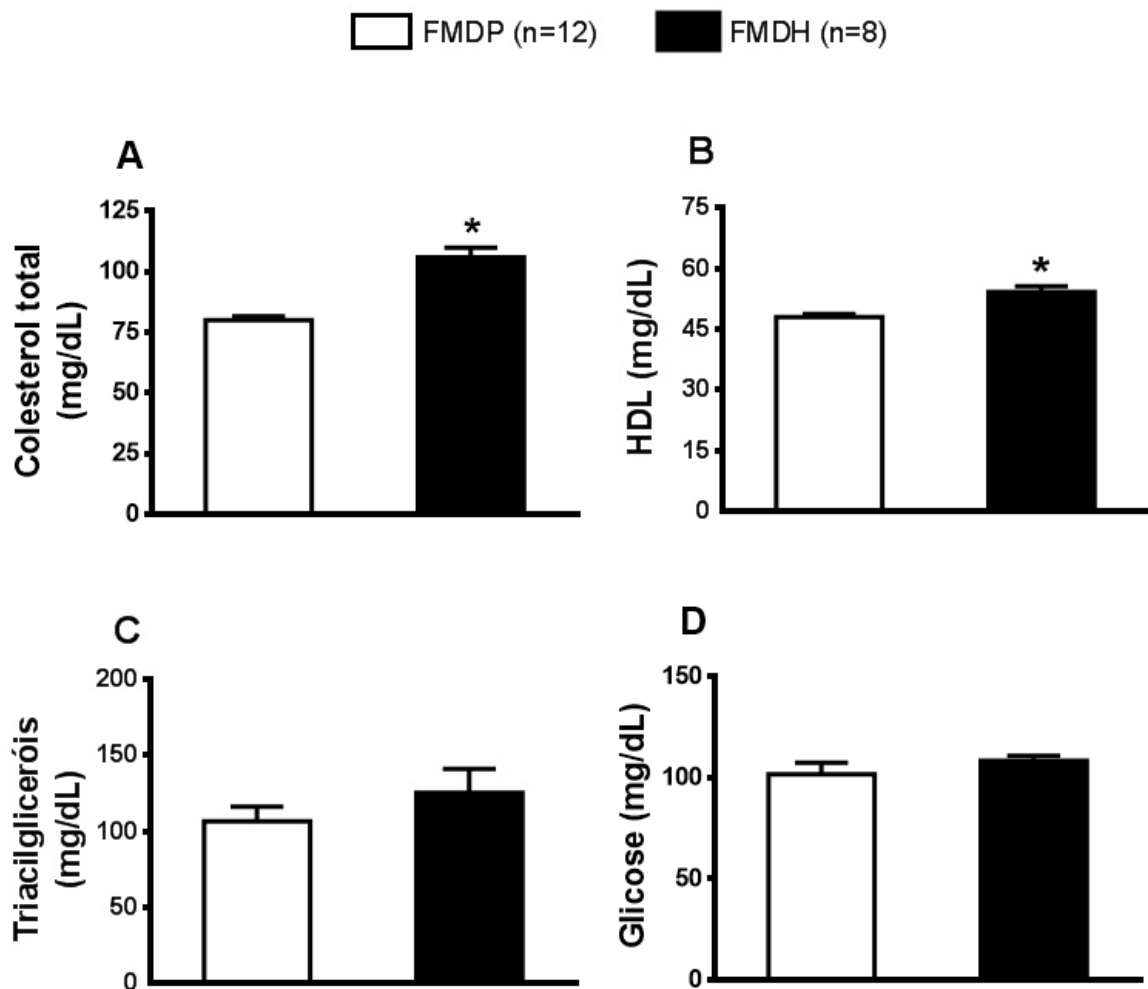


Figura 7: Análises bioquímicas: Valores séricos de colesterol total (A), HDL (B), triacilgliceróis (C) e Glicose (D) dos FMDP (n=12) e FMDH (n=8) durante período prévio de 6 semanas (pré-gestacional) e durante gestação e lactação. Os valores estão apresentados como média $\pm$ erro padrão da média e foram analisados através do Teste *t* de Student não pareado. *Diferente de FMDP; $p < 0,05$.

1.4.3 Efeito da ativação do quimio e barorreflexo e da transecção pré-colicular sobre a atividade simpática e respiratória na prole de ratas submetidas à dieta hiperlipídica antes e durante gestação e lactação

Para todos os parâmetros, as respostas observadas a seguir foram em relação ao basal. A infusão de KCN (KCN - 30 µg/60 µL, injetada em *bolus*) provocou um aumento significativo na atividade simpática (SNA) em ambos os grupos, porém, no grupo FMDH (n=7) esse aumento foi menor quando comparado com o grupo FMDP (n=11) (FMDP: $107,3 \pm 15,1$ vs. FMDH: $52,1 \pm 10,2\%$; $p < 0,05$; Figuras 8A, B e C). A infusão de KCN também provocou aumentos similares, tanto no grupo FMDP quanto no grupo FMDH, na atividade abdominal (FMDP: $215,4 \pm 57,6$ vs. FMDH: $155,5 \pm 55,9\%$; $p < 0,05$; Figuras 8A, B e D) e na frequência do nervo frênico (FMDP: $51 \pm 6,2$ vs. FMDH: $34,6 \pm 10,4\%$; $p < 0,05$; Figuras 8A, B e E). Em relação à amplitude do nervo frênico a infusão de KCN provocou um aumento nesse parâmetro nos dois grupos, porém, esse aumento foi significativamente mais acentuado no grupo FMDH (FMDP: $14,3 \pm 4,1$ vs. FMDH: $31,8 \pm 10,4\%$; $p < 0,05$; Figuras 8A, B e F).

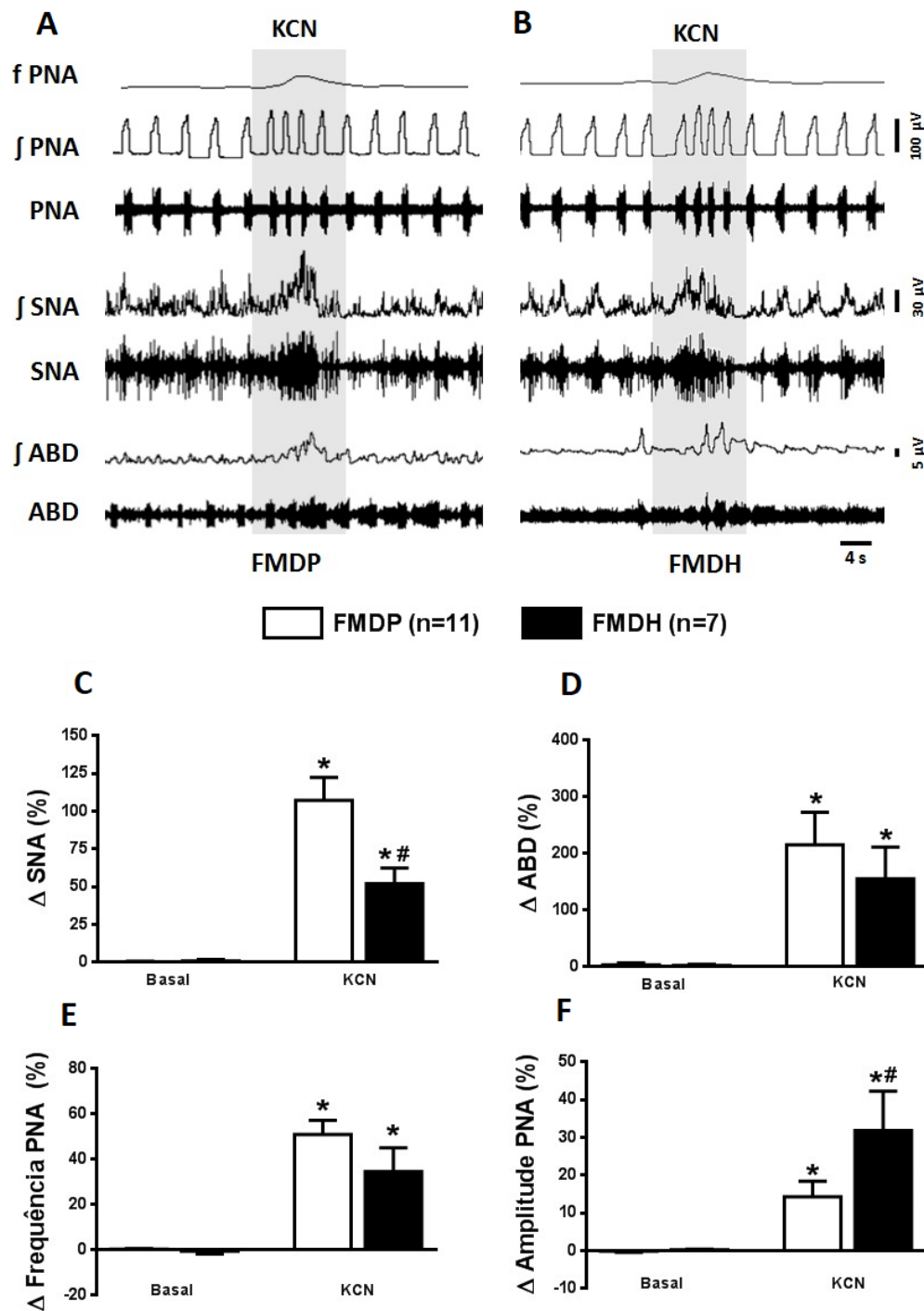


Figura 8: Traçados representativos do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (j PNA e PNA), simpático torácico (j SNA e SNA) e abdominal (j ABD e ABD), em resposta a infusão de cianeto de potássio (KCN 30 μ g/60 μ L), nos FMDP (**A**) e FMDH (**B**) e os efeitos do KCN sobre a atividade nervosa simpática (SNA; **C**), atividade abdominal (ABD; **D**), frequência e amplitude da atividade do nervo frênico (PNA; **E** e **F**) nos FMDP (n=11) e FMDH (n=7). A barra em cinza representa o momento da resposta ao KCN. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média da variação percentual e foram analisados por análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). * Diferente do basal; # Diferente do FMDP; $p < 0,05$.

A indução da hipercapnia (10% CO₂) provocou tanto no grupo FMDP (n=11) quanto no grupo FMDH (n=7) um aumento na atividade simpática (FMDP: $25,3 \pm 4,3$ vs. FMDH: $19,6 \pm 5,3\%$; $p < 0,05$; Figuras 9A, B e C), na atividade abdominal (FMDP: $83,8 \pm 19,9$ vs. FMDH: $86,5 \pm 21,8\%$; $p < 0,05$; Figuras 9A, B e D) e na amplitude do nervo frênico (FMDP: $9,4 \pm 1,9$ vs. FMDH: $26,8 \pm 6,4\%$; $p < 0,05$; Figuras 9A, B e F), e gerou uma diminuição na frequência do nervo frênico (FMDP: $-21 \pm 3,9$ vs. FMDH: $-36,1 \pm 5,4\%$; $p < 0,05$; Figuras 9A, B e E). Essa diminuição foi mais acentuada no grupo FMDH quando comparado com o grupo FMDP. Também foi observado um maior aumento na amplitude do nervo frênico no grupo FMDH.

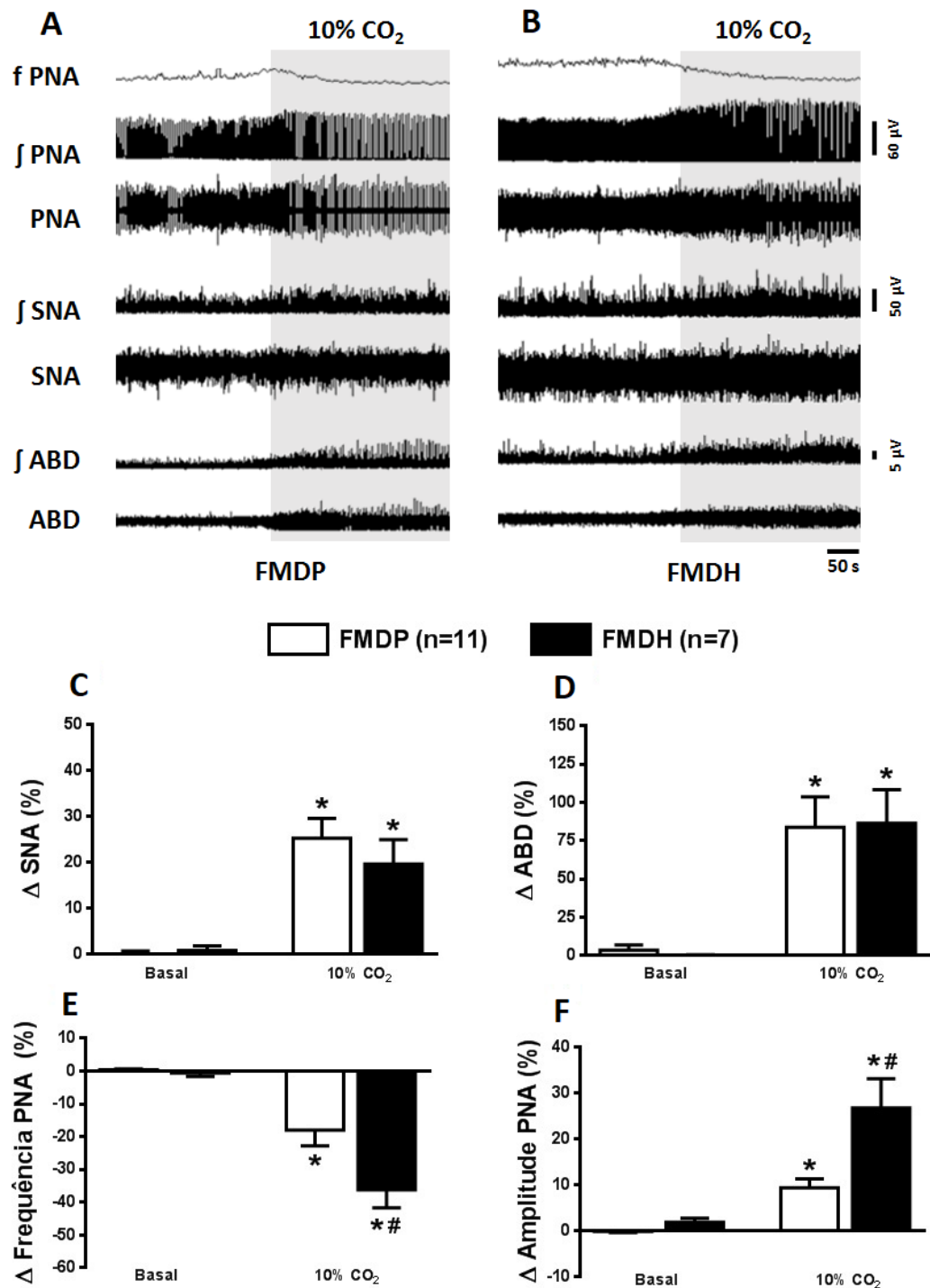


Figura 9: Traçados representativos do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (j PNA e PNA), simpático torácico (j SNA e SNA) e abdominal (j ABD e ABD), em resposta à hipercapnia (10% CO₂), nos FMDP (A) e FMDH (B) e os efeitos da hipercapnia sobre a atividade simpática (SNA; C), atividade abdominal (ABD; D), frequência e amplitude da atividade do nervo frênico (PNA; E e F) nos FMDP (n=11) e FMDH (n=7). A barra em cinza representa o momento da resposta à hipercapnia. Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média da variação percentual e foram analisados por análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). * Diferente do basal; # Diferente do FMDP; p<0,05.

A infusão de fenilefrina (10 µg/100 µL, injetada em *bolus*) provocou tanto no grupo FMDP (n=11) quanto no grupo FMDH (n=7), uma diminuição na atividade simpática (FMDP: $-56,0 \pm 3,0$ vs. FMDH: $-31,7 \pm 5,1\%$; $p < 0,05$; Figuras 10 A, B e C), na atividade abdominal (FMDP: $-25,2 \pm 7,9$ vs. FMDH: $-30,9 \pm 6,8\%$; $p < 0,05$; Figuras 10A, B e D) e na amplitude do nervo frênico (FMDP: $-17,6 \pm 1,9$ vs. FMDH: $-16,3 \pm 2,3\%$; $p < 0,05$; Figuras 10A, B e F), e gerou um aumento na frequência do nervo frênico (FMDP: $9,1 \pm 3,0$ vs. FMDH: $11,4 \pm 3,1\%$; $p < 0,05$; Figuras 10A, B e E). Porém, destacamos que a redução na SNA observada no grupo FMDH foi significativamente menor do que a observada no grupo FMDP, enquanto que as alterações nos nervos respiratórios foram semelhantes.

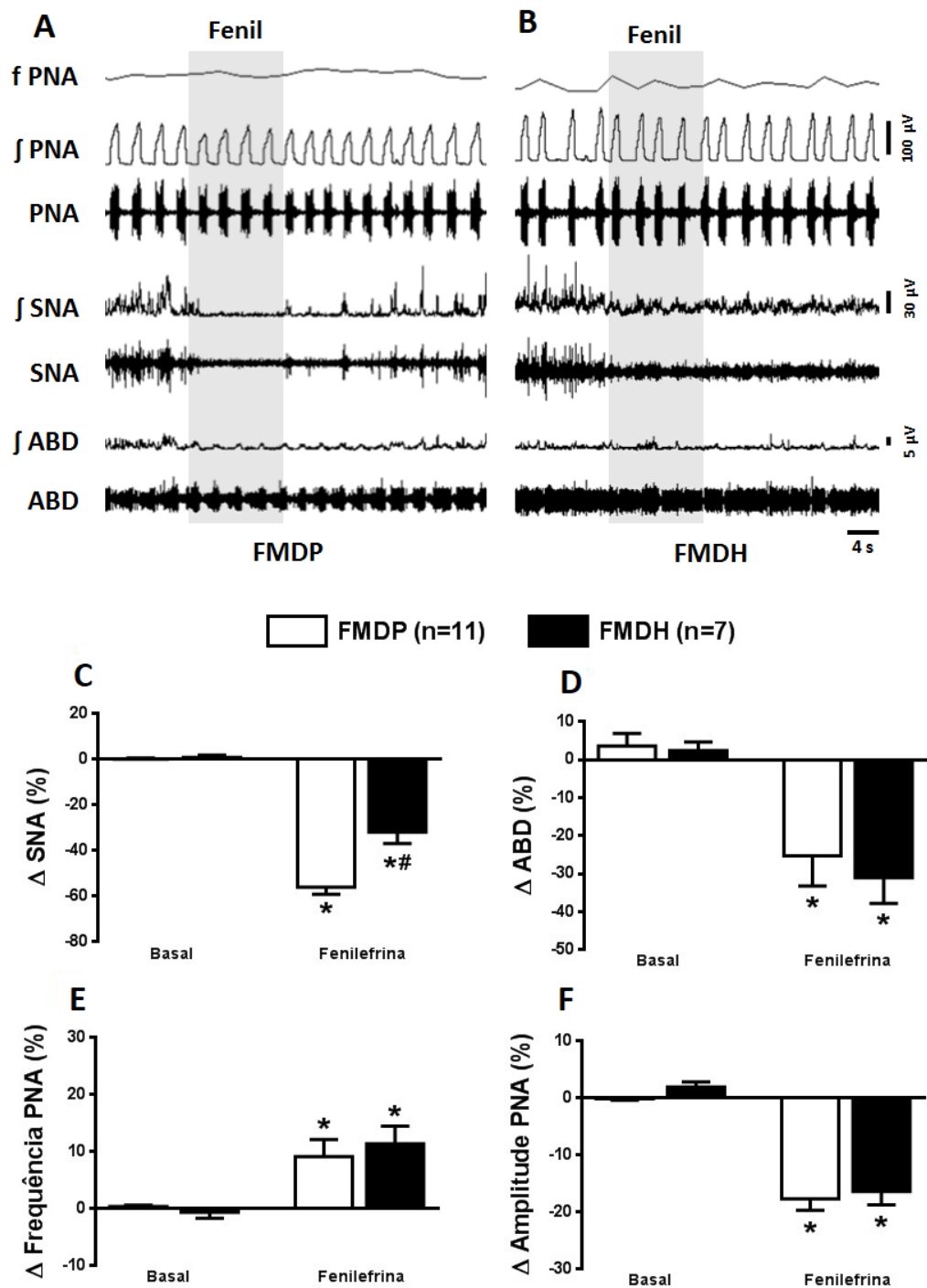


Figura 10: Traçados representativos do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (j PNA e PNA), simpático torácico (j SNA e SNA) e abdominal (j ABD e ABD), em resposta a infusão de fenilefrina (Fenil - 10 µg/100 µL), nos FMDP (**A**) e FMDH (**B**) e os efeitos da infusão de fenilefrina sobre a atividade simpática (SNA; **C**), atividade abdominal (ABD; **D**), frequência e amplitude da atividade do nervo frênico (PNA; **E** e **F**) nos FMDP (n=11) e FMDH (n=7). A barra em cinza representa o momento da resposta à fenilefrina. Os valores foram expressos como média ± erro padrão da média da variação percentual e foram analisados por análise de variância de duas vias (two-way ANOVA). * Diferente do basal; # Diferente do FMDP; p<0,05.

Após transecção pré-colicular os filhotes machos descendentes de mães que foram alimentadas com DP (FMDP) durante período prévio de 6 semanas (pré-gestacional) e durante acasalamento, gestação e lactação apresentaram uma queda da atividade simpática (Δ : $-28,2 \pm 4,9\%$, $n=11$, $p<0,05$; Figuras 11A e B). Esse efeito não foi observado nos FMDH (Δ : $8,3 \pm 10,9\%$, $n=7$; Figuras 12A e B) no mesmo período de tempo. A transecção pré-colicular não afetou os demais parâmetros analisados nos dois grupos.

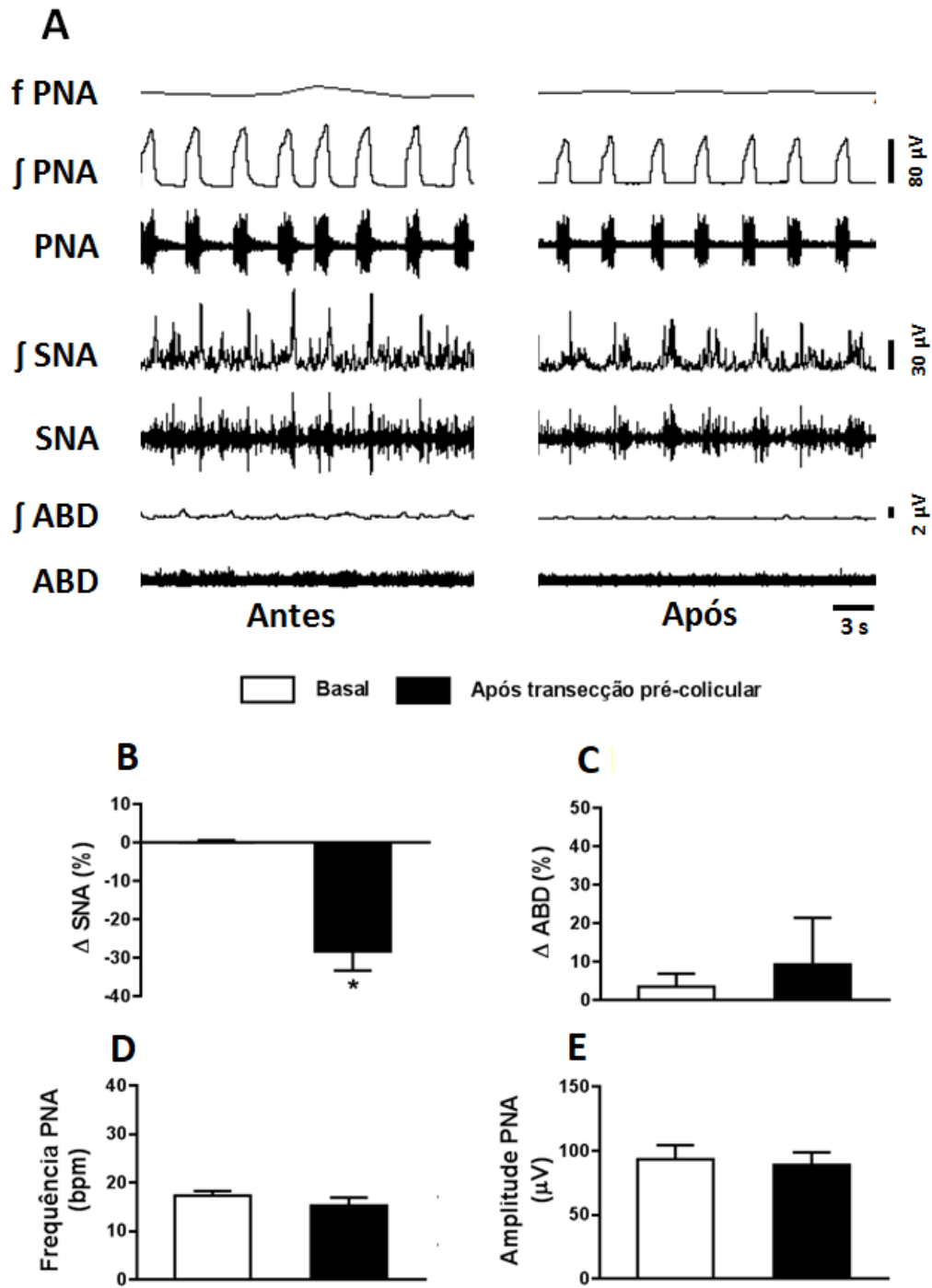


Figura 11: Traçado representativo do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (j PNA e PNA), simpático torácico (j SNA e SNA) e abdominal (j ABD e ABD) antes e após transecção pré-colicular (**A**) e seus efeitos sobre a atividade simpática (SNA; **B**), atividade abdominal (ABD; **C**), frequência e amplitude da atividade do nervo frênico (PNA; **D e E**) nos FMDP (n=11). A SNA e ABD foram expressas como média $\pm$ erro padrão da média da variação percentual. A frequência da PNA foi expressa como média $\pm$ erro padrão da média da frequência instantânea (bpm). A amplitude da PNA foi expressa como média $\pm$ erro padrão da média dos valores em microvolts (μ V). Os valores foram analisados através do Teste *t* de Student pareado; * diferente do Basal; $p < 0,05$.

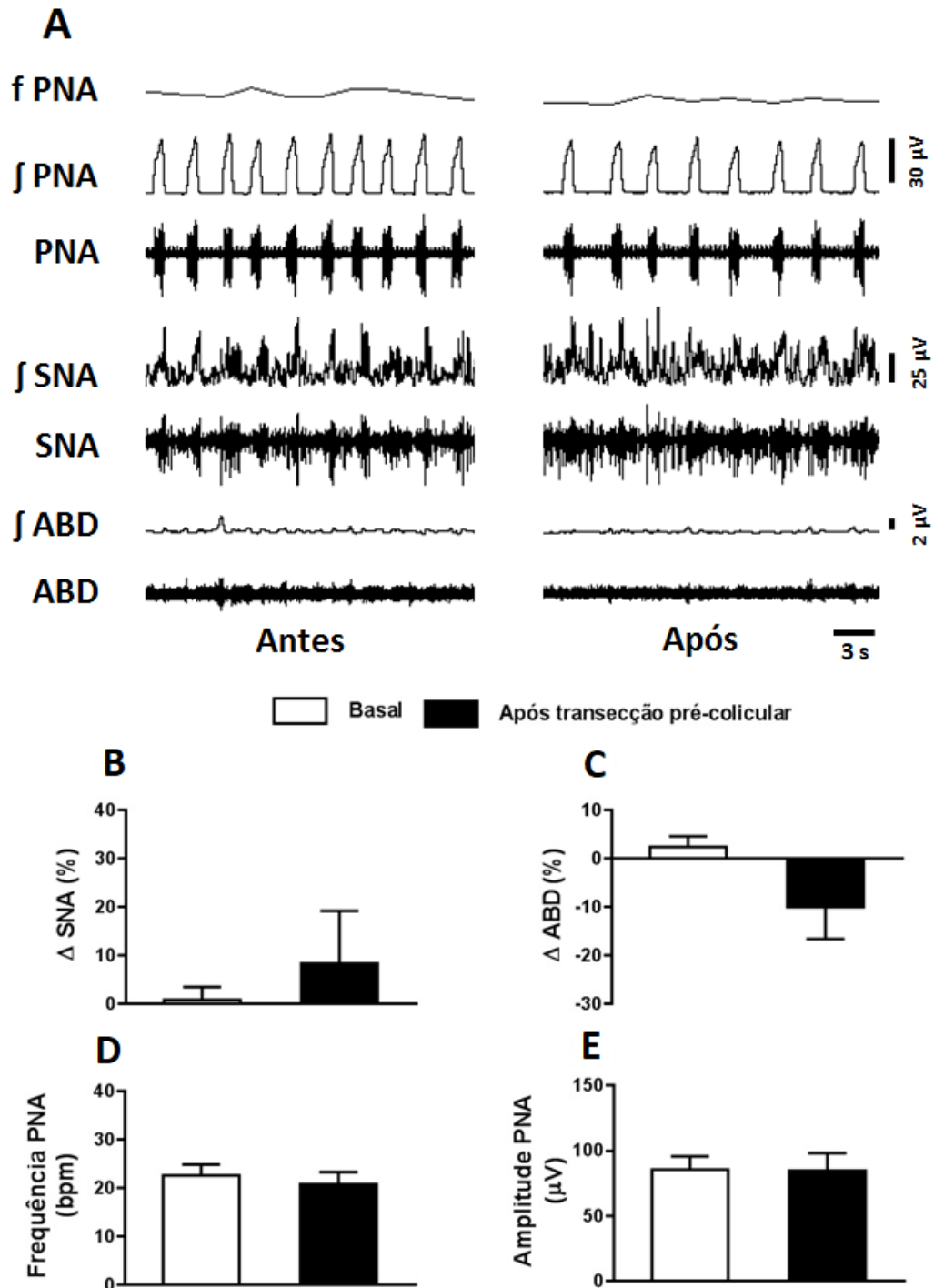


Figura 12: Traçado representativo do registro da frequência da atividade do nervo frênico (f PNA) e o sinal integrado e bruto dos nervos frênico (j PNA e PNA), simpático torácico (j SNA e SNA) e abdominal (j ABD e ABD) antes e após transecção pré-colicolar (**A**) e seus efeitos sobre a atividade simpática (SNA; **B**), atividade abdominal (ABD; **C**), frequência e amplitude da atividade do nervo frênico (PNA; **D e E**) nos FMDH (n=7). A SNA e ABD foram expressas como média $\pm$ erro padrão da média da variação percentual. A frequência da PNA foi expressa como média $\pm$ erro padrão da média da frequência instantânea (bpm). A amplitude da PNA foi expressa como média $\pm$ erro padrão da média dos valores em microvolts (μ V). Os valores foram analisados através do Teste *t* de Student pareado.

1.5 Discussão

No presente estudo observou-se que ratas tratadas com DH por um período de 6 semanas prévias (pré- gestacional) e durante o período de gestação e lactação apresentaram maior ingestão calórica, maiores massas relativas dos tecidos adiposos (ovariano, retroperitoneal e mesentérico) e aumento na concentração de triacilgliceróis. Estudos indicam que o consumo de DH está diretamente relacionado ao sobrepeso, obesidade abdominal, distúrbios metabólicos e alterações no perfil lipídico (100,101). O próprio excesso de tecido adiposo provoca hipertrofia dos adipócitos, aumento da infiltração de macrófagos e mudanças na secreção de ácidos graxos livres, leptina e citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-6 (102,103). Essas anormalidades metabólicas são fatores de risco para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e diabetes do tipo II (104,105). O aumento da adiposidade e as alterações no perfil lipídico observadas no nosso estudo indicam que este modelo de DH estabelecido por Estadella e colaboradores (82) mostrou-se efetivo em alterar os parâmetros metabólicos.

No dia do desmame todos os filhotes descendentes de ratas que tiveram acesso à dieta hiperlipídica apresentaram massa corporal maior que os animais descendentes de mães com dieta controle. Porém, uma semana após o desmame a massa das proles foi semelhante. Os resultados apresentados no presente estudo corroboram os descritos por Kirk e colaboradores (106) que observaram que os machos decendente de mães que receberam dieta hiperlipídica por 6 semanas prévias e durante gestação e lactação estavam mais pesados ao desmame do que descendentes de mães controle. No entanto, aos 30 dias de idade a massa corporal era semelhante entre os grupos. Os autores também observaram que, após a quinta semana de idade, esses animais apresentaram diferença significativa na massa corporal que foi mantida até a idade adulta (106). Essas análises não foram realizadas no presente estudo. Os autores observaram que o aumento no tecido adiposo só ocorreu após 90 dias do desmame quando os animais já estavam adultos (106). No presente estudo nós avaliamos que os filhotes machos de mães que tiveram ingestão da dieta hiperlipídica apresentaram aumento no tecido adiposo e alterações no perfil lipídico aos 30 dias de idade.

Filhotes machos descendentes de mães que foram alimentadas com DP apresentaram uma queda da atividade simpática após transecção pré-colicular. Estudos anteriores já haviam demonstrado que a atividade do núcleo hipotalâmico paraventricular (PVN) e do prosencéfalo é essencial para a manutenção da atividade nervosa simpática e da pressão arterial, mesmo em animais anestesiados (98,107–110). A inativação do PVN resultou em simpatoinibição e queda da pressão arterial (108). Outro trabalho anterior observou uma queda similar da pressão arterial média após desconexão hipotalâmica (110). Colombari e colaboradores (98), utilizando a mesma preparação *in situ* do presente estudo, observou que a transecção pré-colicular foi efetiva em reduzir a SNA em um grupo experimental de ratos hidratados, mostrando que não somente a pressão arterial, mas o tônus simpático também é mantido por áreas prosencefálicas. Os resultados apresentados nesse trabalho corroboram os descritos nesses estudos que mostraram a importância da região prosencefálica na modulação da atividade simpática em diferentes modelos experimentais.

Diferente dos achados anteriores, nós também observamos que filhotes machos descendentes de mães que foram alimentadas com dieta hiperlipídica não apresentaram diminuição da atividade simpática após transecção pré-colicular. De forma semelhante, Colombari *et al.* (98) evidenciaram que animais desidratados (privação hídrica) não apresentaram uma redução da SNA após transecção pré-colicular como foi observado nos animais controle. Nesse mesmo estudo, os autores evidenciaram que a inibição seletiva do núcleo do trato solitário (NTS) comissural reduziu significativamente a atividade simpática e pressão arterial nos animais desidratados. Esses resultados indicam uma transferência da modulação simpática de regiões prosencefálicas para regiões bulbares através da indução de plasticidade neuronal (98). Sabendo que durante o período pré- e pós-natal, o SNC ainda está em fase de desenvolvimento e amadurecimento neuronal e que modificações durante essa fase podem influenciar as conexões neuronais (73) é cabível supor que provavelmente as alterações provocadas no meio em que o feto se desenvolveu, em decorrência da dieta hiperlipídica, possam ter induzido uma plasticidade neuronal, uma vez que a retirada de regiões prosencefálicas não modificou o tônus simpático basal nesses animais. Até o presente estudo não se sabe qual área bulbar pode

estar envolvida com a manutenção da SNA nos animais filhos de mães tratadas com DH.

Sabe-se que não é só a obesidade pré-gestacional que é associada com o aumento da adiposidade e alterações cardiometabólicas na prole, mas também o ganho excessivo de massa durante a gestação (111). Estudos já demonstraram que alterações metabólicas durante a gravidez e lactação podem levar a modificações da ingestão de alimentos devido à plasticidade no hipotálamo (88–95), enfatizando mais uma vez as consequências do desequilíbrio nutricional no desenvolvimento do SNC da prole. Nesse sentido, os resultados apresentados aqui corroboram com essas evidências, mostrando que a dieta hiperlipídica induzida tanto no período pré-gestacional quanto somente no período de gestação e lactação provavelmente poderia ter alterado o substrato neuronal em formação provocando modificações nas conexões neurais da prole.

A leptina, produzida principalmente pelo tecido adiposo, tem sua produção aumentada durante a obesidade (44,66,112). Estudos em camundongos geneticamente hiperfágicos (ob/ob) demonstraram que a leptina tem um papel neurotrófico no desenvolvimento de projeções a partir do núcleo arqueado (ARC) para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (113). Descendentes de ratas obesas apresentam altas concentrações séricas de leptina neonatal, porém a fosforilação da STAT3 no núcleo arqueado (ARC) e o nível de imunoreatividade para AgRP no PVN está diminuída (106). O desenvolvimento de projeções que saem do ARC, incluindo neurônios contendo AgRP, pode influenciar permanentemente a formação e função de circuitos neurais envolvidos não somente com a regulação do equilíbrio energético, através da sinalização pela leptina, mas também com a regulação cardiovascular através do sistema nervoso autonômico. A liberação prolongada de níveis anormalmente elevados de leptina conduz a uma resistência e permanentemente afeta as funções que envolvem o hipotálamo.

Os descendentes de ratas tratadas tanto com dieta hiperlipídica quanto com dieta padrão foram submetidos a testes de quimiorrecepção a fim de se averiguar as possíveis mudanças que a dieta materna poderia provocar nesses reflexos. Sabe-se que durante a hipóxia há uma elevação da frequência respiratória, um aumento da amplitude das contrações dos músculos inspiratórios (diafragma) e expiratórios

(músculos abdominais) (114,115) e um significativo aumento da atividade simpática (116). Parte dessas respostas reflexas também são observadas em situações de hipercapnia, em que o aumento de CO_2 e consequentes alterações de pH no fluido cerebroespinal são detectados pelos quimiorreceptores centrais. As informações quimiorreflexas são transmitidas para outras regiões cerebrais envolvidas com a geração e modulação das atividades respiratória e autonômica (117). De maneira semelhante, nossos resultados demonstraram que filhotes machos, descendentes de ratas tratadas tanto com dieta hiperlipídica quanto com dieta padrão, apresentaram aumento da atividade simpática, da atividade abdominal e da amplitude da atividade do nervo frênico tanto em condições de hipóxia quanto em situação de hipercapnia. Entretanto, nós observamos que animais descendentes de mães que consumiram dieta hiperlipídica durante período pré-gestacional e durante gestação e lactação apresentaram uma resposta exacerbada no aumento da amplitude da atividade do nervo frênico. Corroborando esses resultados um trabalho recentemente publicado demonstrou que descendentes machos de ratas alimentadas com dieta hiperlipídica durante a gestação e a lactação apresentaram respostas ventilatórias e autonômicas ampliadas à hipoxia e hipercapnia e também hipertensão na vida adulta combinada com hiperatividade simpática (75). Estudos recentes evidenciaram que a leptina pode ter um importante papel nas respostas ventilatórias ativadas pela hipóxia. Exemplificando, animais que foram submetidos a hipóxia apresentam altos níveis plasmáticos de leptina (118,119). E em níveis elevados, a leptina poderia promover a estimulação da ventilação e da atividade simpática.

Os receptores de leptina estão presentes em diversas regiões do SNC, incluindo o hipotálamo e o tronco encefálico (64). Além da sua comprovada ação sobre o controle da ingestão alimentar e ativação da atividade simpática, através da estimulação de neurônios localizados no núcleo arqueado e no núcleo paraventricular do hipotálamo, respectivamente (15), evidências experimentais indicam que a leptina também pode atuar sobre neurônios localizados no bulbo, modulando a atividade respiratória (63,120). Foi demonstrado que a administração intracerebroventricular de leptina ativa neurônios pré-simpáticos da região rostral ventrolateral do bulbo (RVL) (121). Além disso, outros estudos demonstraram que a administração de leptina na porção caudal do NTS, importante área para o controle

das atividades simpática e respiratória, promove simpatoexcitação (63) e aumento da ventilação pulmonar (120). Camundongos obesos deficientes em leptina tem resposta ventilatória atenuada ao CO₂, que pode ser revertida após o tratamento sistêmico ou intracerebroventricular com leptina (36,61,122). Sabendo da importância da leptina como um neuromodulador e da sua ação em diferentes regiões do SNC, é lícito supor que as alterações sofridas pela prole durante a formação embrionária, devido ao provável aumento de leptina materna, possam ter desencadeado uma plasticidade neuronal que alterou a sensibilidade quimiorreflexa nesses animais.

Além do aumento nos níveis séricos de leptina durante a obesidade há também uma maior ativação do Sistema Renina-Angiotensina (SRA) e parece haver uma forte interação entre eles, uma vez que a ativação do SRA aumenta os níveis de leptina (53) e o bloqueio de receptores AT1 no prosencéfalo reduz seu efeito simpatoexcitatório induzido pela leptina (37). Desta forma, o consumo prolongado de dieta hiperlipídica pode alterar significativamente essas vias de modulação e consequentemente gerar alterações na circuitaria neuronal não somente nas mães, mas principalmente na prole em formação.

Alguns trabalhos têm evidenciado que na obesidade a sensibilidade dos barorreceptores está diminuída (43,44,84). Corroborando esses achados, o presente estudo demonstra que filhotes de mães obesas, que tiveram acesso prolongado à dieta hiperlipídica também durante gestação e lactação, apresentaram uma atenuação da simpatoinibição induzida pela fenilefrina. O prejuízo na função barorreflexa pode ser crítica para o desenvolvimento/manutenção da hipertensão, uma vez que uma redução no ganho do barorreflexo pode contribuir para o aumento da atividade simpática e hipertensão (123).

Em estudo recente, foi demonstrado que animais tratados com dieta hiperlipídica por 6 semanas apresentaram aumento da pressão arterial, redução do barorreflexo, aumento na expressão gênica de receptores AT1 e redução da expressão gênica de receptores AT2 no NTS (43). Sabe-se que o NTS tem alta densidade de receptores AT1 (124,125) e a ativação desses receptores no NTS pela ANG II atenua o barorreflexo (126,127). A permeabilidade da barreira hematoencefálica pode ser comprometida sob vários estados patológicos durante a vida pós-natal, incluindo

hipertensão (128), obesidade (129) e processos inflamatórias (130,131). Foi demonstrado recentemente que a obesidade materna comprometeu a formação da barreira hematoencefálica no feto em desenvolvimento expondo potencialmente o desenvolvimento do hipotálamo a níveis excessivamente elevados de fatores, como a leptina, que pode alterar o desenvolvimento pós-natal desta região (132). Dessa forma, além do hipotálamo, a região do NTS, que antes também era protegida pela barreira hematoencefálica, agora poderia detectar os maiores níveis de ANG II circulante observados durante a obesidade. Esses efeitos poderiam justificar as alterações observadas na prole de mães alimentadas com dieta hiperlipídica apresentadas nesse estudo.

1.6 Considerações finais

O presente estudo evidenciou que a dieta hiperlipídica provocou maior ingestão calórica, maior massa relativa dos tecidos adiposos ovariano, retroperitoneal e mesentérico e aumento na concentração sérica de triacilgliceróis nas ratas que foram alimentadas com essa dieta durante 6 semanas pré-gestacionais e durante o período de gestação e lactação. A exposição prolongada à dieta hiperlipídica durante uma fase crítica do desenvolvimento da prole provocou aumento nas concentrações séricas de colesterol total e HDL e aumento na massa dos tecidos adiposos epididimal, retroperitoneal e mesentérico. E de forma inédita o presente estudo apresentou evidências de que a prole descendente de mães que foram alimentadas com dieta hiperlipídica apresentou alterações na atividade respiratória após ativação do quimiorreflexo periférico e central e também apresentou alterações na atividade simpática após ativação do reflexo do quimio e baro. Fortes evidências encontradas na literatura sugerem que essas alterações são possivelmente desencadeadas por um desequilíbrio nos níveis séricos de leptina e por uma maior ativação do SRA decorrente da obesidade, mas os mecanismos que levaram a essas alterações não foram avaliados no presente estudo e precisam ser melhores investigados.

Capítulo 2

Efeitos da ocitocina sobre a reatividade vascular e seu papel nas respostas induzidas pela hipernatremia

2.1 Introdução

A homeostase é o equilíbrio da composição do meio interno e envolve a conservação da tonicidade dos compartimentos extra e intracelulares, além da manutenção da concentração dos outros elementos que compõem o organismo (133). O volume extracelular é determinado pelo volume total do líquido extracelular e a partição deste volume entre os compartimentos vascular e intersticial. Alterações da osmolaridade do compartimento extracelular podem alterar o metabolismo, o volume e a função celular afetando todos os tecidos perfundidos (134). Como consequência, alterações agudas da osmolaridade podem induzir paralisia, convulsões, coma e até a morte (135). Desta forma, a regulação da osmolaridade e do volume é fundamental para sobrevivência.

A manutenção da concentração de sódio (Na^+) no plasma é o objetivo central dos mecanismos homeostáticos, pois o sódio é o principal íon que determina a osmolaridade e o volume extracelular e variações na sua concentração podem causar um fluxo osmótico entre os compartimentos intra e extracelular e afetar a concentração de outros componentes desse meio.

O sistema nervoso central (SNC) possui vários receptores periféricos e centrais que podem detectar variações da composição do compartimento extracelular e também do volume e da tonicidade. Uma vez detectada pelo SNC, alterações na concentração plasmática de sódio ou no volume circulante desencadeia um conjunto de respostas destinadas a corrigir esses desvios e restabelecer as condições fisiológicas. Todos os vertebrados mantem a osmolaridade e o volume do compartimento extracelular por meio de ajustes comportamentais e vegetativos.

A regulação da ingestão de água e sódio através da indução da sede e mudanças no apetite ao sódio são ajustes comportamentais recrutados durante mudanças na composição do meio extracelular e são essenciais para manutenção da homeostase. Esse sistema é tão eficiente que elevações mínimas da osmolaridade plasmática (1 a 2%) ou reduções (8 a 10%) no volume extracelular são suficientes para induzir o comportamento de ingestão de água (136,137). Outro comportamento recrutado durante essas mudanças na osmolaridade ou no volume circulante é a indução do apetite ao sódio. Em mamíferos, diminuições mínimas na concentração plasmática de sódio já são estímulos fortes para induzir esse comportamento (136,138).

Alterações no volume e/ou na composição dos compartimentos extracelulares evocam várias respostas autonômicas, cardiovasculares e hormonais que atuam em conjunto para modular a excreção renal de água e sódio. Os principais ajustes vegetativos são: redução da atividade simpática renal (20,139–142), vasodilatação renal (21,22,142–146), inibição da secreção de renina (147), secreção de peptídeos natriuréticos atriais (ANP) (148–150), secreção de ocitocina (23,24,151,152), natriurese (153–155) e diurese (135).

A vasodilatação renal é um fator importante na regulação da excreção de sódio e água, e é estimulada em resposta às variações agudas no volume do fluido extracelular (21,145,156). Os mecanismos envolvidos na vasodilatação renal induzida por um aumento no volume circulante, por exemplo, são complexos e parecem envolver mecanismos hormonais e autonômicos.

Em relação às respostas autonômicas, a estimulação do nervo renal reduz a excreção de sódio através da secreção de renina, da vasoconstrição renal, e do aumento da reabsorção tubular de sódio (157). Vários estudos demonstram que a sobrecarga aguda de sódio promove redução da atividade simpática renal, resultando em vasodilatação, redução da reabsorção de sódio e, consequente, natriurese (20,139–141,158).

A liberação de ocitocina e peptídeo natriurético atrial (ANP) estão entre as respostas hormonais e são estimuladas durante a hipernatremia. A ocitocina é um peptídeo que, apesar de ter sido descrito inicialmente devido ao seu papel nas contrações uterinas (159) e na ejeção de leite (160), também tem várias funções

adicionais, muito relacionada com o comportamento social, cuidados de saúde materna, comportamento sexual, aprendizagem, memória (161,162) e regulação do equilíbrio de eletrólitos (23,24,163–166). A secreção de OT é aumentada em resposta a alterações na concentração plasmática de sódio (167) e sua infusão promove o aumento do volume urinário (24,163), filtração glomerular (23,163), e excreção urinária de sódio (24,165,166,168). Estes efeitos são mediados pela interação da ocitocina com seu receptor, um receptor acoplado a proteína-G e a fosfolipase C através da Gαq11 (161).

2.2 Objetivos

2.2.1 Objetivo geral

Apesar do vasto conhecimento na área nenhum estudo avaliou a interação entre a atividade simpática renal e a secreção de ocitocina sobre as respostas renais e cardiovasculares induzidas pela sobrecarga de sódio. Por esta razão, o presente estudo avaliou o envolvimento da ocitocina e dos nervos renais nas respostas cardiovasculares e renais induzidas pela hipernatremia aguda.

2.2.2 Objetivos específicos

Mais especificamente, procuramos:

- I. Avaliar os efeitos da ocitocina sobre a resistência e tônus vascular renal.
- II. Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores de ocitocina e de vasopressina na vasodilatação e vasorelaxamento renal induzidos por ocitocina.
- III. Avaliar o efeito da infusão de salina hipertônica sobre a volemia e a concentração de sódio plasmático.
- IV. Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores de ocitocina e da desnervação renal nas respostas cardiovasculares induzidas pela infusão de salina hipertônica.
- V. Avaliar o efeito do bloqueio dos receptores de ocitocina e da desnervação renal na excreção urinária induzida pela infusão de salina hipertônica.

2.3 Metodologia

2.3.1 Modelos experimentais

Todos os experimentos foram realizados em ratos machos adultos (250-350 g) da linhagem Wistar. Para os experimentos realizados na Universidade Federal de Goiás foram utilizados animais fornecidos pelo Biotério Central da UFG e os protocolos realizados foram submetidos à aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (processo: 034/12; ver em anexo). Para os experimentos realizados na Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP) foram utilizados animais fornecidos pelo Biotério Central da UNIFESP e os protocolos realizados foram aprovados pelo comitê de ética da UNIFESP (processo: CEP 0739/06). Todos os animais foram mantidos em salas climatizadas (temperatura 22-24 °C) e tiveram acessos *ad libitum* à água e ração.

2.3.2 Análise molecular da expressão do gene para receptor de ocitocina na artéria renal

Os experimentos foram realizados em parceria com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. O RNA total foi extraído a partir de dez artérias renais usando Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA). O clorofórmio foi adicionado (1:5, v/v) e a fase aquosa foi obtida depois da centrifugação (12000 x g, 15 min). O RNA foi precipitado com isopropanol durante 15 min à temperatura ambiente, seguido pela centrifugação a 12000 x g durante 10 min. Os pellets foram ressuspensos em água tratada com DEPC a 0,1%, e o conteúdo de RNA foi quantificado por espectrofotometria. Para a transcrição reversa, 2 ug de RNA total foram utilizados como um molde para sintetizar cDNA. O RNA foi incubado com 1 ml oligo(dt) 15-20 (0,5 pmol, Fermentas - Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia), e DEPC-água para um volume final de 12 µL, durante 5 min em 65 °C. Os seguintes reagentes foram adicionados em seguida, para atingir um volume final de 20 µL: 4 µL de tampão RT (50 mM Tris-HCl, pH 8,3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 2 mL de 10 mM dNTP, 1 mL de inibidor de RNAase RiboLock (20 U/mL) e 1 mL de RevertAid H Minus M-MuLV transcriptase reverse (200 mL/mL, Fermentas – Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia). A mistura foi

incubada durante 5 min à 25 °C, seguido por 60 min à 45 °C e a síntese de cDNA foi realizada à 70 °C por 5 min.

O qRT-PCR foi utilizado para a análise da expressão gênica em tecidos (Applied Biosystems One step Plus Sistema de PCR, Foster City, CA, EUA). Nós padronizamos um método de qRT-PCR para analisar a expressão do gene para receptor de ocitocina (OTR), utilizando β -actina como um gene constitutivo. Para o OXTR foi utilizado com primer direto: 5-CGA TTG CTG GGC GGT CTT CA-3 e, como um primer reverse: 5-CCG CCG CTG CCG TCT TGA G-3, resultando em um produto de PCR de 161 pb. Para β -actina, foi utilizado como primer direto: 5-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3 e, como um primer reverse: 5-CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT-3, resultando em produto de PCR de 138 pb. Para amplificação de qRT-PCR, 2 μ L do conjunto de cDNA resultante a partir da reação anterior foram utilizado numa reação de PCR contendo tampão Maxima SYBR Green / ROX Master Mix qRT-PCR (2X) (Fermentas - Thermo Scientific, Vilnius, Lituânia), 0,15 mM de cada iniciador e água produziu um volume final de 25 μ L. Condições gerais de qRT-PCR foram: desnaturação inicial a 95 °C durante 10 min, seguido por 40 ciclos à 95 °C durante 15 s, anelamento a 60 °C durante 1 min, extensão a 72 °C durante 20 s. A amplificação foi completada com um passo adicional de extensão final à 72 °C durante 5 min. A análise da curva de melting foi realizada subsequente à amplificação da sequência alvo. O programa de análise da curva de melting estava à 95 °C durante 5 s, 65 °C por 20 s, com uma taxa de transição 20 °C/s e, em seguida aumentando a 98 °C em 0.2 °C/s.

2.3.3 Efeito da ocitocina na resistência vascular renal

Para a realização dos procedimentos cirúrgicos, os animais foram anestesiados inicialmente com halotano (2% em O₂ 100%; Tanohalo; Cristália, Itapira, SP, Brasil) e cateteres foram inseridos na artéria e veia femoral direita. Um outro cateter foi inserido na veia jugular direita até se aproximar do átrio direito. Posteriormente o Halotano foi substituída pelo tiopental sódico (40 mg/kg, i.v.; Cristália Ltda, Itapira, SP, Brasil). Foi realizada a traqueostomia, para a implantação de uma cânula na traqueia do animal com o objetivo de diminuir o esforço respiratório.

Em seguida, os animais foram colocados em decúbito ventral em um aparelho estereotático (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA) e o dorso foi aberto, expondo o rim esquerdo. Uma sonda em miniatura (probe 1RB, Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, EUA) foi implantada ao redor da artéria renal esquerda para o registro do fluxo sanguíneo renal (FSR). A pressão arterial pulsátil (PAP) foi obtida conectando a cânula arterial a um transdutor de pressão (MLT0380, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) acoplado a um amplificador (Bridge Amp, ML221, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os dados foram digitalizados em uma frequência de 1000 amostras s^{-1} utilizando um conversor analógico digital (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e registrados em um computador por meio do software LabChart 7 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A PAM foi calculada a partir da integral do sinal da PAP (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália) e por meio do software LabChart 7 (ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A frequência cardíaca foi calculada como frequência instantânea a partir do sinal de PAP.

O FSR foi registrado por fluxometria de tempo de trânsito como descrito por (169). Para isso, a sonda em miniatura foi conectada a um fluxômetro T206 (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, EUA), que permitiu determinar o fluxo em valores absolutos (mL/min). Os sinais obtidos foram enviados ao sistema de aquisição e análise de dados (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os dados foram digitalizados em uma frequência de 1000 amostras s^{-1} . As variações do FSR foram calculadas como a razão percentual em relação ao valor basal (%FSR), de acordo com a fórmula:

$$\%FSR = \left[\frac{FSR_{final} - FSR_{basal}}{FSR_{basal}} \right] \cdot 100$$

A Condutância Vascular Renal (CVR) foi obtida pela razão entre o FSR e PAM. As variações da CVR foram calculadas como variação percentual em relação ao valor basal (%CVR), utilizando-se as seguintes fórmulas:

$$\%CVR = \left[\frac{CVR_{final} - CVR_{basal}}{CVR_{basal}} \right] \cdot 100$$

Durante todo o experimento, a temperatura corporal foi mantida entre 36 e 37 °C com o auxílio de uma mesa térmica.

Doses crescentes de ocitocina (0,008; 0,016 e 0,03 µg/kg, i.v) foram administradas aos animais. Posteriormente, em outro grupo de animais foi administrado o antagonista de vasopressina (VP) (Composto de Manning – 10 µg/kg, i.v; em 0,1 mL) seguidos por doses crescentes de ocitocina (0,008; 0,016 e 0,03 µg/kg, i.v). Em ratos adicionais, o antagonista de OTR, Atosiban, foi infundido durante 1 h, com início em 30 min antes da infusão das doses crescentes de ocitocina. A quantidade total de Atosiban infundido foi 40 µg/kg, i.v em um volume de 3 mL/kg. Nos ratos do grupo controle, o mesmo volume de soro fisiológico (NaCl 0,15M) foi infundido.

2.3.4 Efeito da ocitocina em anéis de artéria renal

Os ratos foram anestesiados e em seguida decapitados com uma guilhotina. A artéria renal foi limpa, removendo toda a gordura aderida e tecido conjuntivo e foi segmentada em anéis de 2 mm de comprimento. Os anéis das artérias renais foram montados sob tensão de repouso de 1,5 g em ganchos de aço inoxidável, aquecidos (37 °C) e oxigenados (95% de O₂ e 5% de CO₂) em banhos de órgãos contendo 10,0 ml de uma solução de Krebs-Henseleit modificada (pH 7,4; composição em mM/L: NaCl=130; NaHCO₃=14,9; KCl=4,7; KH₂PO₄=1,18; MgSO₄•7H₂O=1,17; CaCl₂•2H₂O=1,6 a glicose=5,5) e equilibrados durante 60 min. As mudanças na tensão basal foram registradas por transdutores isométricos conectados a um sistema de aquisição de dados (AVS Projetos, São Carlos, Brasil). Durante este período, a tensão foi ajustada periodicamente para o nível desejado e a solução de Krebs-Henseleit foi trocada a cada 15 min.

Anéis da artéria renal isentos de endotélio foram pré-contraídos com fenilefrina (1 µmol/L). Quando as respostas contráteis à fenilefrina atingiram um patamar (geralmente após 15 min) as concentrações cumulativas de ocitocina (0,3 a 3 µmol/L) foram adicionadas para avaliar os seus efeitos vasculares. Em experimentos adicionais o vasorelaxamento induzido pela ocitocina (1 µM) foi avaliado na ausência ou na presença do antagonista de receptores de ocitocina (OTR) (Atosiban – 1 mM) ou do antagonista de receptores de vasopressina V1 (Composto de Manning – 0,1

μM). O endotélio foi testado em cada recipiente por meio da observação da resposta de relaxamento à acetilcolina ($10 \mu\text{mol/L}$), após pré-contracção com fenilefrina ($1 \mu\text{mol/L}$). A ausência de efeitos vasorelaxantes induzidos pela acetilcolina foi tomada como evidência de que os anéis arteriais foram efetivamente isentos de endotélio.

2.3.5 Efeito do antagonista de receptores de ocitocina e desnervação renal nas respostas cardiovasculares e renais induzidas pela infusão de salina hipertônica

Os experimentos foram realizados no Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). Parte destes resultados foram apresentados na tese de doutorado de Gustavo Rodrigues Pedrino em 2009 e publicados de forma conjunta aos demais dados apresentados nessa tese.

Os animais foram anestesiados e divididos em quatro grupos: 1. grupo controle; 2. grupo submetido a administração intravenosa do antagonista de ocitocina (AT); 3. grupo submetido a desnervação renal bilateral (RX) e 4. grupo submetido a administração do antagonista de ocitocina e a desnervação renal bilateral (RX + AT). Os animais foram equipados com cânulas na veia e artéria femoral direita e uma sonda de fluxo foi inserida em torno da artéria renal, como descrito anteriormente. A bexiga foi cateterizada através de uma incisão suprapúbica para a coleta de urina. Cerca de 60 min depois, a salina hipertônica ($\text{NaCl } 3 \text{ M}$; $1,8 \text{ mL/kg}$, i.v.) foi infundida ao longo de 60 s. Em alguns ratos (AT), o antagonista seletivo de OTR [Mpa1, D-Try(Et)₂, Thr₄, Orn₈] - OT (Atosiban, Ferring, Suécia) foi infundido durante 1 h, 30 min antes da infusão de salina hipertônica. A quantidade total de Atosiban infundido foi $40 \mu\text{g/kg}$, i.v em um volume de 3 mL/kg . Essa dose mostrou-se eficiente para o bloqueio natriurético da ocitocina anteriormente em outros estudos e não interferiu em receptores de vasopressina (165). Em outro grupo de ratos (RX), a inervação do rim direito e esquerdo foi removido cirurgicamente, como previamente descrito (20,170). Resumidamente a artéria renal esquerda foi exposta e todos os nervos visíveis foram seccionados com o auxílio de um microscópio cirúrgico (aumento de 40 vezes). Posteriormente foi aplicada topicamente uma solução de fenol 10% (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) em álcool absoluto (LabSynth, Diadema, SP, Brasil). No outro grupo de ratos (RX + AT), a inervação do rim esquerdo e direito foi

removido e os animais foram submetidos à infusão de Atosiban 60 min após a desnervação renal. Nos ratos controle, a artéria renal foi dissecada e os nervos renais foram visualizados e mantidos intactos. Estes ratos receberam o mesmo volume (3 mL/kg) de solução salina (NaCl 0,15 M).

Amostras de sangue (0,20 mL de cada) foram retiradas através da cânula arterial 10 min antes e 10, 30, 60 e 90 min após infusão de solução salina hipertônica. A amostra foi substituída por um volume igual de salina estéril (0,15 M de NaCl). A concentração de hemoglobina no sangue, para determinação da de alterações na volêmia, foi medida imediatamente com um kit da Sigma (Reagente Drabkin, kit 525). O resto da amostra foi centrifugada durante 5 min a 6000 g. O plasma foi coletado e armazenado a -20 °C. A concentração de sódio na urina e no plasma foi medida com um fotômetro de chama (modelo DM6, Digimed, São Paulo, Brasil). A quantidade de sódio na urina foi determinada pela razão entre o volume urinário e a concentração de sódio. O balanço de sódio foi calculado como a diferença entre a quantidade infundida e a quantidade excretada.

2.3.6 Análise molecular do peptídeo natriurético atrial no coração

Os experimentos foram realizados em parceria com o Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. Os ratos foram sacrificados, o músculo cardíaco foi cortado em pequenas peças e congelado em nitrogênio líquido. Os tecidos foram macerados através de uma mistura com esferas de vidro. A análise qRT-PCR foi efetuada em triplicata a partir de um conjunto de cDNA de cada tratamento. Para o precursor do peptídeo natriurético A (ANP), foi utilizado como primer direto: 5-GGA TTT CAA GAA CCT GCT AGA-3, e como primer reverse: 5-GCT TCA TCG TGC GTC TCG C-3, resultando em um produto de PCR de 96 pb. Para GAPDH, foi utilizado como primer direto: 5-GTC GGT GTG AAC GGA TTT G-3, e como primer reverse: 5-CCG CCG CCG CTG TCT TGA G-3, com um produto de PCR de 150 pb. Todos os iniciadores foram específicos para *Rattus norvegicus*. Os dados foram normalizados utilizando o gene constitutivo GAPDH como controle endógeno, amplificado em cada conjunto de qRTPCR. As curvas foram geradas por diluição da solução de cDNA 1:5. Os

níveis de expressão relativa de genes de interesse foram calculados usando o método da curva padrão para a quantificação relativa (Bookout *et al.*, 2006).

2.3.7 Análise dos dados

Os resultados foram apresentados como médias $\pm$ E.P.M. Os valores basais das respostas cardiovasculares e os efeitos da infusão de ocitocina e dos antagonistas de OTR e de vasopressina foram analisados por ANOVA de uma via com pós-teste de Bonferroni. Os efeitos da infusão de salina hipertônica sobre os parâmetros renais e cardiovasculares foram analisados por ANOVA de duas vias com pós-teste LSD de Fisher. A expressão gênica de ANP foi expressa como média $\pm$ desvio padrão das triplicatas dos experimentos independentes e analisados por teste *t* de Student. A EC50 para o efeito da ocitocina no relaxamento vascular foi obtida por meio de regressão linear do relaxamento vascular e o log da concentração de ocitocina foi obtida utilizando o GraphPad Prism software estatístico versão 6.03 para Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, EUA).

2.4 Resultados

2.4.1 Expressão do gene para receptor de ocitocina na artéria renal

A análise de qRT-PCR indicaram que o gene OTR foi expresso na artéria renal (n=10 artérias feita a partir de 5 ratos; Figura 13). Estes resultados demonstraram que o gene OTR foi expresso como o gene constitutivo (β -actina). O valor Ct foi de $32,01 \pm 2,1$ para receptor de ocitocina e $22,08 \pm 1,3$ para β -actina. As curvas de fusão confirmaram a expressão específica do gene OTR nas artérias renais (Figura 13). Como controle, foi utilizada a expressão do gene da β -actina (Figura 13).

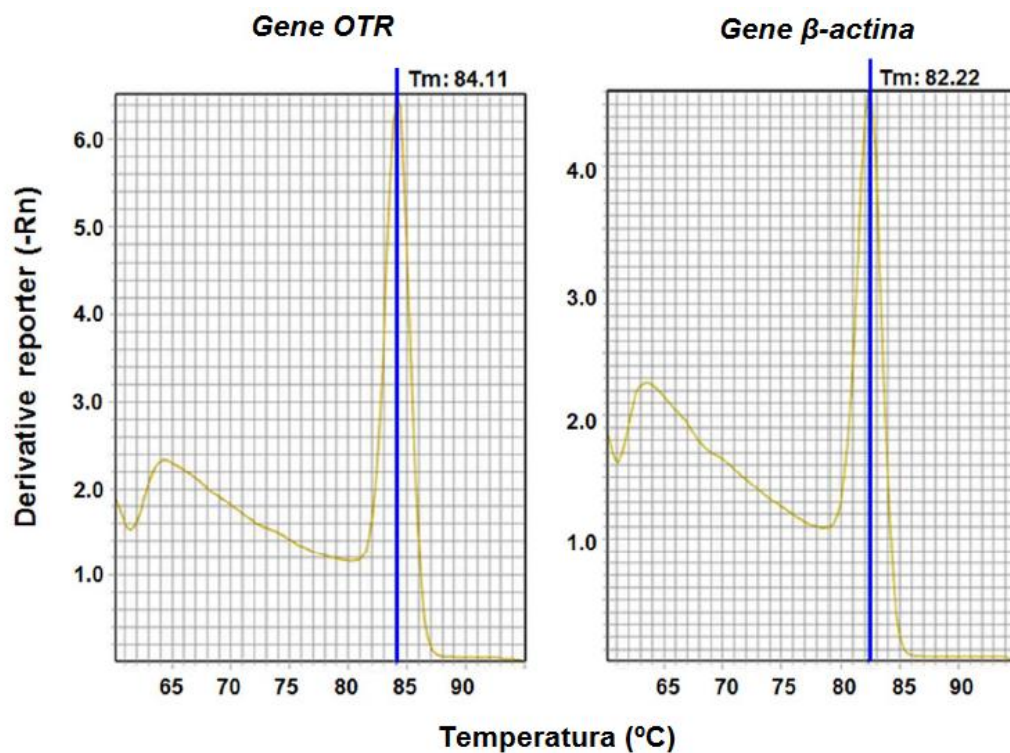


Figura 13: Curva de melting mostrando a expressão gênica específica do OTR nas artérias renais de ratos após análise de qRT-PCR. Foi utilizada a expressão gênica da β -actina como controle.

2.4.2 Efeito da ocitocina na resistência vascular renal e em anéis de artérias renais

Experimentos *in vivo* demonstraram que a infusão intravenosa de ocitocina (8, 16 ou 30 ng/kg, i.v.) em ratos anestesiadas (n=6) não alterou a pressão arterial média (PAM: $0 \pm 0,9$; 0 ± 1 ; $-1 \pm 0,6$ mmHg, respectivamente; Figura 14A). Todas as três doses de ocitocina aumentaram o fluxo sanguíneo renal (FSR: $6 \pm 0,5$; $9 \pm 0,5$; $8 \pm 0,8\%$, respectivamente; Figura 14A) e a condutância vascular renal (CVR: 6 ± 1 ; $9 \pm 1,1$; $10 \pm 0,6\%$, respectivamente; Figuras 14A e B). A vasodilatação renal iniciou-se imediatamente após a infusão e não durou mais do que 30 s. Experimentos *ex vivo* mostraram que a ocitocina produziu um relaxamento dependente da concentração nos anéis de artéria renal [Concentração que promove 50% do efeito máximo (EC50) = $0,91 \pm 0,07$ $\mu\text{mol/L}$; Figuras 15A e B; n=6 anéis a partir de 5 ratos] pré-contráídos com 1 $\mu\text{mol/L}$ de fenilefrina, sugerindo um efeito direto da ocitocina na artéria renal.

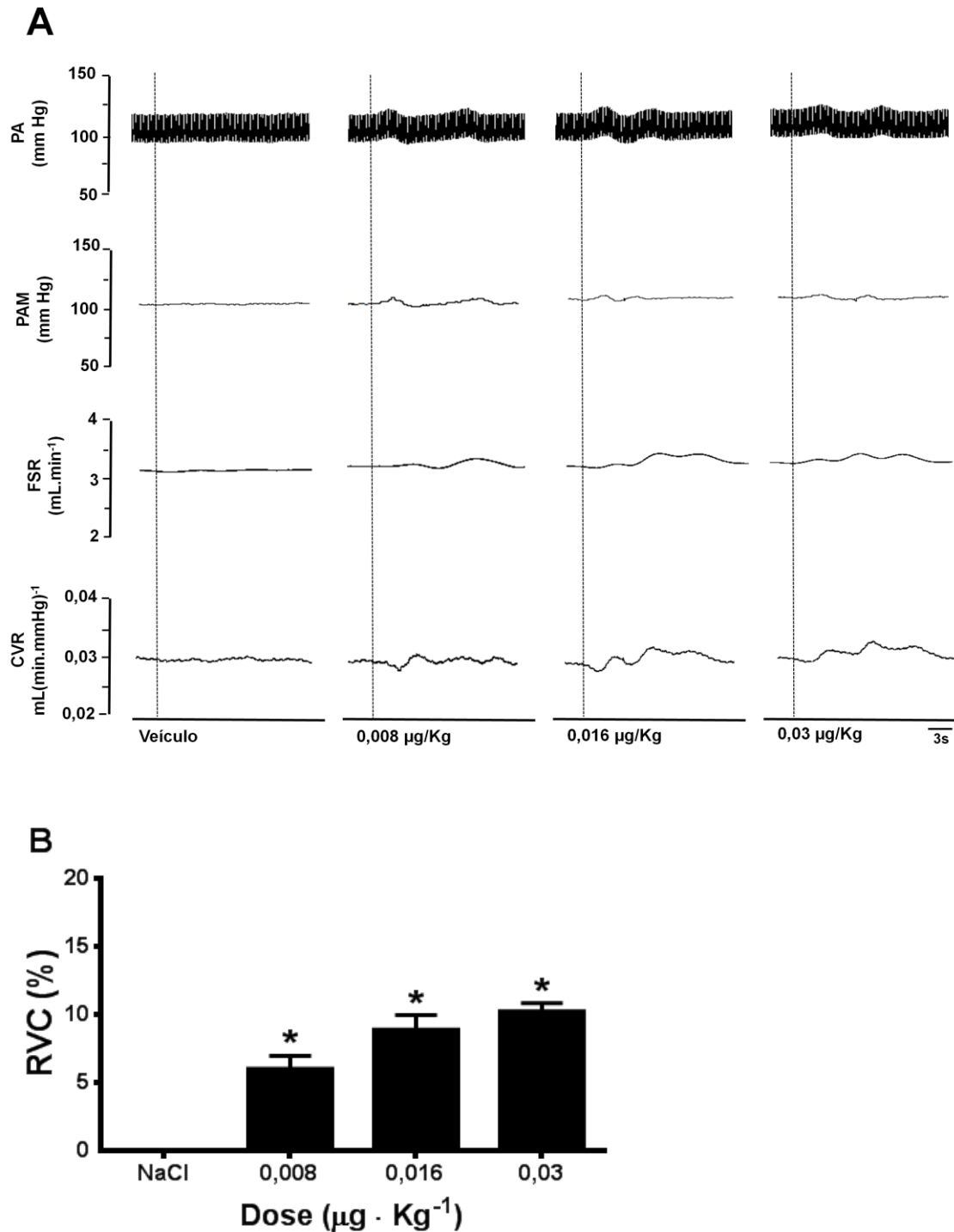


Figura 14: **A.** Traçado típico das alterações nos parâmetros cardiovasculares induzidos por injeção intravenosa de veículo (0,1 mL de NaCl 0,15 M) e ocitocina (0,008; 0,016 e 0,03 mg/kg, i.v.) em ratos anestesiados. **B.** Efeito da infusão de ocitocina ou do veículo na condutância vascular renal (RVC) em ratos anestesiados (n=6). A linha tracejada indica a injeção de ocitocina. PA = pressão arterial, PAM = pressão arterial média, FSR = fluxo sanguíneo renal, CVR = condutância vascular renal. * p < 0,05 em relação ao veículo.

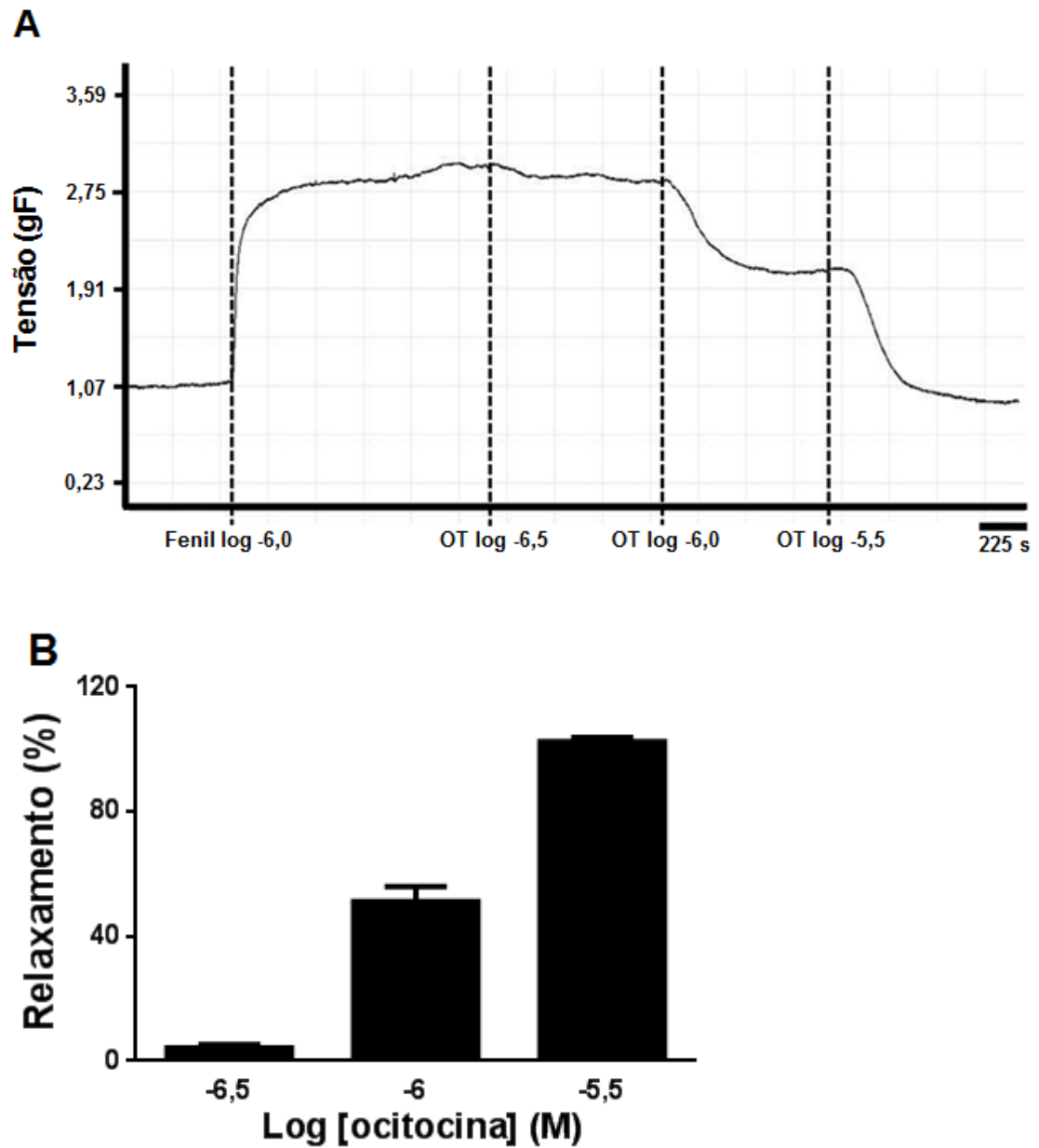


Figura 15: **A.** Traçado típico mostrando o relaxamento dose dependente induzido pela ocitocina em anéis de artéria renal de ratos. **B.** Curva de concentração-resposta do relaxamento da artéria renal isolado induzida pela oxitocina ($0,3 \times 10^{-6}$ até 3×10^{-6} M; $n=6$ anéis feitos a partir de 5 ratos). A linha tracejada indica o momento de indução pela ocitocina

2.4.3 Efeito do bloqueio dos receptores de ocitocina e de vasopressina na vasodilatação renal e relaxamento vascular induzida pela ocitocina

Experimentos *in vivo* demonstraram que o antagonista OTR, Atosiban, reduziu a vasodilatação renal induzida por OT nas três doses (8, 16 ou 30 ng/kg, i.v.) (CVR: $3 \pm 0,3$; $4 \pm 0,3$; $4 \pm 0,3$ %, respectivamente; Figuras 16A e B, n=6), ao passo que o antagonista V1, composto Manning, não afetou a vasodilatação renal induzida por OT (CVR: 7 ± 1 ; $8 \pm 0,7$; $12 \pm 1,7$ %, respectivamente; Figuras 16C e D, n=6). Experimentos *ex vivo* demonstraram que o vasorelaxamento induzido por OT (1 μ M) foi significativamente reduzida na presença do antagonista OTR, Atosiban (1 mM; Figuras 17A e C). O antagonista de vasopressina V1, Manning Composto (0,1 μ M) não reduziu o relaxamento dos vasos induzido por OT (Figura 17B e D), sugerindo um efeito direto da OT em seus receptores (OTR) na artéria renal.

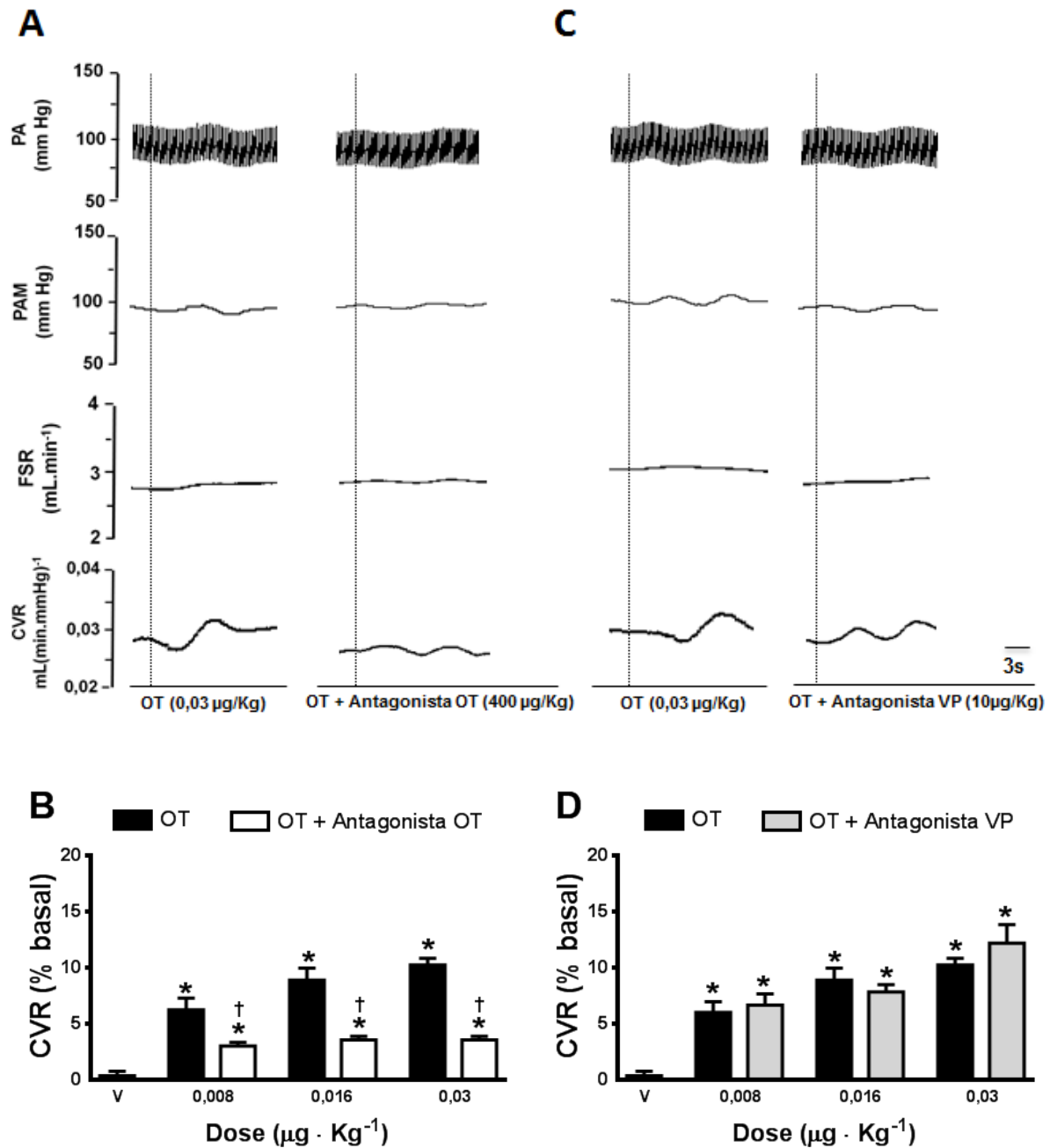


Figura 16: Traçado típico mostrando as alterações nos parâmetros cardiovasculares induzidas pela infusão intravenosa de ocitocina (OT - 0,03 mg/kg, i.v.; em 0,1 mL) antes e após administração do antagonista de OT (Atosiban; 40 mg/kg, i.v.; **A**) ou antagonista de VP (Composto de Manning; 10 mg/kg, i.v.; **C**). Efeitos da infusão de veículo ou OT (0,008; 0,016 e 0,03 mg/kg, i.v.) antes e após a administração do antagonista de OT (**B**) e do antagonista de VP (**D**) sobre a condutância vascular renal (RVC; n=6). Os resultados são expressos como a média ± E.P.M. A linha pontilhada indica a infusão de OT. PA = pressão arterial, PAM = pressão arterial média, FSR = fluxo sanguíneo renal e CVR = condutância vascular renal. *Diferente do veículo (NaCl 0,15 M). † Diferente da OT. Ambos $p < 0,05$.

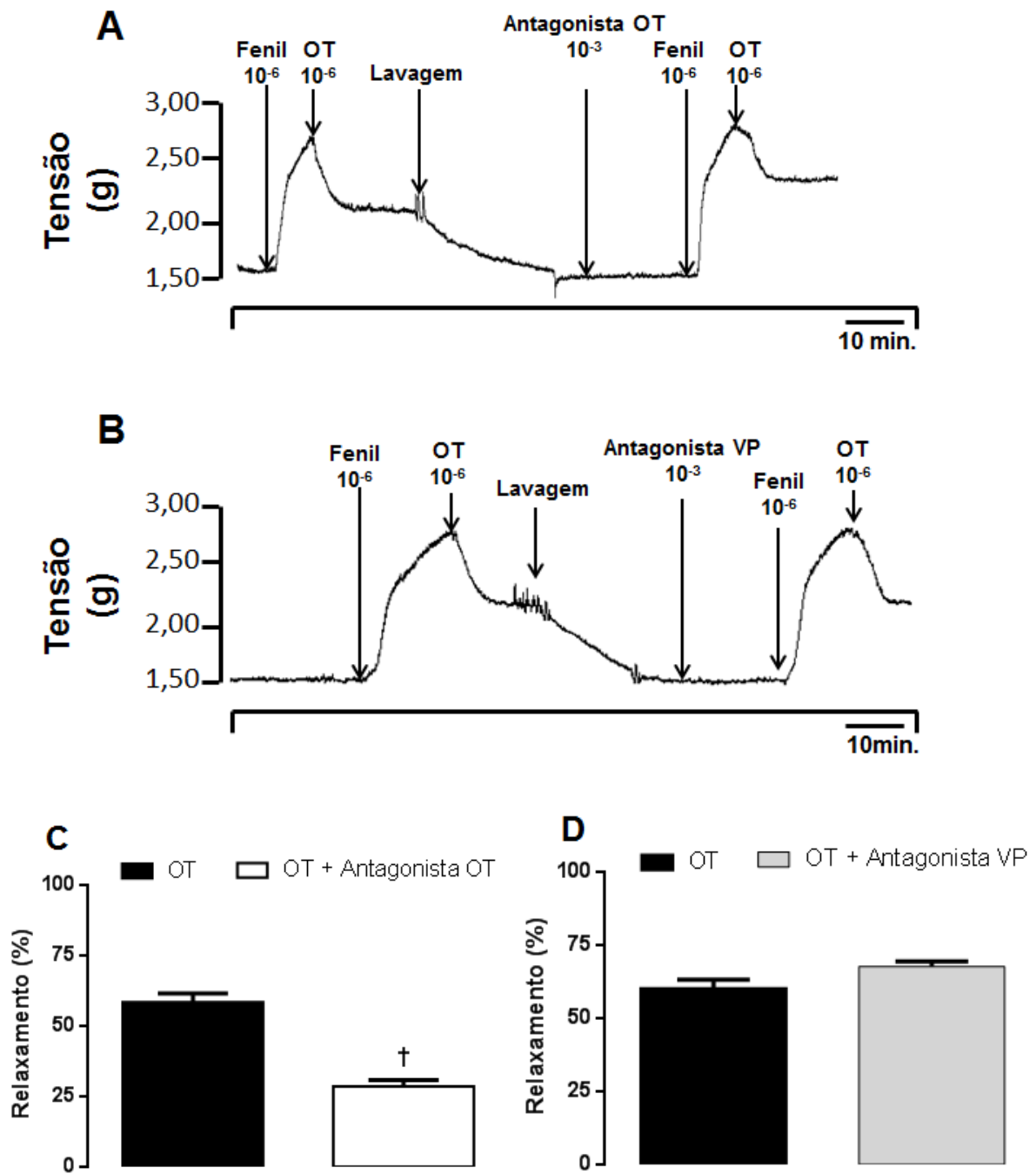


Figura 17: Traçado típico mostrando o efeito do antagonista de OTR (A) e do antagonista do receptor de VP (B) sobre a relaxamento induzido pela OT (1 μ M) em anéis de artéria renal. Efeitos do pré-tratamento com antagonista de OT (C) e antagonista de VP (D) sobre o vasorelaxamento renal induzido por OT. † Diferente da OT, $p < 0,05$.

2.4.4 Efeito da infusão de solução salina hipertônica na concentração de sódio plasmático e volemia.

Em ratos controle a infusão intravenosa de salina hipertônica (SH) provocou um aumento sustentado (>60 min) da concentração plasmática de sódio (147 ± 1 mmols/L; Figura 18A). Em AT e RX + AT, a concentração plasmática de sódio permaneceu significativamente maior do que em ratos controle ($148 \pm 0,5$ e $149 \pm 0,9$ mmols/L, respectivamente; Figura 18A). Em ratos controle, a infusão de SH não alterou a concentração de hemoglobina no sangue ($99,2 \pm 0,6$ %; Figura 18B). O mesmo efeito aconteceu nos demais grupos (AT: $99 \pm 0,5$ %; RX: $99,1 \pm 0,6$ % e RX + AT: $99,3 \pm 0,2$ %), na qual a infusão de salina hipertônica não alterou os níveis de hemoglobina no sangue (Figura 18B) indicando nenhuma alteração da volemia.

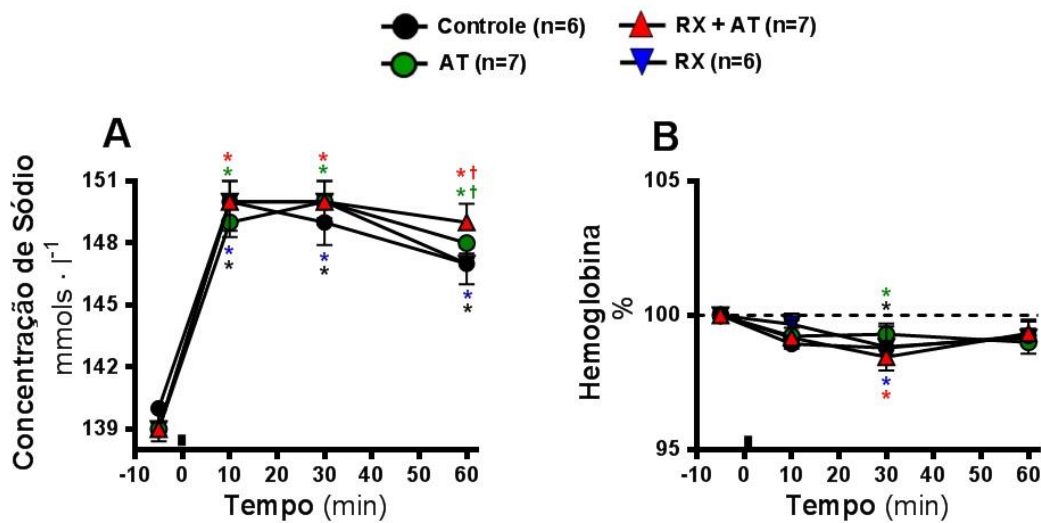


Figura 18: Efeitos do tratamento com antagonista de OTR (Atosiban; AT), desnervação renal (RX) e a combinação de Atosiban com a desnervação renal (RX + AT), nas mudanças na concentração de sódio plasmático (A) e hemoglobina no sangue (B) induzida pela infusão de SH (NaCl 3 M, 1,8 ml/kg, i.v.). As barras pretas indicam o momento da infusão de SH. *Diferente do basal. † Diferente do grupo controle, $p < 0,05$.

2.4.5 Efeitos do bloqueio dos receptores de ocitocina e da desnervação renal sobre as respostas cardiovasculares induzidas pela infusão de salina hipertônica

Os valores basais das respostas cardiovasculares estão representados na Tabela 3. Essas variáveis foram semelhantes nos ratos controle e nos ratos submetidos ao pré-tratamento com antagonista OTR (Atosiban; AT), desnervação renal (RX) e desnervação renal com pré-tratamento com Atosiban (RX + AT). Em ratos controle (n=6), a infusão de SH causou um ligeiro aumento da PAM (11 ± 3 mm Hg em relação ao basal; Figura 19A) sem alterar o ritmo cardíaco (FC: -6 ± 16 bpm em relação ao basal, 10 minutos após a infusão; Figura 19B). Dez minutos após a infusão de SH, o FSR e RVC aumentaram, e permaneceram elevados mesmo após 60 min de experimento ($162 \pm 10\%$ e $158 \pm 14\%$ em relação ao basal, respectivamente; Figura 19C-D). Em ratos AT (n=7), as alterações na PAM e FC foram semelhantes aos observados nos ratos controle (9 ± 3 mmHg e -13 ± 10 , em relação ao basal, respectivamente; Figuras 19A-B), porém, os aumentos no FSR e

na RVC foram mais reduzidos ($118 \pm 6\%$ e $118 \pm 4\%$ em relação ao basal, respectivamente; Figuras 19C-D). Em ratos RX (n=6), a infusão de SH não alterou a FC ($6 \pm 8,5$ bpm, 20 minutos após infusão, em relação ao basal), aumentou a PAM ($14 \pm 2,1$ bpm, 20 minutos após infusão, em relação ao basal) e a vasodilatação renal foi abolida ($119 \pm 4,3 \%$, 20 minutos após infusão, em relação ao basal; Figura 19). A combinação de atosiban e desnervação renal (Ratos RX + AT, n=7) potencializou a resposta pressora (19 ± 6 mmHg, 20 minutos após infusão, em relação ao basal; Figura 19A) e suprimiu a vasodilatação renal induzida pela infusão de HS ($99 \pm 5,6 \%$, 20 minutos após infusão, em relação ao basal Figura 19C-D).

Tabela 3. Valores basais da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC), fluxo sanguíneo renal (FSR) e condutância vascular renal (CVR) dos animais dos grupos atosiban (AT), com desnervação renal (RX), pré-tratados com atosiban e denervação renal (RX + AT) e controle.

Grupo	n	PAM	FC	FSR	CVR
		mmHg	Bpm	ml . min ⁻¹	mmHg . (ml . min) ⁻¹
Controle	6	115 ± 2	340 ± 15	$3,6 \pm 0,8$	$0,029 \pm 0,004$
AT	7	113 ± 5	367 ± 12	$4,5 \pm 0,7$	$0,0385 \pm 0,006$
RX	6	115 ± 3	359 ± 10	$3,5 \pm 0,7$	$0,031 \pm 0,007$
RX + AT	7	110 ± 7	354 ± 10	$3,0 \pm 0,9$	$0,021 \pm 0,003$

Os valores estão expressos em média $\pm$ E.P.M.

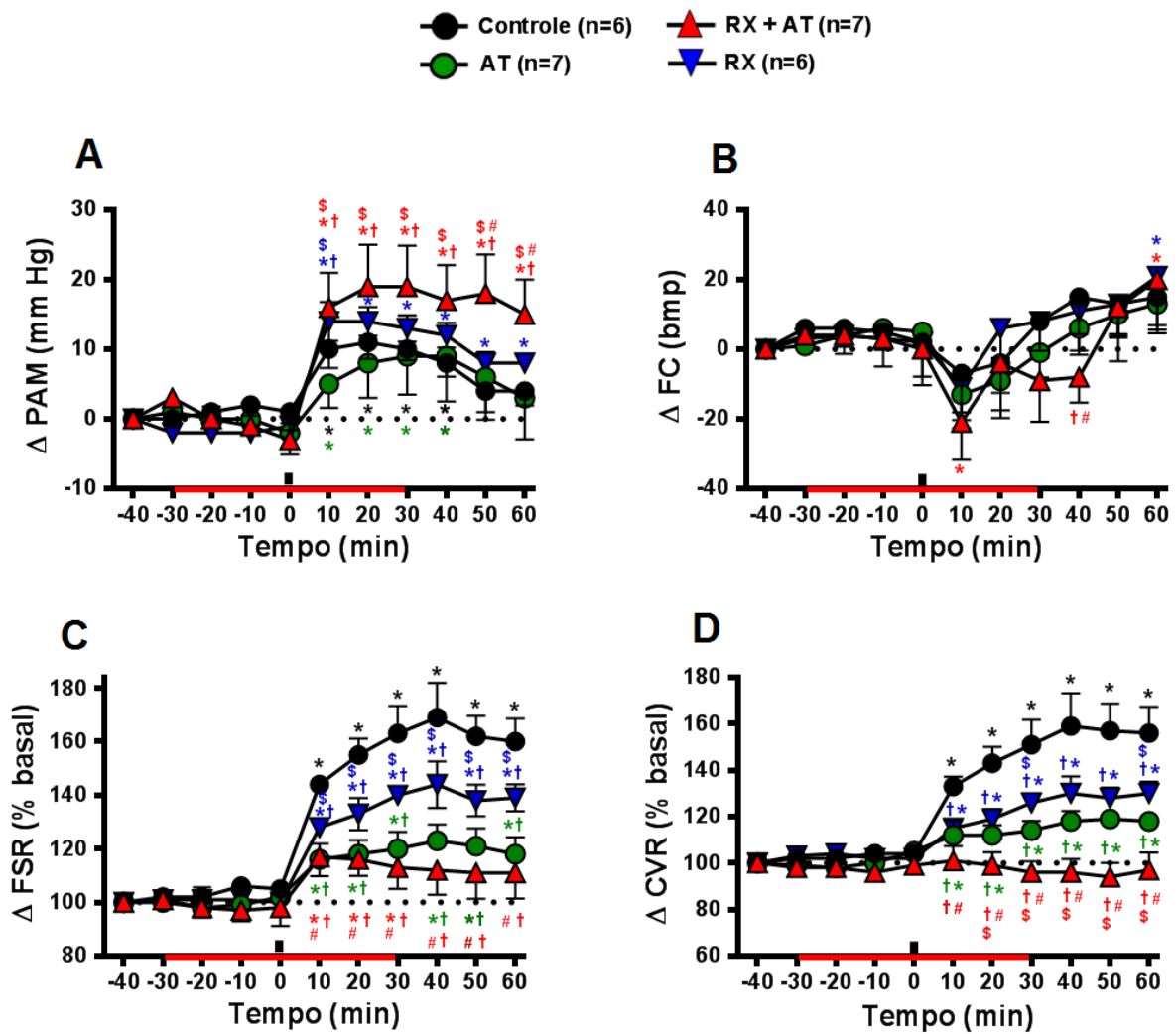


Figura 19: Efeitos do tratamento com antagonista de OTR (Atosiban; AT), desnervação renal (RX) e a combinação de Atosiban com a desnervação renal (RX + AT), nas mudanças cardiovasculares induzidas pela infusão de SH (NaCl 3 M, 1,8 mL/kg, i.v.). **A)** pressão arterial média (PAM). **B)** frequência cardíaca (FC). **C)** Fluxo sanguíneo renal (FSR). **D)** condutância vascular renal (CVR). As barras pretas indicam o momento da infusão de SH. As barras vermelhas indicam o período de infusão do antagonista de OTR ou solução salina (0,15 M de NaCl; Gupos Controle e Rx). * Diferente do basal; † Diferente do controle. \$ Diferente do Atosiban. # Diferente do RX, $p < 0,05$.

2.4.6 Efeitos do bloqueio dos receptores de ocitocina e da desnervação renal sobre a excreção urinária induzida pela infusão de salina hipertônica

Os valores basais das respostas renais estão representados na Tabela 6. A infusão de SH promoveu aumentos mantidos do fluxo urinário com pico aos 10 minutos ($3,5 \pm 0,54$ mL/h, $n=6$; Figura 20A). A diurese provocada pela SH foi reduzida pelo Atosiban ($2 \pm 0,2$ mL/h, $n=7$; Figura 20A) e pela desnervação renal ($2,0 \pm 0,14$ mL/h, $n=6$; Figura 20A), e foi reduzida ainda mais no grupo com desnervação renal + Atosiban ($1,25 \pm 0,16$ mL/h, $n=7$; Figura 20A). A concentração urinária de sódio aumentou tanto no grupo controle ($119,3 \pm 5,8$ mmols/L) quanto nos demais grupos após a infusão de SH. O aumento da concentração de sódio urinário após sobrecarga de sódio foi mais elevado no grupo AT e RX ($132,4 \pm 4,8$ e $131,5 \pm 2,9$ mmols/L; Figura 20B), sendo reduzido no grupo RX + AT ($91,6 \pm 8,3$ mmols/L; Figura 20B). Atosiban e desnervação renal ligeiramente reduziu a quantidade de sódio ($0,58 \pm 0,1$ e $0,46 \pm 0,04$ mmols) enquanto que a desnervação juntamente com Atosiban reduziu ainda mais a quantidade de sódio ($0,2 \pm 0,04$ mmols; Figura 20C). Como consequência, os ratos sham excretaram 51% do sódio injetado dentro de 90 min, os ratos AT excretaram 42%, os ratos RX excretaram 42%, e os ratos RX + AT excretaram apenas 16% da carga de sódio (Figura 20D).

Tabela 4. Valores basais do fluxo urinário (FU), concentração de sódio ($[Na^+]$), cumulativa urinária de sódio ($C[Na^+]$), e balanço de sódio (BNa^+) dos animais dos grupos atosiban (AT), com desnervação renal (RX), pré-tratados com atosiban e denervação renal (RX + AT) e controle.

Grupo	n	FU	$[Na^+]$	$C[Na^+]$	BNa^+
		ml . h ⁻¹	mmols . L ⁻¹	Mmols	mmols
Controle	6	$0,21 \pm 0,02$	$53,4 \pm 2,4$	$0,01 \pm 0,0$	$1,66 \pm 0,04$
AT	7	$0,25 \pm 0,07$	$51,1 \pm 9,1$	$0,01 \pm 0,0$	$1,71 \pm 0,04$
RX	6	$0,18 \pm 0,02$	$54,0 \pm 3,3$	$0,03 \pm 0,0$	$1,68 \pm 0,03$
RX + AT	7	$0,23 \pm 0,01$	$54,0 \pm 0,8$	$0,03 \pm 0,0$	$1,61 \pm 0,05$

Os valores estão expressos em média $\pm$ E.P.M.

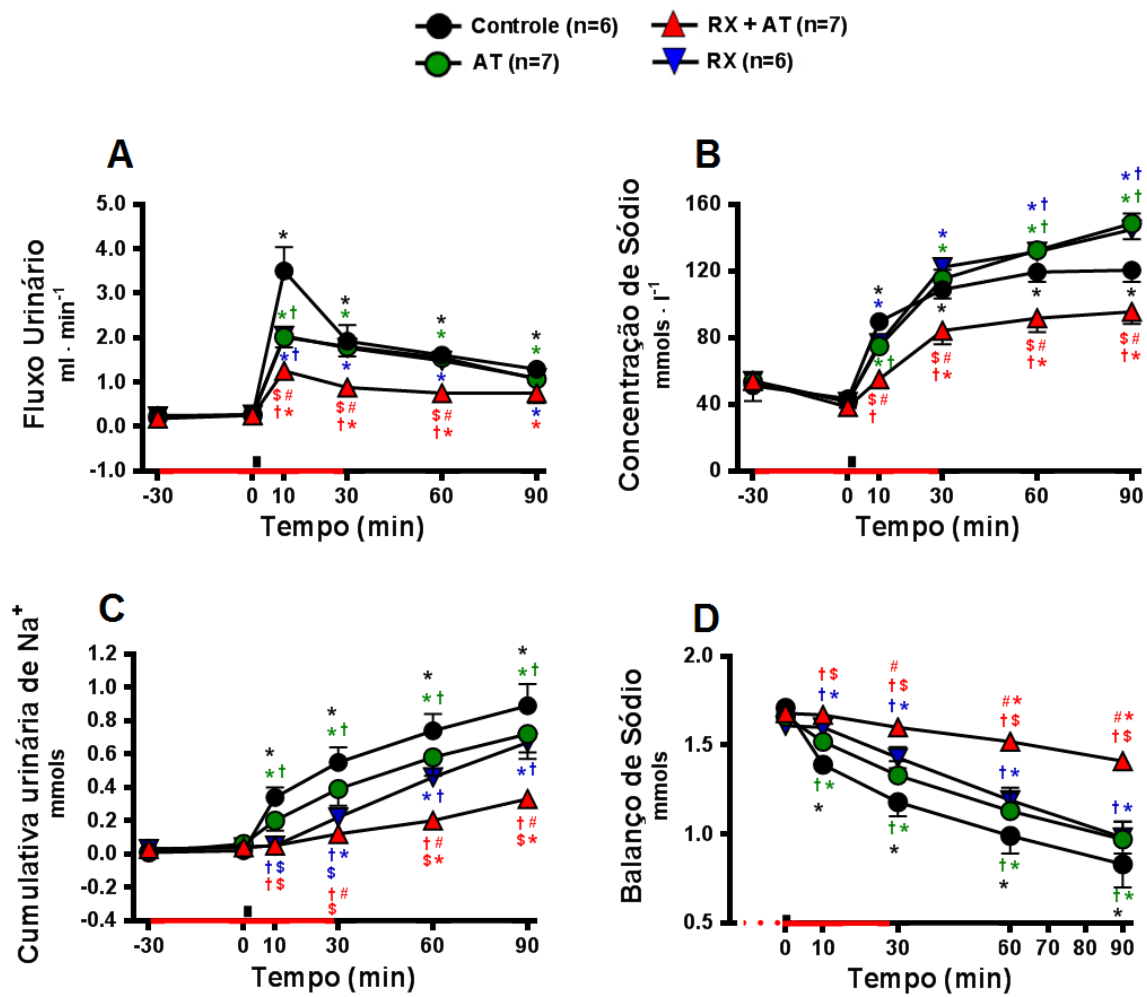


Figura 20: Efeitos do tratamento com antagonista de OTR (Atosiban; AT), desnervação renal (RX) e a combinação de Atosiban com a desnervação renal (RX + AT), nas mudanças urinárias induzidas pela infusão de SH (NaCl 3 M, 1.8 ml/kg, i.v.). **A)** Fluxo urinário. **B)** Concentração de sódio. **C)** Cumulativa urinária de sódio. **D)** Balanço de sódio. As barras pretas indicam o momento da infusão de SH. As barras vermelhas indicam o período de infusão do antagonista de OTR ou solução salina (0,15 M de NaCl; Gupos Controle e Rx). *Diferente do basal. † Diferente do controle. \$ Diferente do Atosiban. # Diferente do RX, $p < 0,05$.

2.4.7 Efeito do antagonista de receptores de ocitocina na expressão de RNAm para ANP cardíaco

O efeito do antagonista de OTR, Atosiban, na expressão do gene de ANP cardíaco foi medido por qRT-PCR. Foi observado que o pré-tratamento com

antagonista de OTR reduz a expressão gênica cardíaca para ANP em ratos submetidos à infusão de SH (Figura 21).

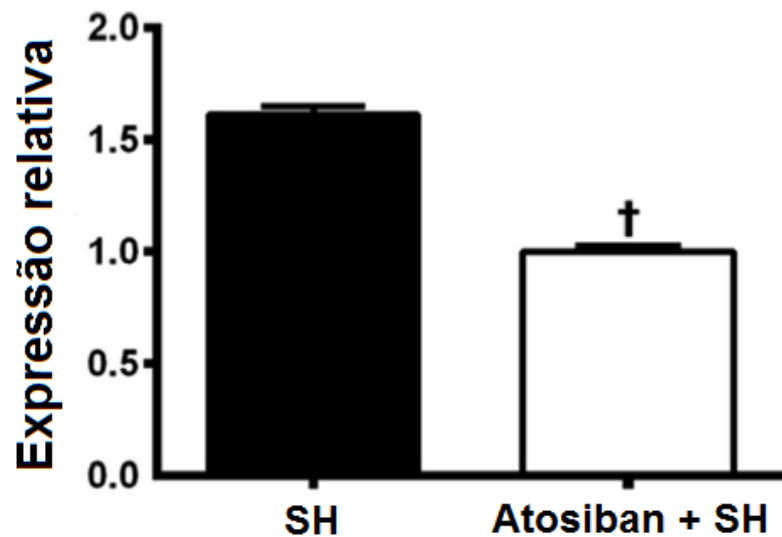


Figura 21: Efeito do bloqueio de OTR (Atosiban) sobre a expressão do RNAm do peptídeo natriurético atrial (ANP) em coração de ratos submetidos a infusão de SH (3 M de NaCl, 1,8 mL/kg, i.v. Os níveis de RNAm para ANP foram avaliadas através da técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real. Os resultados são apresentados como média $\pm$ desvio padrão das triplicatas dos experimentos independentes. † Diferente do controle, $p < 0,05$.

2.5 Discussão

Estudos prévios indicam que a administração intravenosa de OT aumenta o volume urinário (24,163), a filtração glomerular (23,163), e excreção urinária de sódio (165,166,168). No entanto, os efeitos diretos desse hormônio na reatividade vascular e sua participação nos mecanismos regulatórios ativados por um aumento na concentração de sódio no plasma ainda não haviam sido elucidado. O presente estudo evidenciou que: i) o gene para receptores de ocitocina é expresso nas artérias renais; ii) a administração de ocitocina promove o relaxamento da artéria renal, *in vivo* e *ex vivo*; iii) o bloqueio dos receptores de ocitocina e não os de vasopressina reduz o relaxamento da artéria renal, *in vivo* e *ex vivo* induzida pela ocitocina; iv) o bloqueio dos receptores de ocitocina e a desnervação renal reduz a vasodilatação renal e a natriurese induzida pela sobrecarga de sódio aguda; v) a combinação do antagonista de receptores de ocitocina e a desnervação renal abole completamente a vasodilatação renal e reduz de forma mais acentuada a natriurese induzida pela hipernatremia; e vi) a expressão do gene para ANP cardíaco induzido pela infusão de SH está diminuída na presença do antagonista de receptores de ocitocina. Em conjunto, estes dados demonstram que a vasodilatação renal e natriurese induzida pela sobrecarga de sódio é mediada pela ação combinada da ocitocina e dos nervos renais.

As alterações da osmolaridade do compartimento extracelular afetam todos os tecidos perfundidos e pode alterar o volume e metabolismo celular (134). Alterações agudas da osmolaridade podem induzir convulsões, paralisia, coma e morte (135,171). Assim, a regulação precisa da pressão osmótica e, por conseguinte, o volume intracelular é crucial para a sobrevivência. Perturbações nestes mecanismos de regulação têm sido associados com a patofisiologia de doenças cardiovasculares, particularmente a hipertensão (17,19,172), e doenças relacionadas com a retenção de sódio renal, como a cirrose e insuficiência cardíaca.

O presente estudo demonstrou que a ocitocina induziu um relaxamento dose-dependente em artérias renais tanto *in vivo* como *ex vivo*. Os complexos mecanismos envolvidos na gênese e manutenção da vasodilatação renal induzida por aumento na concentração de sódio plasmático são pouco compreendidos e parecem envolver mecanismos humorais e autonômicos (20,145,156,173,174). Os

resultados *ex vivo* apresentados nesse trabalho demonstraram que a ocitocina pode atuar sobre receptores de ocitocina na vasculatura renal para promover a vasodilatação. Evidências experimentais têm evidenciado que a hipernatremia induz a secreção de ocitocina (167,175). Os presentes dados mostraram que o bloqueio dos receptores de ocitocina aboliu a vasodilatação e reduziu a natriurese induzida pela sobrecarga de sódio. Juntos, estes resultados indicam que a ocitocina está envolvida nas respostas cardiovasculares e renais, ao aumento na concentração de sódio plasmático. Até o presente momento, não há outras evidências de que a ocitocina medeia a vasodilatação renal induzida por hipernatremia. Embora a administração de salina hipertônica na dose e concentração utilizadas no presente estudo tenha aumentado a concentração plasmática de sódio, ela não foi capaz de alterar significativamente a concentração de hemoglobina no sangue, sugerindo que não houve alterações na volemia. Isto é consistente com estudos anteriores utilizando o mesmo protocolo (22,145,158,173). Portanto, é provável que os ajustes cardiovasculares e renais induzidos pela infusão de SH foram devidos a um aumento da concentração de sódio e não pela expansão de volume.

Tem sido proposto que a natriurese e vasodilatação renal induzida pela ocitocina são efeitos consequentes da estimulação dos receptores de ocitocina cardíacos que consequentemente estimulam a liberação de ANP (24,164,166,176). No presente estudo demonstrou-se que um antagonista dos receptores de ocitocina reduziu a expressão gênica para ANP cardíaco induzida por infusão de SH. Os resultados aqui apresentados são consistentes com estudos realizados por Haanwinckel e colaboradores em 1995 (24) que demonstraram que a administração intraperitoneal ou intravenosa de ocitocina provoca um aumento na concentração plasmática de ANP. Além disso, Gutkowska e colaboradores em 1997 (176) demonstraram que receptores de ocitocina eram funcionais e importantes para a secreção de ANP, pois o seu bloqueio reduziu a liberação de ANP induzida pela administração de ocitocina. Uma vez na circulação, o ANP pode estimular a vasodilatação renal e natriurese (170). Também demonstrou-se que a ocitocina pode atuar diretamente sobre as artérias renais causando seu relaxamento. No geral, estes resultados sugerem que a ocitocina pode atuar tanto de forma direta como indireta (através de ANP) para promover a vasodilatação renal.

Mecanismos neurais também regulam a excreção de sódio. A estimulação do nervo renal promove a secreção de renina, vasoconstrição renal, e reabsorção tubular de sódio (157), reduzindo as perdas renais de sódio. A hipernatremia plasmática inibe a atividade simpática renal, estimulando a excreção de sódio (139,141). Um estudo anterior do nosso laboratório (20) tem demonstrado que a desnervação renal reduz a vasodilatação renal induzida pela sobrecarga de sódio, sugerindo que esta vasodilatação é em parte uma consequência da simpatoinibição renal. Além disso, no presente estudo, evidenciou-se que a combinação de desnervação renal e bloqueio dos receptores de ocitocina abole a vasodilatação renal e reduz natriurese. Em conjunto, estes resultados sugerem um efeito aditivo da secreção de ocitocina e nervos renais com a natriurese e vasodilatação renal induzida pela sobrecarga de sódio.

Os resultados apresentados no presente estudo também evidenciaram que a resposta hipertensora à hipernatremia é maior em ratos submetidos a desnervação renal e/ou ao bloqueio dos receptores de ocitocina. Em vários estudos onde a vasodilatação renal induzida pela hipernatremia foi abolida, foi identificada uma resposta hipertensora potencializada tanto na magnitude, quanto na duração (141) (22,145,146). Anteriormente foi proposto que a hipernatremia inicialmente estimulava a secreção de peptídeos vasoativos (ANP e OT) e reduzia a atividade simpática renal. Este mecanismo proporcionam uma redução da resistência vascular renal e reabsorção de sódio, que culminam na excreção sódio. Se este mecanismo inicial ativado para corrigir a hipernatremia falhar, ocorre um aumento generalizado da atividade simpática que resulta em hipertensão arterial, levando a um aumento na pressão de perfusão renal, taxa de filtração glomerular e, consequente, natriurese (177). Baseando-se nessas evidências, o aumento da resposta pressora à hipernatremia observada em animais sujeitos a desnervação renal com bloqueio dos receptores de ocitocina pode ser devido à ineficácia do mecanismo inicial, resultando em um aumento generalizado na atividade simpática e consequente hipertensão. É válido ressaltar, no entanto, que os resultados também indicam que este mecanismo de elevação da pressão arterial não foi eficiente para a excreção de sódio, uma vez que apenas 16% da carga de sódio foram excretadas durante os próximos 90 min em ratos sujeitos a desnervação renal com bloqueio dos receptores de ocitocina.

2.6 Considerações finais

O presente estudo evidenciou que a administração de ocitocina promove o relaxamento da artéria renal, *in vivo* e *ex vivo* e que o bloqueio dos receptores de ocitocina e não os de vasopressina reduz o relaxamento da artéria renal induzida pela ocitocina. Foi evidenciado também que o bloqueio dos receptores de ocitocina e a desnervação renal reduz a vasodilatação renal e a natriurese induzida pela sobrecarga de sódio aguda e que a combinação do antagonista de receptores de ocitocina e a desnervação renal abole completamente a vasodilatação renal e reduz de forma mais acentuada a natriurese induzida pela hipernatremia. Em conjunto, estes dados demonstram que a vasodilatação renal e natriurese induzida pela sobrecarga de sódio são mediadas pela ação combinada da ocitocina e dos nervos renais.

Conclusão

No presente estudo evidenciou-se de forma inédita que a exposição prolongada à dieta hiperlipídica durante uma fase crítica do desenvolvimento da prole altera a modulação da atividade simpática e respiratória. Fortes evidências encontradas na literatura sugerem que essas alterações são possivelmente desencadeadas por um desequilíbrio nos níveis séricos de leptina e por uma maior ativação do SRA decorrente da obesidade, mas os mecanismos que levaram a essas alterações não foram avaliados no presente estudo e precisam ser melhores investigados. Também evidenciou-se que a secreção de ocitocina e os nervos renais desempenham um papel importante na vasodilatação renal induzida pela hiperosmolaridade. Isto sugere que tanto mecanismos humorais (ocitocinérgicos) quanto mecanismos autonômicos (atividade simpática) são muito importantes na modulação de respostas cardiovasculares em condições de hipernatremia. O desequilíbrio em um ou ambos os mecanismos podem contribuir para várias condições patológicas, incluindo alguns modelos de hipertensão experimental.

A compreensão da influência da obesidade materna e o consumo exacerbado de dieta hiperlipídica durante o período de gestação e lactação sobre o desenvolvimento da prole é primordial na busca de justificativas que tentem explicar os altos índices de obesidade infantil que provoca sérias consequências físicas, sociais e psicológicas. É de extrema importância também a compreensão dos mecanismos regulatórios ativados durante a hiperosmolaridade, visto que as altas concentrações de sódio presentes nas dietas ocidentais e a falha nesses mecanismos de ajustes têm provocado os altos índices de doenças cardiovasculares na população mundial. O amplo conhecimento na área permite uma maior possibilidade de desenvolvimento de novas ferramentas terapêuticas para a prevenção e tratamento da hipertensão.

Referências

1. WHO. WHO _ Cardiovascular diseases (CVDs). Cardiovascular diseases (CVDs). 2015.
2. Cardiologia SB de, Hipertensão SB de, Nefrologia SB de. [VI Brazilian Guidelines on Hypertension]. Arq Bras Cardiol. 2010;95(1):1–51.
3. Grimson KS, Orgain ES, Anderson B, D'Angelo GJ. Total thoracic and partial to total lumbar sympathectomy, splanchnicectomy and celiac ganglionectomy for hypertension. Ann Surg. 1953;138(4):532–47.
4. Schlaich MP, Lambert E, Kaye DM, Krozowski Z, Campbell DJ, Lambert G, et al. Sympathetic Augmentation in Hypertension: Role of Nerve Firing, Norepinephrine Reuptake, and Angiotensin Neuromodulation. Hypertension. 2004;43(2 Pt 1):169–75.
5. Bergamaschi C, Campos RR, Schor N, Lopes OU. Role of the rostral ventrolateral medulla in maintenance of blood pressure in rats with Goldblatt hypertension. Hypertension. 1995;26(6 Pt 2):1117–20.
6. Bergamaschi CT, Campos RR, Lopes OU. Rostral Ventrolateral Medulla : A Source of Sympathetic Activation in Rats Subjected to Long-Term Treatment With L-NAME. Hypertension. 1999;34(4):744–7.
7. Grassi G, Mark A, Esler M. The Sympathetic Nervous System Alterations in Human Hypertension. Vol. 116, Circulation Research. 2015. p. 976–90.
8. Mann SJ. Neurogenic essential hypertension revisited: The case for increased clinical and research attention. Vol. 16, American Journal of Hypertension. 2003. p. 881–8.
9. Pedersen BK, Febbraio MA. Muscles, exercise and obesity: Skeletal muscle as a secretory organ. Vol. 8, Nature Reviews Endocrinology. 2012. p. 457–65.
10. Taylor PD, Poston L. Developmental programming of obesity in mammals. Vol. 92, Experimental Physiology. 2007. p. 287–98.
11. Waki H, Gouraud SS, Maeda M, Paton JFR. Gene expression profiles of major

- cytokines in the nucleus tractus solitarii of the spontaneously hypertensive rat. *Auton Neurosci Clin.* 2008;142(1–2):40–4.
12. Hall JE, Da Silva AA, Do Carmo JM, Dubinion J, Hamza S, Munusamy S, et al. Obesity-induced hypertension: Role of sympathetic nervous system, leptin, and melanocortins. Vol. 285, *Journal of Biological Chemistry.* 2010. p. 17271–6.
 13. Bassi M, Furuya WI, Zoccal DB, Menani J V., Colombari E, Hall JE, et al. Control of respiratory and cardiovascular functions by leptin. *Life Sci.* 2015;125:25–31.
 14. Aghamohammadzadeh R, Heagerty AM. Obesity-related hypertension: Epidemiology, pathophysiology, treatments, and the contribution of perivascular adipose tissue. Vol. 44, *Annals of Medicine.* 2012.
 15. Taylor PD, Samuelsson AM, Poston L. Maternal obesity and the developmental programming of hypertension: A role for leptin. Vol. 210, *Acta Physiologica.* 2014. p. 508–23.
 16. Keys A. Coronary heart disease in seven countries. Vol. 41, *Circulation.* 1970. p. 186–95.
 17. Horan MJ, Blaustein MP, Dunbar JB, Grundy S, Kachadorian W, Kaplan NM, et al. NIH report on research challenges in nutrition and hypertension. *Hypertension.* 1985;7(5):818–23.
 18. Law MR, Frost CD, Wald NJ. By how much does dietary salt reduction lower blood pressure? III--Analysis of data from trials of salt reduction. *BMJ* 1991;302(6780):819–24.
 19. Simons-Morton DG, Obarzanek E. Diet and blood pressure in children and adolescents. *Pediatr Nephrol.* 1997;11(2):244–9.
 20. Pedrino GR, Rosa DA, Korim WS, Cravo SL. Renal sympathoinhibition induced by hypernatremia: Involvement of A1 noradrenergic neurons. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2008;142(1–2):55–63.
 21. Colombari DS, Colombari E, Lopes OU, Cravo SL. Afferent pathways in cardiovascular adjustments induced by volume expansion in anesthetized rats.

- Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol. 2000;279(3):R884-90.
22. Pedrino GR, Monaco LR, Cravo SL. Renal Vasodilation Induced By Hypernatremia: Role Of {Alpha-Adrenoceptors} In The Median Preoptic Nucleus. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2009;
 23. Conrad KP, Gellai M, North WG, Valtin H. Influence of oxytocin on renal hemodynamics and electrolyte and water excretion. Am J Physiol 1986;251(2 Pt 2):F290-6.
 24. Haanwinckel MA, Eliast LK, Favaretrot AL V, Gutkowskat J, Mccann SM, Antunes-Rodrigues J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. Proc Natl Acad Sci USA. 1995;92:7902–6.
 25. Baccarelli A, Ghosh S. Environmental exposures, epigenetics and cardiovascular disease. Vol. 15, Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care. 2012. p. 323–9.
 26. Finucane MM, Stevens GA, Cowan MJ, Danaei G, Lin JK, Paciorek CJ, et al. National, regional, and global trends in body-mass index since 1980: Systematic analysis of health examination surveys and epidemiological studies with 960 country-years and 9.1 million participants. Lancet. 2011;377(9765):557–67.
 27. Heber D. An integrative view of obesity. In: American Journal of Clinical Nutrition. 2010.
 28. Ozanne SE. Epigenetic Signatures of Obesity. N Engl J Med 2015;372(10):973–4.
 29. WHO. WHO | Obesity and overweight. Who. 2017.
 30. IBGE. Pesquisa Nacional de Saúde 2013 Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). 2014. 181 p.
 31. Bahia L, Araújo DV. Impacto econômico da obesidade no Brasil. Rev Hosp Univ Pedro Ernesto 2014;13(1).

32. Cecchini M, Warin L. Impact of food labelling systems on food choices and eating behaviours: A systematic review and meta-analysis of randomized studies. *Obes Rev.* 2016;17(3):201–10.
33. Erdos B, Kirichenko N, Whidden M, Basgut B, Woods M, Cudykier I, et al. Effect of age on high-fat diet-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011;301(1):H164-72.
34. De Kloet AD, Krause EG, Shi PD, Zubcevic J, Raizada MK, Sumners C. Neuroimmune communication in hypertension and obesity: A new therapeutic angle? Vol. 138, *Pharmacology and Therapeutics*. 2013. p. 428–40.
35. O'Donnell CP, Schaub CD, Haines AS, Berkowitz DE, Tankersley CC, Schwartz AR, et al. Leptin prevents respiratory depression in obesity. *Am J Respir Crit Care Med*. 1999;159(5 Pt 1):1477–84.
36. O'Donnell CP, Tankersley CG, Polotsky VP, Schwartz AR, Smith PL. Leptin, obesity, and respiratory function. Vol. 119, *Respiration physiology*. 2000. p. 163–70.
37. Hilzendeger AM, Morgan DA, Brooks L, Dellsperger D, Liu X, Grobe JL, et al. A brain leptin-renin angiotensin system interaction in the regulation of sympathetic nerve activity. *AJP Heart Circ Physiol* 2012;303(2):H197–206.
38. Sriramula S, Cardinale JP, Francis J. Inhibition of TNF in the Brain Reverses Alterations in RAS Components and Attenuates Angiotensin II-Induced Hypertension. *PLoS One*. 2013;8(5).
39. de Kloet AD, Pioquinto DJ, Nguyen D, Wang L, Smith JA, Hiller H, et al. Obesity induces neuroinflammation mediated by altered expression of the renin-angiotensin system in mouse forebrain nuclei. *Physiol Behav*. 2014;136:31–8.
40. Xue B, Thunhorst RL, Yu Y, Guo F, Beltz TG, Felder RB, et al. Central Renin-Angiotensin System Activation and Inflammation Induced by High-Fat Diet Sensitize Angiotensin II-Elicited Hypertension. *Hypertension*. 2016;67(1):163–70.

41. Raphael RR, Lopes KL, Carillo BA, Bergamaschi CT, Carmona AK, Casarini DE, et al. Sympathetic and Renin-Angiotensin Systems Contribute to Increased Blood Pressure in Sucrose-Fed Rats. *Am J Hypertens*. 2007;20(6):692–8.
42. Speretta G, Rosante M, Duarte F, Leite R, Lino A, Andre R, et al. The effects of exercise modalities on adiposity in obese rats. *Clinics* 2012;67(12):1469–77.
43. Speretta GF, Silva AA, Vendramini RC, Zanesco A, Delbin MA, Menani J V., et al. Resistance training prevents the cardiovascular changes caused by high-fat diet. *Life Sci*. 2016;146:154–62.
44. Fardin NM, Oyama LM, Campos RR. Changes in baroreflex control of renal sympathetic nerve activity in high-fat-fed rats as a predictor of hypertension. *Obesity*. 2012;20(8):1591–7.
45. Arnold AC, Shaltout HA, Gallagher PE, Diz DI. Leptin impairs cardiovagal baroreflex function at the level of the solitary tract nucleus. *Hypertension*. 2009;54(5):1001–8.
46. Putnam K, Shoemaker R, Yiannikouris F, Cassis LA. The renin-angiotensin system: a target of and contributor to dyslipidemias, altered glucose homeostasis, and hypertension of the metabolic syndrome. *AJP Hear Circ Physiol* [Internet]. 2012;302(6):H1219–30.
47. Boustany CM. AT1-receptor antagonism reverses the blood pressure elevation associated with diet-induced obesity. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 2005;289(1):R181–6.
48. De Souza CT, Araujo EP, Bordin S, Ashimine R, Zollner RL, Boschero AC, et al. Consumption of a fat-rich diet activates a proinflammatory response and induces insulin resistance in the hypothalamus. *Endocrinology*. 2005;146(10):4192–9.
49. Plata-Salamán CR. Immunoregulators in the nervous system. *Neurosci Biobehav Rev*. 1991;15(2):185–215.
50. Nishi Y, Isomoto H, Uotani S, Wen CY, Shikuwa S, Ohnita K, et al. Enhanced production of leptin in gastric fundic mucosa with *Helicobacter pylori* infection.

World J Gastroenterol. 2005;11(5):695–9.

51. Hassink SG, de Lancey E, Sheslow D V., Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, Considine R V., et al. Placental Leptin: An Important New Growth Factor in Intrauterine and Neonatal Development? Pediatrics [Internet]. 1997;100(1):e1–e1.
52. Smith-Kirwin SM, O'Connor DM, De Johnston J, Lancey ED, Hassink SG, Funanage VL. Leptin expression in human mammary epithelial cells and breast milk. J Clin Endocrinol Metab. 1998;83(5):1810–3.
53. Cassis LA, English VL, Bharadwaj K, Boustany CM. Differential Effects of Local Versus Systemic Angiotensin II in the Regulation of Leptin Release from Adipocytes. Endocrinology. 2004;145(1):169–74.
54. Bado A, Levasseur S, Attoub S, Kermorgant S, Laigneau JP, Bortoluzzi MN, et al. The stomach is a source of leptin. Nature. 1998;394(6695):790–3.
55. Masuzaki H, Ogawa Y, Sagawa N, Hosoda K, Matsumoto T, Mise H, et al. Nonadipose tissue production of leptin: Leptin as a novel placenta- derived hormone in humans. Nat Med. 1997;3(9):1029–33.
56. Cinti S, Frederich RC, Zingaretti MC, De Matteis R, Flier JS, Lowell BB. Immunohistochemical localization of leptin and uncoupling protein in white and brown adipose tissue. Endocrinology 1997;138(2):797–804.
57. Tartaglia LA, Dembski M, Weng X, Deng N, Culpepper J, Devos R, et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. Cell. 1995;83(7):1263–71.
58. Touw IP, De Koning JP, Ward AC, Hermans MHA. Signaling mechanisms of cytokine receptors and their perturbances in disease. Vol. 160, Molecular and Cellular Endocrinology. 2000. p. 1–9.
59. Friedman JM. The function of leptin in nutrition, weight, and physiology. Nutr Rev. 2002;60(10):S1–14.
60. Elias CF, Kelly JF, Lee CE, Ahima RS, Drucker DJ, Saper CB, et al. Chemical characterization of leptin-activated neurons in the rat brain. J Comp Neurol.

2000;423(2):261–81.

61. Bassi M, Giusti H, Leite CM, Anselmo-Franci JA, Do Carmo JM, Da Silva AA, et al. Central leptin replacement enhances chemorespiratory responses in leptin-deficient mice independent of changes in body weight. *Pflugers Arch Eur J Physiol.* 2012;464(2):145–53.
62. Bassi M, Furuya WI, Zoccal DB, Menani J V., Colombari DSA, Mulkey DK, et al. Facilitation of breathing by leptin effects in the central nervous system. *J Physiol.* 2016;594(6):1617–25.
63. Mark AL, Agassandian K, Morgan DA, Liu X, Cassell MD, Rahmouni K. Leptin signaling in the nucleus tractus solitarii increases sympathetic nerve activity to the kidney. *Hypertension.* 2009;53(2):375–80.
64. Mercer JG, Moar KM, Hoggard N. Localization of Leptin Receptor (Ob-R) Messenger Ribonucleic Acid in the Rodent Hindbrain. *Endocrinology.* 1998;139(1):29–34.
65. Heymsfield SB, Greenberg AS, Fujioka K, Dixon RM, Kushner R, Hunt T, et al. Recombinant leptin for weight loss in obese and lean adults: A randomized, controlled, dose-escalation trial. *J Am Med Assoc.* 1999;282(16):1568–75.
66. &NA; Serum Immunoreactive-Leptin Concentrations in Normal-Weight and Obese Humans. *Endocrinologist* 1996;6(4):349.
67. Heslehurst N, Rankin J, Wilkinson JR, Summerbell CD. A nationally representative study of maternal obesity in England, UK: Trends in incidence and demographic inequalities in 619 323 births, 1989-2007. *Int J Obes.* 2010;34(3):420–8.
68. Harvey NC, Poole JR, Javaid MK, Dennison EM, Robinson S, Inskip HM, et al. Parental determinants of neonatal body composition. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007;92(2):523–6.
69. Oken E. Excess gestational weight gain amplifies risks among obese mothers. Vol. 20, *Epidemiology.* 2009. p. 82–3.
70. Ng M, Fleming T, Robinson M, Thomson B, Graetz N, Margono C, et al.

- Global, regional, and national prevalence of overweight and obesity in children and adults during 1980-2013: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet*. 2014;384(9945):766–81.
71. de Onis M, Blössner M, Borghi E. Global prevalence and trends of overweight and obesity among preschool children. *Am J Clin Nutr*. 2010;92(5):1257–64.
 72. Poston L. Maternal obesity, gestational weight gain and diet as determinants of offspring long term health. Vol. 26, *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2012. p. 627–39.
 73. Dearden L, Ozanne SE. Early life origins of metabolic disease: Developmental programming of hypothalamic pathways controlling energy homeostasis. Vol. 39, *Frontiers in Neuroendocrinology*. 2015. p. 3–16.
 74. de Brito Alves JL, Nogueira VO, Cavalcanti Neto MP, Leopoldino AM, Curti C, Colombari DS, et al. Maternal Protein Restriction Increases Respiratory and Sympathetic Activities and Sensitizes Peripheral Chemoreflex in Male Rat Offspring. *J Nutr* 2015;145(5):907–14.
 75. Guimaraes KSL, de Araujo EV, Aquino JS, Gadelha DA, Balarini CM, Costa-Silva JH, et al. Effect of maternal dyslipidaemia on the cardiorespiratory physiology and biochemical parameters in male rat offspring. *Br J Nutr*. 2017;1–12.
 76. Mehler MF. Epigenetic principles and mechanisms underlying nervous system functions in health and disease. Vol. 86, *Progress in Neurobiology*. 2008. p. 305–41.
 77. Barker DJ, Osmond C, Golding J, Kuh D, Wadsworth ME. Growth in utero, blood pressure in childhood and adult life, and mortality from cardiovascular disease. *BMJ*. 1989;298(6673):564–7.
 78. Schlaich MP, Grassi G, Lambert GW, Straznicky N, Esler MD, Dixon J, et al. European society of hypertension working group on obesity obesity-induced hypertension and target organ damage: Current knowledge and future directions. Vol. 27, *Journal of Hypertension*. 2009. p. 207–11.

79. Lee SD, Nakano H, Farkas GA. NMDA receptor-mediated modulation of ventilation in obese Zucker rats. *Int J Obes*. 2001;25(7):997–1004.
80. Teixeira D, Cecconello AL, Partata WA, de Fraga LS, Ribeiro MFM, Guedes RP. The metabolic and neuroinflammatory changes induced by consuming a cafeteria diet are age-dependent. *Nutritional Neuroscience*. 2017;1–11.
81. Li M, Reynolds CM, Sloboda DM, Gray C, Vickers MH. Maternal taurine supplementation attenuates maternal fructose-induced metabolic and inflammatory dysregulation and partially reverses adverse metabolic programming in offspring. *J Nutr Biochem*. 2015;26(3):267–76.
82. Estadella D, Oyama LM, Dâmaso AR, Ribeiro EB, Oller Do Nascimento CM. Effect of Palatable Hyperlipidic Diet on Lipid Metabolism of Sedentary and Exercised Rats. *Nutrition*. 2004;20(2):218–24.
83. Boustany CM. Activation of the systemic and adipose renin-angiotensin system in rats with diet-induced obesity and hypertension. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 2004;287(4):R943–9.
84. Guimaraes PS, Huber D a, Campagnole-Santos MJ, Schreihofer AM. Development of attenuated baroreflexes in obese Zucker rats coincides with impaired activation of nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;306(9):R681-92.
85. Akyol A, Langley-Evans SC, McMullen S. Obesity induced by cafeteria feeding and pregnancy outcome in the rat. *Br J Nutr*. 2009;102(11):1601–10.
86. Samuelsson AM, Matthews PA, Argenton M, Christie MR, McConnell JM, Jansen EHJM, et al. Diet-induced obesity in female mice leads to offspring hyperphagia, adiposity, hypertension, and insulin resistance: A novel murine model of developmental programming. *Hypertension*. 2008;51(2):383–92.
87. Nivoit P, Morens C, Van Assche FA, Jansen E, Poston L, Remacle C, et al. Established diet-induced obesity in female rats leads to offspring hyperphagia, adiposity and insulin resistance. *Diabetologia*. 2009;52(6):1133–42.
88. Plagemann A, Harder T, Rake A, Melchior K, Rohde W, Dörner G. Increased

- number of galanin-neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of neonatally overfed weanling rats. *Brain Res.* 1999;818(1):160–3.
89. Schmidt I, Fritz A, Schölch C, Schneider D, Simon E, Plagemann A. The effect of leptin treatment on the development of obesity in overfed suckling Wistar rats. *Int J Obes.* 2001;25(8):1168–74.
 90. Plagemann A. Perinatal programming and functional teratogenesis: Impact on body weight regulation and obesity. In: *Physiology and Behavior*. 2005. p. 661–8.
 91. Cripps RL, Martin-Gronert MS, Ozanne SE. Fetal and perinatal programming of appetite. *Clin Sci* 2005;109(1):1–11.
 92. Mcmillen IC. Developmental Origins of the Metabolic Syndrome: Prediction, Plasticity, and Programming. *Physiol Rev* 2005;85(2):571–633.
 93. Grove KL, Grayson BE, Glavas MM, Xiao XQ, Smith MS. Development of metabolic systems. *Physiol Behav* 2005;86(5):646–60.
 94. Elmquist JK, Flier JS. The Fat-Brain Axis Enters a New Dimension. Vol. 304, *Science*. 2004. p. 63–4.
 95. Ferezou-Viala J, Roy A-F, Serougne C, Gripois D, Parquet M, Bailleux V, et al. Long-term consequences of maternal high-fat feeding on hypothalamic leptin sensitivity and diet-induced obesity in the offspring. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 2007;293(3):R1056–62.
 96. Samuelsson AM, Morris A, Igosheva N, Kirk SL, Pombo JMC, Coen CW, et al. Evidence for sympathetic origins of hypertension in juvenile offspring of obese rats. *Hypertension*. 2010;55(1):76–82.
 97. Paton JFR. A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods*. 1996;65(1):63–8.
 98. Colombari DSA, Colombari E, Freiria-Oliveira AH, Antunes VR, Yao ST, Hindmarch C, et al. Switching control of sympathetic activity from forebrain to hindbrain in chronic dehydration. *J Physiol*. 2011;589(18):4457–71.

99. Zoccal DB, Paton JFR, MacHado BH. Do changes in the coupling between respiratory and sympathetic activities contribute to neurogenic hypertension? Vol. 36, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 2009. p. 1188–96.
100. George V, Tremblay A, Despres JP, Leblanc C, Bouchard C. Effect of dietary fat content on total and regional adiposity in men and women. *Int J Obes*. 1990;14(12):1085–94.
101. Tucker LA, Kano MJ. Dietary fat and body fat: a multivariate study of 205 adult females. *Am J Clin Nutr*. 1992;56(4):616–22.
102. Dorresteijn JAN, Visseren FLJ, Spiering W. Mechanisms linking obesity to hypertension. Vol. 13, *Obesity Reviews*. 2012. p. 17–26.
103. Rodríguez A, Ezquerro S, Méndez-Giménez L, Becerril S, Frühbeck G. Revisiting the adipocyte: a model for integration of cytokine signaling in the regulation of energy metabolism. *Am J Physiol - Endocrinol Metab* 2015;309(8):E691–714.
104. Hanson RL, Imperatore G, Bennett PH, Knowler WC. Components of the “Metabolic Syndrome” and Incidence of Type 2 Diabetes. *Diabetes* 2002;51(10):3120–7.
105. Hunt KJ, Resendez RG, Williams K, Haffner SM, Stern MP. National Cholesterol Education Program versus World Health Organization metabolic syndrome in relation to all-cause and cardiovascular mortality in the San Antonio heart study. *Circulation*. 2004;110(10):1251–7.
106. Kirk SL, Samuelsson AM, Argenton M, Dhonye H, Kalamatianos T, Poston L, et al. Maternal obesity induced by diet in rats permanently influences central processes regulating food intake in offspring. *PLoS One*. 2009;4(6).
107. Allen AM. Inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus in spontaneously hypertensive rats dramatically reduces sympathetic vasomotor tone. *Hypertension*. 2002;39(2 I):275–80.
108. Akine A, Montanaro M, Allen AM. Hypothalamic paraventricular nucleus

- inhibition decreases renal sympathetic nerve activity in hypertensive and normotensive rats. *Auton Neurosci* 2003;108(1–2):17–21.
109. Stocker SD, Hunwick KJ, Toney GM. Hypothalamic paraventricular nucleus differentially supports lumbar and renal sympathetic outflow in water-deprived rats. *J Physiol*. 2005;563(1):249–63.
 110. De Almeida Colombari DS, Portelinha LS, Campos RR, Lopes OU. Haemodynamic effects of hypothalamic disconnection in anaesthetized rats. In: *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*. 2002. p. 51–4.
 111. Lawlor DA, Relton C, Sattar N, Nelson SM. Maternal adiposity - A determinant of perinatal and offspring outcomes? *Nat Rev Endocrinol*. 2012;8(11):679–88.
 112. Yang R, Barouch LA. Leptin signaling and obesity: Cardiovascular consequences. Vol. 101, *Circulation Research*. 2007. p. 545–59.
 113. Bouret SG, Draper SJ, Simerly RB. Trophic Action of Leptin on Hypothalamic Neurons That Regulate Feeding. *Science* (80-). 2004;304(5667):108–10.
 114. Powell FL, Milsom WK, Mitchell GS. Time domains of the hypoxic ventilatory response. Vol. 112, *Respiration Physiology*. 1998. p. 123–34.
 115. Teppema LJ, Dahan A. The Ventilatory Response to Hypoxia in Mammals: Mechanisms, Measurement, and Analysis. *Physiol Rev* 2010;90(2):675–754.
 116. Braga VA, Soriano RN, Braccialli AL, de Paula PM, Bonagamba LGH, Paton JFR, et al. Involvement of L-glutamate and ATP in the neurotransmission of the sympathoexcitatory component of the chemoreflex in the commissural nucleus tractus solitarii of awake rats and in the working heart-brainstem preparation. *J Physiol*. 2007;581(3):1129–45.
 117. Machado BH. Neurotransmission of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Ann N Y Acad Sci* 2001;940:179–96.
 118. Polotsky VY, Li J, Punjabi NM, Rubin AE, Smith PL, Schwartz AR, et al. Intermittent Hypoxia Increases Insulin Resistance in Genetically Obese Mice. *J Physiol* 2003;552(1):253–64.

119. Reinke C, Bevans-Fonti S, Drager LF, Shin M-K, Polotsky VY. Effects of different acute hypoxic regimens on tissue oxygen profiles and metabolic outcomes. *J Appl Physiol* 2011;111(3):881–90.
120. Inyushkina EM, Merkulova NA, Inyushkin AN. Mechanisms of the respiratory activity of Leptin at the level of the solitary tract nucleus. *Neurosci Behav Physiol.* 2010;40(7):707–13.
121. Zhang Z-H, Felder RB. Melanocortin receptors mediate the excitatory effects of blood-borne murine leptin on hypothalamic paraventricular neurons in rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2004;286(2):R303-10.
122. Tankersley C, Kleeberger S, Russ B, Schwartz A, Smith P. Modified control of breathing in genetically obese (ob/ob) mice. *J Appl Physiol* (Bethesda, Md 1985). 1996;81(2):716–23.
123. Lohmeier TE, Irwin ED, Rossing MA, Serdar DJ, Kieval RS. Prolonged Activation of the Baroreflex Produces Sustained Hypotension. In: *Hypertension*. 2004. p. 306–11.
124. Tsutsumi K, Saavedra JM. Quantitative autoradiography reveals different angiotensin II receptor subtypes in selected rat brain nuclei. *J Neurochem.* 1991;56(1):348–51.
125. Allen AM, Chai SY, Sexton PM, Lewis SJ, Verberne AJ, Jarrott B, et al. Angiotensin II receptors and angiotensin converting enzyme in the medulla oblongata. *Hypertension*. 1987;9:III198-I205.
126. Paton JFR, Kasparov S. Differential effects of angiotensin II on cardiorespiratory reflexes mediated by nucleus tractus solitarii - A microinjection study in the rat. *J Physiol.* 1999;521(1):213–25.
127. Michelini LC, Bonagamba LG. Angiotensin II as a modulator of baroreceptor reflexes in the brainstem of conscious rats. *Hypertension* 1990;15(2 Suppl):I45-50.
128. Biancardi VC, Son SJ, Ahmadi S, Filosa JA, Stern JE. Circulating angiotensin II gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via

- breakdown of the blood-brain barrier. *Hypertension*. 2014;63(3):572–9.
129. Ouyang S, Hsueh H, Kastin AJ, Wang Y, Yu C, Pan W. Diet-induced obesity suppresses expression of many proteins at the blood-brain barrier. *J Cereb Blood Flow Metab* 2013;34(April):1–9.
 130. Huber JD, Witt KA, Hom S, Egleton RD, Mark KS, Davis TP. Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(3):H1241–8.
 131. Ronaldson PT, Demarco KM, Sanchez-Covarrubias L, Solinsky CM, Davis TP. Transforming growth factor-beta signaling alters substrate permeability and tight junction protein expression at the blood-brain barrier during inflammatory pain. *J Cereb Blood Flow Metab* 2009;29(6):1084–98.
 132. Kim DW, Glendinning KA, Grattan DR, Jasoni CL. Maternal obesity in the mouse compromises the blood-brain barrier in the arcuate nucleus of offspring. *Endocrinology*. 2016;157(6):2229–42.
 133. Cannon WB. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 1929;9(3):399–431.
 134. Strange K. Cellular volume homeostasis. *AJP Adv Physiol Educ* 2004;28(4):155–9.
 135. Bourque CW, Oliet SHR, Richard D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. Vol. 15, *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1994. p. 231–74.
 136. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite: retrospect and prospect. *Fed Proc*. 1978;37(13):2669–75.
 137. Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LLK, Valença MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 2004;84(1):169–208.
 138. Beauchamp GK, Bertino M, Burke D, Engelman K. Experimental sodium depletion and salt taste in normal human volunteers. *Am J Clin Nutr*. 1990;51(5):881–9.

139. Badoer E, Ng C-W, De Matteo R. Glutamatergic input in the PVN is important in renal nerve response to elevations in osmolality. *Am J Physiol Renal Physiol* 2003;285(4):F640-50.
140. Nishida Y, Sugimoto I, Morita H, Murakami H, Hosomi H, Bishop VS. Suppression of renal sympathetic nerve activity during portal vein infusion of hypertonic saline. *Am J Physiol* 1998;274(1 Pt 2):R97-103.
141. Weiss ML, Claassen DE, Hirai T, Kenney MJ. Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion. *J Auton Nerv Syst.* 1996;57(1-2):109-15.
142. Morita H, Vatner SF. Effects of volume expansion on renal nerve activity, renal blood flow, and sodium and water excretion in conscious dogs. *Am J Physiol.* 1985;249(5 Pt 2):F680-7.
143. Colombari DS, Cravo SL. Effects of acute AV3V lesions on renal and hindlimb vasodilation induced by volume expansion. *Hypertension.* 1999;34(4 Pt 2):762-7.
144. Fujita T, Matsuda Y, Shibamoto T, Uematsu H, Sawano F, Koyama S. Effect of hypertonic saline infusion on renal vascular resistance in anesthetized dogs. *Jpn J Physiol* 1991;41(4):653-63.
145. Pedrino GR, Nakagawa Sera CT, Cravo SL, Colombari DSDA. Anteroventral third ventricle lesions impair cardiovascular responses to intravenous hypertonic saline infusion. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2005;117(1):9-16.
146. Pedrino GR, Maurino I, De Almeida Colombari DS, Cravo SL. Role of catecholaminergic neurones of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular responses induced by acute changes in circulating volume in rats. *Exp Physiol.* 2006;91(6):995-1005.
147. Castrop H, Hocherl K, Kurtz A, Schweda F, Todorov V, Wagner C. Physiology of Kidney Renin. *Physiol Rev* 2010;90(2):607-73.
148. Antunes-Rodrigues J, Ramalho MJ, Reis LC, Menani J V, Turrin MQ, Gutkowska J, et al. Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-

- expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(7):2956–60.
149. Antunes-Rodrigues J, Machado BH, Andrade H a, Mauad H, Ramalho MJ, Reis LC, et al. Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(15):6828–31.
 150. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med*. 1998;339(5):321–8.
 151. Morris M, Alexander N. Baroreceptor influences on oxytocin and vasopressin secretion. *Hypertension*. 1989;13(2):110–4.
 152. Gomes DA, Giusti-Paiva A, Ventura RR, Elias LLK, Cunha FQ, Antunes-Rodrigues J. Carbon monoxide and nitric oxide modulate hyperosmolality-induced oxytocin secretion by the hypothalamus in vitro. *Biosci Rep*. 2010;30(5):351–7.
 153. Bealer SL. Sodium excretion following lesions of preoptic recess periventricular tissue in the rat. *Am J Physiol* 1983;244(6):R815-22.
 154. Bealer SL, Caldwell RW, Songu-Mize E. Mechanisms of altered sodium excretion after preoptic hypothalamic lesions. *Am J Physiol* 1988;254(1 Pt 2):R84-9.
 155. Schoorlemmer GH, Johnson a K, Thunhorst RL. Effect of hyperosmotic solutions on salt excretion and thirst in rats. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 2000;278(4):R917-23.
 156. Cravo SL, Lopes OU, Pedrino GR. Involvement of catecholaminergic medullary pathways in cardiovascular responses to acute changes in circulating volume. Vol. 44, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2011. p. 877–82.
 157. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev* 1997;77(1):75–197.
 158. Pedrino GR, Freiria-Oliveira AH, Almeida Colombari DS, Rosa DA, Cravo SL. A2 noradrenergic lesions prevent renal sympathoinhibition induced by

- hypernatremia in rats. PLoS One. 2012;7(5).
159. Dale HH. On some physiological actions of ergot. J Physiol. 1906;34(3):163–206.
 160. Ott I, Scott JC. The action of infundibulin upon the mammary secretion Vol. 8, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. 1911. p. 48–9.
 161. Stoop R. Neuromodulation by Oxytocin and Vasopressin. Vol. 76, Neuron. 2012. p. 142–59.
 162. Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Scott Young W. Oxytocin: The great facilitator of life. Vol. 88, Progress in Neurobiology. 2009. p. 127–51.
 163. Conrad KP, Gellai M, North WG, Valtin H. Influence of Oxytocin on Renal Hemodynamics and Sodium Excretion. Ann N Y Acad Sci. 1993;689(1):346–62.
 164. Huang W, Sjoquist M, Skott O, Stricker EM, Sved AF. Oxytocin-induced renin secretion in conscious rats. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 2000;278(1):R226-30.
 165. Sjöquist M, Huang W, Jacobsson E, Skøtt O, Stricker EM, Sved AF. Sodium excretion and renin secretion after continuous versus pulsatile infusion of oxytocin in rats. Endocrinology. 1999;140(6):2814–8.
 166. Soares TJ, Coimbra TM, Martins a R, Pereira a G, Carnio EC, Branco LG, et al. Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(January):278–83.
 167. Balment RJ, Brimble MJ, Forsling ML. Release of oxytocin induced by salt loading and its influence on renal excretion in the male rat. J Physiol. 1980;308(1):439–49.
 168. Verbalis JG, Mangione MP, Stricker EM. Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. Endocrinology. 1991;128(3):1317–22.
 169. Welch WJ, Deng X, Snellen H, Wilcox CS. Validation of miniature ultrasonic

- transit-time flow probes for measurement of renal blood flow in rats. *Am J Physiol* 1995;268(1 Pt 2):F175-8.
170. Jacob F, Ariza P, Osborn JW. Renal denervation chronically lowers arterial pressure independent of dietary sodium intake in normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284(6):H2302-10.
 171. Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. Vol. 9, *Nature Reviews Neuroscience*. 2008. p. 519–31.
 172. Moreira MCS, Da Silva EF, Silveira LL, De Paiva YB, De Castro CH, Freiria-Oliveira AH, et al. High sodium intake during postnatal phases induces an increase in arterial blood pressure in adult rats. *Br J Nutr*. 2014;112(12):1923–32.
 173. Rauch AL, Callahan MF, Buckalew VM, Morris M. Regulation of plasma atrial natriuretic peptide by the central nervous system. *Am J Physiol* 1990;258(2 Pt 2):R531-5.
 174. Callahan MF, Ludwig M, Tsai KP, Sim LJ, Morris M. Baroreceptor input regulates osmotic control of central vasopressin secretion. *Neuroendocrinology*. 1997;65(4):238–45.
 175. Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Murphy D, Paulin RF, Antunes-Rodrigues J, Colombari E, et al. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. *AJP Regul Integr Comp Physiol* 2013;304(7):R531–42.
 176. Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, Mccann SM. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Physiology*. 1997;94(October):11704–9.
 177. Toney GM, Chen QH, Cato MJ, Stocker SD. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand* 2003;177(1):43–55.

ANEXOS

Anexo 1 - Artigo Publicado : Plos One (2014)

EFFERENT PATHWAYS IN SODIUM OVERLOAD-INDUCED RENAL VASODILATION IN RATS

Nathalia O. Amaral¹, Thiago S. de Oliveira¹, Lara M. Naves¹, Fernando P. Filgueira¹, Marcos L. Ferreira-Neto², Gerhardus H. M. Schoorlemmer³, Carlos H. de Castro¹, André H. Freiria-Oliveira¹, Carlos H. Xavier¹, Diego B. Colugnati¹, Daniel A. Rosa¹, Graziela T. Blanch¹, Clayton L. Borgues⁴, Célia M. A. Soares⁴, Angela A. S. Reis⁵, Sergio L. Cravo³, Gustavo R. Pedrino¹

Anexo 2 – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Processo: 20/2013

Anexo 3 – Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Universidade Federal de Goiás

Processo: 034/2012



Efferent Pathways in Sodium Overload-Induced Renal Vasodilation in Rats

Nathalia O. Amaral¹, Thiago S. de Oliveira¹, Lara M. Naves¹, Fernando P. Filgueira¹, Marcos L. Ferreira-Neto², Gerard H. M. Schoorlemmer³, Carlos H. de Castro¹, André H. Freiria-Oliveira¹, Carlos H. Xavier¹, Diego B. Colugnati¹, Daniel A. Rosa¹, Graziela T. Blanch¹, Clayton L. Borges⁴, Célia M. A. Soares⁴, Angela A. S. Reis⁵, Sergio L. Cravo³, Gustavo R. Pedrino^{1*}

1 Center for Neuroscience and Cardiovascular Physiology, Department of Physiological Sciences, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil, **2** Faculty of Physical Education, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brazil, **3** Department of Physiology, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil, **4** Laboratory of Molecular Biology, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil, **5** Department of Biochemistry and Molecular Biology, Biological Sciences Institute, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil

Abstract

Hypertremia stimulates the secretion of oxytocin (OT), but the physiological role of OT remains unclear. The present study sought to determine the involvement of OT and renal nerves in the renal responses to an intravenous infusion of hypertonic saline. Male Wistar rats (280–350 g) were anesthetized with sodium thiopental (40 mg. kg⁻¹, i.v.). A bladder cannula was implanted for collection of urine. Animals were also instrumented for measurement of mean arterial pressure (MAP) and renal blood flow (RBF). Renal vascular conductance (RVC) was calculated as the ratio of RBF by MAP. In anesthetized rats (n=6), OT infusion (0.03 µg · kg⁻¹, i.v.) induced renal vasodilation. Consistent with this result, *ex vivo* experiments demonstrated that OT caused renal artery relaxation. Blockade of OT receptors (OXTR) reduced these responses to OT, indicating a direct effect of this peptide on OXTR on this artery. Hypertonic saline (3 M NaCl, 1.8 ml · kg⁻¹ b.wt., i.v.) was infused over 60 s. In sham rats (n=6), hypertonic saline induced renal vasodilation. The OXTR antagonist (AT; atosiban, 40 µg · kg⁻¹ · h⁻¹, i.v.; n=7) and renal denervation (RX) reduced the renal vasodilation induced by hypertremia. The combination of atosiban and renal denervation (RX+AT; n=7) completely abolished the renal vasodilation induced by sodium overload. Intact rats excreted 51% of the injected sodium within 90 min. Natriuresis was slightly blunted by atosiban and renal denervation (42% and 39% of load, respectively), whereas atosiban with renal denervation reduced sodium excretion to 16% of the load. These results suggest that OT and renal nerves are involved in renal vasodilation and natriuresis induced by acute plasma hypertremia.

Citation: Amaral NO, de Oliveira TS, Naves LM, Filgueira FP, Ferreira-Neto ML, et al. (2014) Efferent Pathways in Sodium Overload-Induced Renal Vasodilation in Rats. PLoS ONE 9(10): e109620. doi:10.1371/journal.pone.0109620

Editor: Jean-Claude Dussault, INSERM, France

Received: January 25, 2014; **Accepted:** September 11, 2014; **Published:** October 3, 2014

Copyright: © 2014 Amaral et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Goiás (FAPEG; www.fapeg.go.gov.br) grants 2012/0055431086 (GRP) and 2009/10267000352 (GRP) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; www.cnpq.br) grants 477832/2010-5 (GRP) and 483411/2012-4 (GRP). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* Email: pedrino@pq.cnpq.br

Introduction

Hypertremia constitute a challenge that threatens the survival of the organism. Despite the wide variation in daily intakes and losses of sodium, its concentration in the body fluids must be maintained within narrow limits. Therefore, maintenance of the plasma sodium concentration within a strict range is a central goal of homeostatic mechanisms [1,2]. It is no surprise that multiple mechanisms are involved in the regulation of sodium concentration. This wide variety of mechanism ranges from localized and highly specific renal control of sodium loss to the complex regulation of ingestive behaviors [3–5].

The central nervous system (CNS) detects variations in the volume, tonicity, and composition of the extracellular compartment through peripheral and central receptors. Once detected, changes in plasma sodium concentration trigger centrally driven behavioral and neurovegetative adjustments in order to correct deviations [3,4]. Behavioral responses consist of thirst and sodium

appetite. The neurovegetative adjustments include changes in renal excretion of water and sodium. Indeed, hypertonicity reduces sympathetic renal nerve activity [5–8], induces renal vasodilation [9–12], and increases release of vasopressin (VP), atrial natriuretic peptide (ANP) [13,14] and oxytocin (OT) [15–18]. Together, these adjustments lead to natriuresis [19–22].

Renal vascular tone is a significant factor in the regulation of water and sodium excretion, and it is one of the variables adjusted in response to acute variations in the osmolality of the extracellular fluid [10,11,23]. The mechanisms involved in the genesis and maintenance of the renal vasodilation induced by increases in the plasma sodium concentration are complex and appear to involve neural and humoral mechanisms.

Oxytocin is well known for its role in uterine contraction [24] and milk ejection [25], but has several additional functions, many related with social behavior, maternal care, sexual behavior, learning and memory (for review see [26,27]). In addition, OT seems to be involved in the responses to changes in body fluid

osmolality. OT secretion is increased in response to alterations in the plasma sodium concentration [17,28], and its infusion increases urinary volume [29,30], glomerular filtration [29,31], and urinary excretion of sodium in rats [30,32–35]. These effects are mediated by the interaction of OT with the OXTR receptor, a G protein-coupled receptor that is coupled to phospholipase C through G α q11 [26,36].

Stimulation of the renal nerve reduces sodium excretion through secretion of renin, renal vasoconstriction, and increased tubular reabsorption of sodium [37]. Renal sympathetic activity is reduced by plasma hypertonicity, leading to renal vasodilation and natriuresis [5–8,23]. However, to the best of our knowledge, there are no evidences that have evaluated if the secretion of OT is related with renal vasodilation and natriuresis induced by hypernatremia. Moreover, no other study sought to evaluate the interaction between renal sympathetic activity and secretion of OT on renal and cardiovascular responses induced by sodium overload.

Therefore, in the present study, we tested the hypothesis that OT and renal nerves may be involved in the cardiovascular and renal responses induced by acute hypernatremia. For this purpose, we assessed the effects of OXTR receptor blockade and renal denervation on renal vasodilation and natriuresis induced by intravenous infusion of hypertonic saline. We also assessed the effects of OT on renal vascular tone and resistance.

Results

OXTR gene expression in the renal artery

The qRT-PCR analysis indicated that t OXTR was expressed in the renal artery ($n = 10$ arteries taken from 5 rats; Figure 1). These findings demonstrated that OXTR gene was expressed as β -actin, a constitutive gene. The Ct value was 32.01 ± 2.1 for OXTR and 22.08 ± 1.3 for β -actin. The Melting curve confirms the specific expression of OXTR gene in renal arteries (Figure 1A). As control, the expression of β -actin gene was used (Figure 1B).

Effect of OT on renal vascular resistance and on renal artery rings

In vivo experiments demonstrated that the intravenous infusion of OT (8, 16, or 30 ng $\cdot$ kg $^{-1}$, i.v.) in anesthetized rats ($n = 6$) did not change mean arterial pressure (MAP; Figure 2A). All three doses of OT increased renal blood flow (RBF; Figure 2A) and renal vascular conductance (RVC; Figure 2A and B). Renal vasodilation started immediately after infusion and lasted no longer than 30 s. *Ex vivo* experiments showed that OT produced a concentration-dependent relaxation in renal artery rings ($EC_{50} = 0.91 \pm 0.07$ μ M $\cdot$ l $^{-1}$, Figure 2C; $n = 6$ rings taken from 5 rats) precontracted with 1 μ M $\cdot$ l $^{-1}$ phenylephrine, suggesting a direct effect of OT on the renal artery.

Effect of blockade of OXTR and VP-receptors on renal vasodilation and vasorelaxation induced by OT

In vivo experiments demonstrate that the OXTR-antagonist, Atosiban, reduced OT-induced renal vasodilation (Figure 3A and B, $n = 6$), whereas the V1 antagonist, Manning compound, did not affect renal vasodilation induced by OT (Figure 3C and D, $n = 6$). *Ex vivo* experiments showed that the vasorelaxation induced by 1 μ M OT was significantly reduced in the presence of the OXTR antagonist, Atosiban (1 mM, Figure 4A and C). The vasopressin V1 antagonist, Manning Compound (0.1 μ M) did not reduce OT-induced vasorelaxation (Figure 4B and D), suggesting a direct effect of OT on OXTRs in the renal artery.

Effects of hypertonic saline infusion on plasma sodium and blood hemoglobin concentrations

The body weight and cardiovascular baseline values are shown in Table 1. These variables were similar in sham and rats subjected to OXTR-antagonist pretreatment (Atosiban; AT), renal denervation (RX) and renal denervation and atosiban pretreatment (RX+AT). In sham rats, intravenous infusion of hypertonic saline (HS) caused a sustained (>60 min) increase of plasma Na $^{+}$ concentration (Figure 5A). In AT and RX+AT, plasma Na $^{+}$ concentration remained significant higher than in sham rats (Figure 5A).

In sham rats, HS infusion did not change blood hemoglobin concentration (Figure 5B). Combining HS with AT, RX, or both did not alter changes in blood hemoglobin (Figure 5B).

Effects of OXTR blockade and renal denervation on cardiovascular responses induced by HS infusion

In sham rats ($n = 6$), HS infusion caused a mild increase in MAP (Figure 6A), without changing heart rate (HR; Figure 6B). Ten minutes after the HS infusion, RBF and RVC were increased, and they remained high after 60 min (Figure 6C–D). In AT rats ($n = 7$), changes in MAP and HR were similar to those observed in sham rats (Figures 6A–B), but the increases in RBF and RVC were much reduced (Figures 6C–D). In RX rats ($n = 6$), HS infusion did not change HR, but the pressor response (10 min after HS) was increased, and renal vasodilation was blunted (Figure 6). The combination of atosiban and renal denervation (RX+AT rats, $n = 7$) potentiated the hypertensive response (Figure 6A) and abolished the renal vasodilation induced by HS infusion (Figure 6C–D).

Effects of blockade of OXTR and renal denervation on urinary excretion induced by HS infusion

HS infusion increased urinary flow in sham rats ($n = 6$) at 10 min (Figure 7A). The diuresis caused by HS was reduced by Atosiban ($n = 7$) and by renal denervation ($n = 6$), and was reduced further by the combination of Atosiban and renal denervation ($n = 7$; Figure 7A). Urinary sodium concentration increased after infusion of HS. The increase of urinary sodium concentration after sodium overload was higher in AT and RX (Figure 7B), but it was reduced by the combination of RX+AT (Figure 7B). AT and RX slightly reduced the amount of sodium, and RX+AT reduced it further (Figure 7C). As a consequence, sham rats excreted 51% of the injected sodium within 90 min, AT rats excreted 42%, RX rats excreted 42%, and At+RX rats excreted only 16% of the load (Figure 7D).

Effect of OXTR antagonist on cardiac mRNA for ANP

The effect of the OXTR antagonist, Atosiban, on cardiac expression of the ANP gene was measured by qRT-PCR. Figure 8 demonstrated that pre-treatment with OXTR antagonist reduced cardiac ANP gene expression in rats subjected to HS infusion.

Discussion

Previous studies indicate that intravenous administration of OT increases urinary volume [29,30], glomerular filtration [29,31], and urinary excretion of sodium [17,32,34,35]. However, the participation of this hormone in the regulatory mechanisms activated by an increase of plasma sodium concentration is yet to be fully clarified. The present study provides the following findings: i) the OXTR gene was expressed by the renal arteries; ii) administration of OT promoted renal artery relaxation *in vivo*

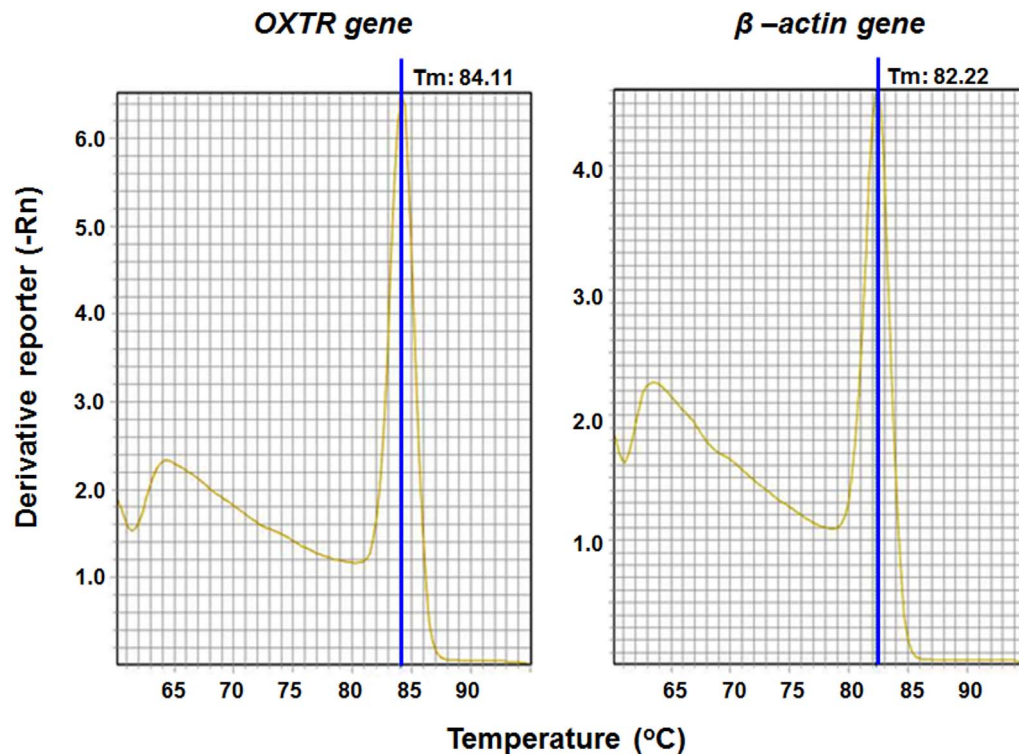


Figure 1. Melting curve showing the specific expression of the OXTR gene in renal arteries of rats after qRT-PCR analyses (A). Expression of the control gene B-actin was used (B).
doi:10.1371/journal.pone.0109620.g001

and *ex vivo*; iii) blockade of OXTR, but not VP-receptors, reduced renal artery relaxation *in vivo* and *ex vivo* induced by OT; iv) blockade of OXTR and renal denervation reduced renal vasodilation and natriuresis induced by acute hypernatremia; v) the combination of OXTR antagonist and renal denervation completely abolished the renal vasodilation and further reduced natriuresis induced by sodium load; and vi) cardiac ANP gene expression induced by HS infusion was decreased in the presence of OT receptors antagonist. Collectively, these results suggest that the renal vasodilation and natriuresis induced by sodium overload is mediated by the combined action of OT and renal nerves.

Changes in the osmolarity of the extracellular compartment affect all tissues and may alter cell volume, metabolism, and function [1]. Acute alterations in osmolarity may induce convulsions, paralysis, coma, and in extreme conditions, death [2,4]. Thus, the precise regulation of the osmolality and therefore intracellular volume is critical for survival. Disturbances in these regulatory mechanisms have been associated with the pathophysiology of cardiovascular diseases, particularly hypertension [38–40], and with diseases related to renal sodium retention, such as cirrhosis and heart failure.

The present study demonstrated that OT induced a concentration-dependent relaxation in renal arteries both *in vivo* and *in vitro*. The complex mechanisms involved in the genesis and maintenance of the renal vasodilation induced by increases plasma sodium concentration are poorly understood and seem to involve hormonal and autonomic mechanisms [8,10,14,41,42]. Our *in vitro* results show that OT can act on oxytocin receptors in the renal vasculature to promote vasodilatation. Experimental evidence has demonstrated that hypernatremia induces OT secretion [15,17,28]. Huang *et al.* (1995) [17] showed that infusion of hypertonic saline stimulates OT secretion and natriuresis. Our

data showed that the blockade of OXTR abolished the vasodilation and reduced the natriuresis induced by a sodium overload. Together, these results indicate that OT is involved in the cardiovascular and renal responses to an increase in plasma sodium concentration. To the best of our knowledge, there is no other evidence that OT mediates renal vasodilation induced by hypernatremia. Although HS increased plasma sodium concentration, it did not significantly reduce blood hemoglobin, suggesting blood volume did not change. This is consistent with previous studies using the same protocol [10,11,13,14,23]. Therefore, it is likely that the cardiovascular and renal adjustments induced by HS infusion were due to increased sodium concentration rather than to volume expansion.

It has been proposed that the natriuresis and renal vasodilatation induced by OT are due to cardiac OXTR receptors that stimulate ANP release [30,35,43,44]. In the present study we demonstrated that an OXTR antagonist reduced cardiac ANP gene expression induced by HS infusion. Our result is consistent with studies conducted by Haanwinckel *et al.* [30], who demonstrated that the intraperitoneal or intravenous administration of OT causes an increase in the plasma concentration of ANP. Moreover, Gutkowska and coworkers [44] demonstrated that OXTR were functional and important for the secretion of ANP, as OXTR blockade reduces the release of ANP induced by OT administration. Once in the circulation, ANP stimulates renal vasodilation and natriuresis [47]. We also demonstrated that OT can act directly on the renal arteries to cause renal relaxation. Overall, these findings suggest that OT can act both directly and indirectly (via ANP) to promote renal vasodilatation.

Neural mechanisms also regulate sodium excretion. Renal nerve stimulation promotes renin secretion, renal vasoconstriction, and tubular sodium reabsorption [37], reducing renal sodium losses.

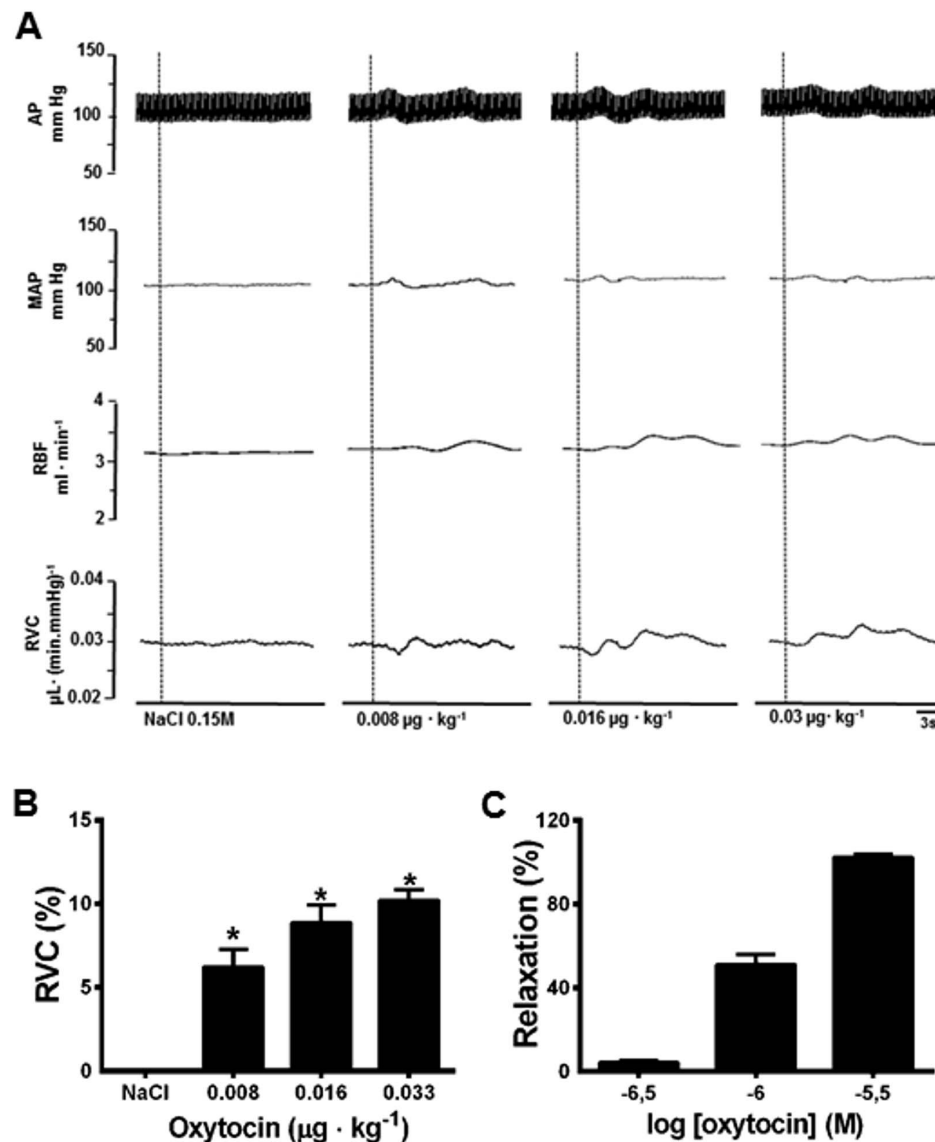


Figure 2. Typical tracing of changes in cardiovascular parameters induced by intravenous injection of vehicle (0.1 ml NaCl 150 mmol $\cdot \text{l}^{-1}$) and oxytocin (0.008, 0.016 e 0.03 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ b.wt., i.v.) in anesthetized rats (A). Effects of oxytocin or vehicle infusion on renal vascular conductance (RVC) in anesthetized rats (B; $n=6$). Concentration–response curve for relaxation of the isolated renal artery by oxytocin (0.3×10^{-6} to 3×10^{-6} M; C - $n=6$ rings taken from 5 rats). Error bars indicate S.E.M. Dashed line indicates oxytocin injection. AP = arterial pressure, MAP = mean arterial pressure, RBF = renal blood flow, RVC = renal vascular conductance. * $p < 0.05$ compared to vehicle.
doi:10.1371/journal.pone.0109620.g002

Plasma hypernatremia inhibits renal sympathetic activity, stimulating sodium excretion [5–7]. A previous study from our laboratory [8] has shown that renal denervation slightly reduces the renal vasodilation induced by sodium overload, suggesting this vasodilation is partly a consequence of renal sympathoinhibition. Furthermore, in the present study we demonstrated that a combination of renal denervation and OXTR blockade abolished renal vasodilation and sharply reduced the natriuresis. Taken together, these results suggest an additive effect of OT secretion and renal nerves on natriuresis and renal vasodilation induced by a sodium overload. In the present study we also observed that pressor responses to a sodium overload are greater in rats subjected to renal denervation and blockade of OXTR. Several other studies that blocked hypernatremia-induced renal vasodilation similarly reported an increase in the magnitude and duration of the hypertensive response [7,10–12]. A decade ago, it was

proposed that hypernatremia initially stimulates secretion of vasoactive peptides (ANP and OT) and reduces renal sympathetic activity. This mechanism leads to reduction in renal vascular resistance and sodium reabsorption, which culminates in sodium excretion. If this initial mechanism fails to correct hypernatremia, a generalized increase in sympathetic activity increases blood pressure, leading to increases in renal perfusion pressure, glomerular filtration rate and consequently natriuresis [3]. In the light of these evidences, the increased pressor response to hypernatremia observed in animals subjected to renal denervation and blockade of OXTR could be due to the ineffectiveness of the initial mechanism, resulting in a generalized increase in sympathetic activity and consequent hypertension. It is noteworthy, however, that the results obtained in the present study also indicate that this pressure mechanism failed to stimulate sodium excretion, since only 16% of of sodium load was excreted during

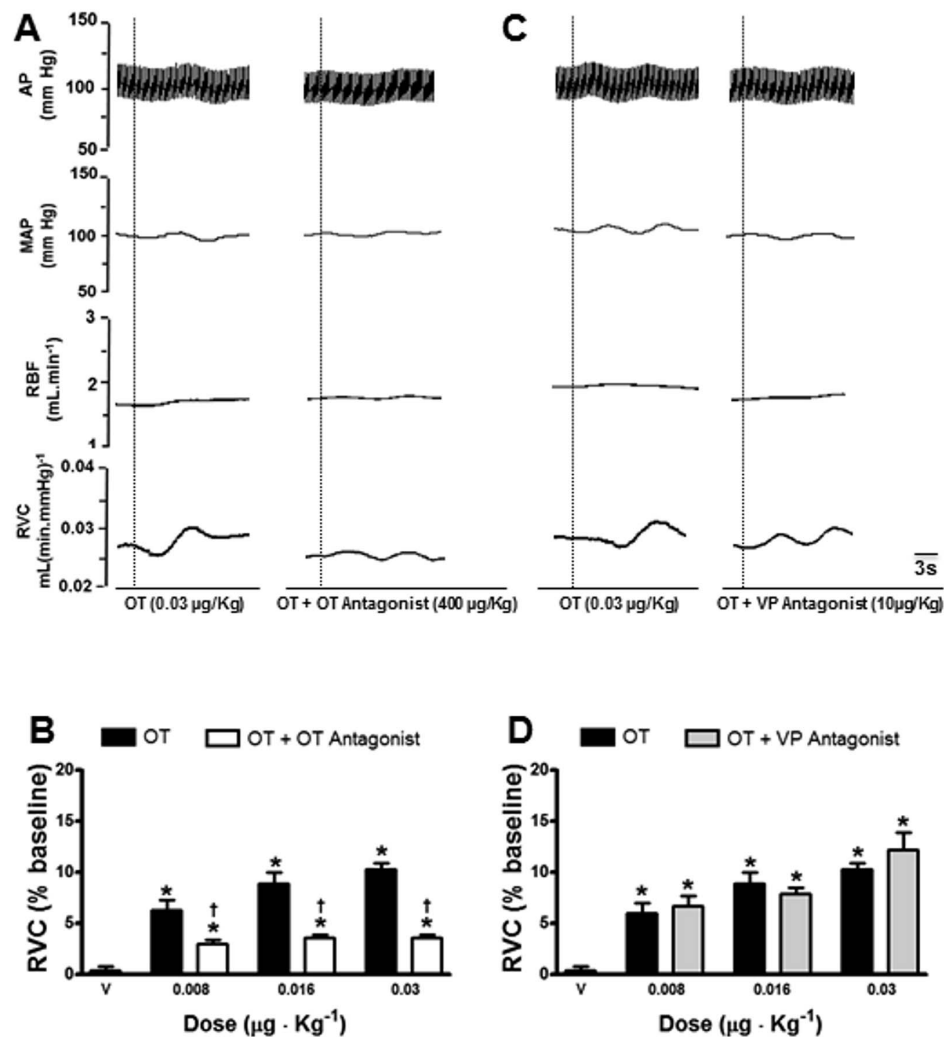


Figure 3. Typical tracing showing changes in cardiovascular parameters induced by intravenous infusion oxytocin (OT - 0.03 µg · kg⁻¹; b.wt., i.v.; in 0.1 ml) before and after administration of OT-antagonist (Atosiban; 40 µg · kg⁻¹ b.wt., i.v.; A) or VP-antagonist (Manning compound; 10 µg · kg⁻¹ b.wt., i.v.; C). Effects of vehicle and OT infusion (0.008, 0.016 and 0.03 µg · kg⁻¹ b.wt., i.v.) before and after administration of OT-antagonist (B) and VP-antagonist (D) on renal vascular conductance (RVC; n = 6). The results are expressed as the mean ± SEM. The dashed line indicates the OT infusion. AP = arterial pressure, MAP = mean arterial pressure, RBF = renal blood flow and RVC = renal vascular conductance. *different from vehicle (NaCl 0.15 M); †different from OT, both p < 0.05.
doi:10.1371/journal.pone.0109620.g003

the next 90 min in rats subjected both renal denervation and blockade of OXTR.

Our results are compatible with the hypothesis that OT secretion and renal nerves play an important role in renal vasodilatation induced by hyperosmolarity. This strongly suggests that both humoral (oxytocinergic) and autonomic (sympathoinhibitory) mechanisms are important. The unbalance in one or both these mechanisms may contribute to several pathological conditions, including some models of experimental hypertension in rodents.

Methods

Animals and ethics statement

All experiments were conducted on adult male Wistar rats (280–350 g). Rats were obtained from the central animal house of the Federal University of Goiás. Experimental procedures were designed in strict adherence to the National Health Institute Guidelines for Care and Use of Laboratory Animals, and

approved by the Research Ethics Committee of the Federal University of Goiás (protocol number 034/12).

Molecular analysis of OXTR gene expression in the renal artery

Total RNA was extracted from ten renal artery using Trizol (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA), chloroform was added (1:5, v/v), and the aqueous phase was obtained after centrifugation (12,000×g, 15 min). RNA was precipitated with isopropanol for 15 min at room temperature, followed by centrifugation at 12,000×g for 10 min. The pellets were resuspended in water treated with 0.1% DEPC, and the RNA content was quantified by spectrophotometry.

For reverse transcription, 2 µg of total RNA was used as a template to synthesize cDNA. RNA was incubated with 1 µl oligo(dt) 15–20 (0.5 pmol, Fermentas - Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), and DEPC-water to a final volume of 12 µl, for 5 min at 65°C. The following reagents were then added to reach a final

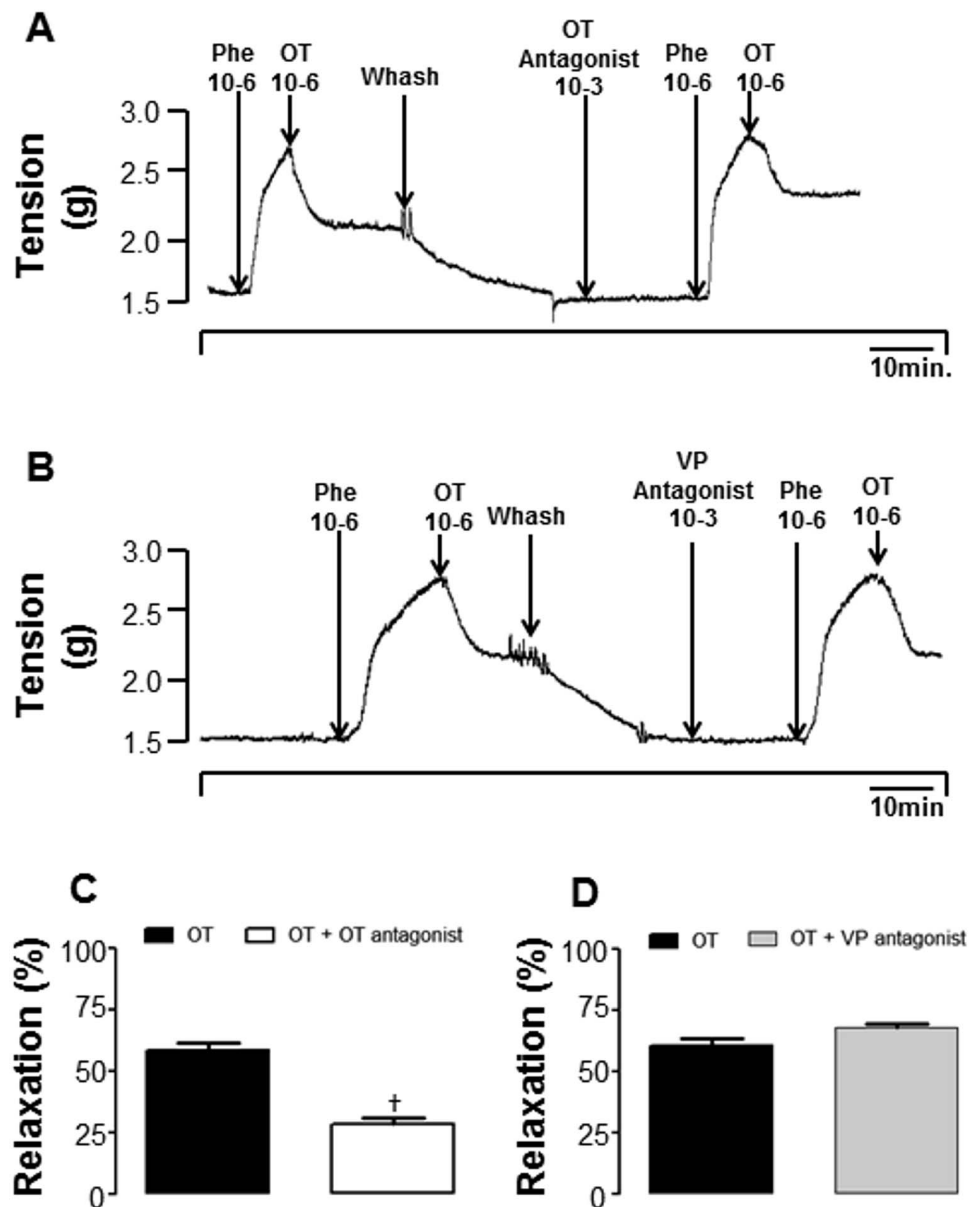


Figure 4. Typical tracing showing the effect of OXTR antagonist (A) and VP receptor antagonist (B) on vasorelaxation induced by OT (1 μ M) in renal artery rings. Effects of pre-treatment with OT-Antagonist (C) and VP-antagonist on renal vasorelaxation induced by OT. †different from OT, $p < 0.05$.

doi:10.1371/journal.pone.0109620.g004

Table 1. Body weight and basal level of cardiovascular and renal variables in sham, rats pretreated with the oxytocin antagonist atosiban (AT), renal denervated rats (RX) and rats pretreated with atosiban and renal denervation (RX+AT).

Group	n	b.wt. g	MAP mm Hg	HR bpm	RBF ml $\cdot$ min $^{-1}$	RVC mm Hg $\cdot$ (ml $\cdot$ min) $^{-1}$
Sham	6	306 $\pm$ 9	115 $\pm$ 2	340 $\pm$ 15	3.6 $\pm$ 0.8	0.029 $\pm$ 0.004
AT	7	307 $\pm$ 6	113 $\pm$ 5	367 $\pm$ 12	4.5 $\pm$ 0.7	0.038 $\pm$ 0.006
RX	6	300 $\pm$ 6	115 $\pm$ 3	359 $\pm$ 10	3.5 $\pm$ 0.7	0.031 $\pm$ 0.007
RX-AT	7	305 $\pm$ 7	110 $\pm$ 7	354 $\pm$ 10	3.0 $\pm$ 0.9	0.021 $\pm$ 0.003

Values are means $\pm$ S.E.M. b.wt. = body weight, MAP = mean arterial pressure, HR = heart rate, RBF = renal blood flow, RVC = renal vascular conductance.

doi:10.1371/journal.pone.0109620.t001

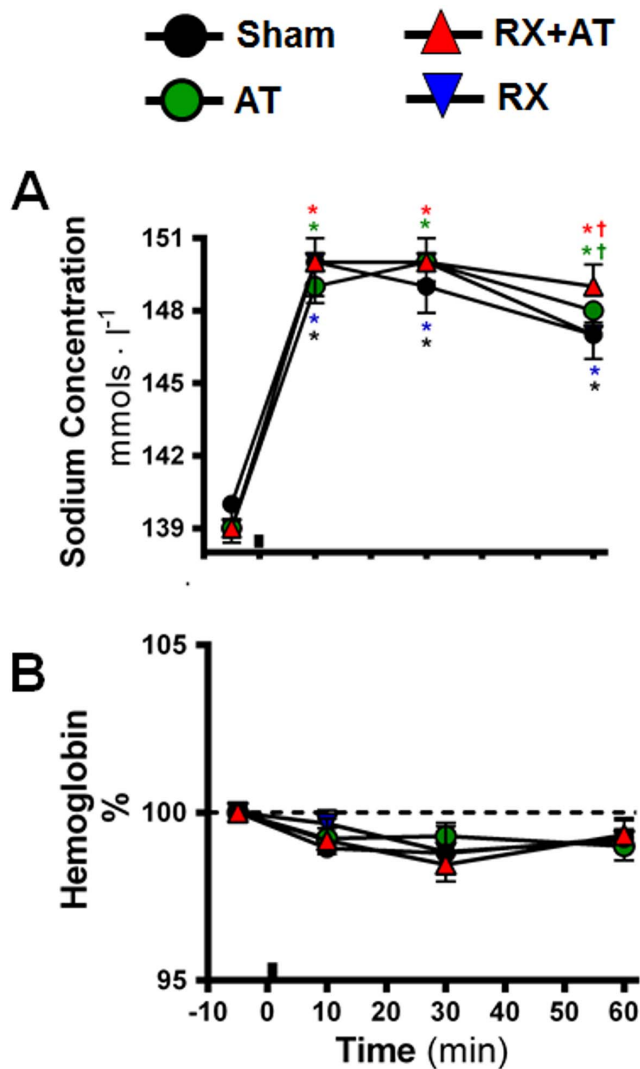


Figure 5. Effects of OXTR antagonist treatment (atosiban; AT), renal denervation (RX) and the combination of AT and RX (RX+AT) on changes in plasma sodium (A) and blood hemoglobin concentration (B) induced by HS infusion (3 M NaCl, 1.8 ml · kg⁻¹ b.wt., i.v.). Black bars indicate the moment of HS infusion. *different from baseline, †different from sham, both p < 0.05. doi:10.1371/journal.pone.0109620.g005

volume of 20 µl: 4 µl RT buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂), 2 µl 10 mM dNTPs mix, 1 µl RiboLock RNase inhibitor (20 U/µl) and 1 µl RevertAid H Minus M-MuLV reverse Transcriptase (200 µl/µl, Fermentas - Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania). The mixture was incubated for 5 min at 25°C followed by 60-min at 45°C and cDNA synthesis was performed at 70°C for 5 min.

qRT-PCR widely used for analysis of gene expression in tissue (Applied Biosystems Step One Plus PCR System, Foster City, CA, USA). We standardized a qRT-PCR method to analyze the expression of the OXTR, using β-actin as a constitutive gene. For OXTR we used as a forward primer: 5-CTG TTT CTG GGC GGT CTT CA-3 and as a reverse primer 5-CCG CCG CTG CCG TCT TGA G-3, resulting in a PCR product of 161 bp. For β-actin, we used as a forward primer 5-AGA GGG AAA TCG TGC GTG AC-3 and as a reverse primer 5-CAA TAG TGA TGA CCT GGC CGT-3, resulting in PCR product of 138 bp.

For qRT-PCR amplification, 2 µl of the cDNA pool resulting from the above reaction was used in a reaction containing PCR buffer Maxima SYBR Green/ROX qRT-PCR Master Mix (2X) (Fermentas – Thermo Scientific, Vilnius, Lithuania), 0.15 µM of each primer and water to produce a final volume of 25 µl. General qRT-PCR conditions were initial denaturation at 95°C for 10 minutes, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, annealing at 60°C for 1 min and extension at 72°C for 20 s. Amplification was completed with an additional step at 72°C for 5 min. A melting curve analysis was performed subsequent to amplification of the target sequence. The program for melting curve analysis was 95°C for 5 s, 65°C for 20 s, with 20°C/s transition rate and then ramping to 98°C at 0.2°C/s.

Effect of OT on renal vascular resistance

Rats were anesthetized with 2–3% halothane in 100% O₂ and catheters were inserted into the right femoral vein and artery. A catheter was inserted in the right jugular vein and advanced to bring the tip close to the right atrium. Halothane was replaced by sodium thiopental (40 mg · kg⁻¹, i.v.; Cristália Ltda, Itapira, SP, Brazil). The trachea was cannulated to reduce airway resistance. Miniature ultrasonic transit-time flow probes (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) were placed around the left renal artery. The body temperature was kept at 37 ± 0.5°C with a thermostatically controlled heated table.

Arterial pressure was measured from the arterial cannula with a disposable pressure transducer. RBF was measured with an ultrasonic transit-time flowmeter (Transonic Systems, Inc., Ithaca, NY, USA). Data were recorded continuously with an MP150 analog-to-digital converter (Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA). MAP and HR were determined from the pulsatile signal with AcqKnowledge software (version 3.7.1.; Biopac Systems, Inc., Goleta, CA, USA). The change of RVC was calculated as the ratio of RBF by MAP, and expressed as a percentage of baseline values.

Increasing doses of OT (0.008, 0.016 and 0.03 µg · kg⁻¹, i.v.) were infused. In additional rats, the vasopressin V1 antagonist, Manning compound (10 µg · kg⁻¹ b.wt.; in 0.1 mL) was injected i.v., followed by increasing doses of OT (0.008, 0.016 and 0.030 µg · kg⁻¹, i.v.). In additional rats, the OXTR antagonist, Atosiban, was infused for 1 h, starting 30 min before increasing doses of OT infusion. The total amount of Atosiban infused was 40 µg · kg⁻¹ in a volume of 3 ml · kg⁻¹.

Effect of OT on renal artery rings

Rats were anesthetized with halotane (2% in O₂ 100%) (Cristália Ltda, Itapira, SP, Brazil) and decapitated. The renal artery was cleaned of adhering fat and connective tissue, removed, and cut in 2 mm long rings. Rings were placed in a warmed (37°C) organ bath containing 10 ml of modified Krebs-Henseleit solution (in mmol · l⁻¹: NaCl = 130, NaHCO₃ = 14.9, KCl = 4.7, KH₂PO₄ = 1.18, MgSO₄ = 1.17, CaCl₂ = 1.6, glucose = 5.5; pH = 7.4, bubbled with 95% O₂ and 5% CO₂). Rings were mounted on stainless steel hooks connected to isometric transducers. Tension was recorded with a data acquisition system (AVS Projetos, São Carlos, SP, Brazil). Rings were kept for 60 min with a tension of 1.5 g. During this period, the Krebs-Henseleit solution was changed every 15 min. Phenylephrine (1 µmol · l⁻¹) was added to contract the rings. After tension stabilized (usually within 15 min), increasing concentrations (0.3 to 3 µmol · l⁻¹) of OT were added. In additional experiments, the vasorelaxation induced by 1 µM OT was measured in the absence or presence of the OXTR antagonist, Atosiban (1 mM), or the V1 antagonist, Manning compound (0.1 µM). At the end of the experiment, the

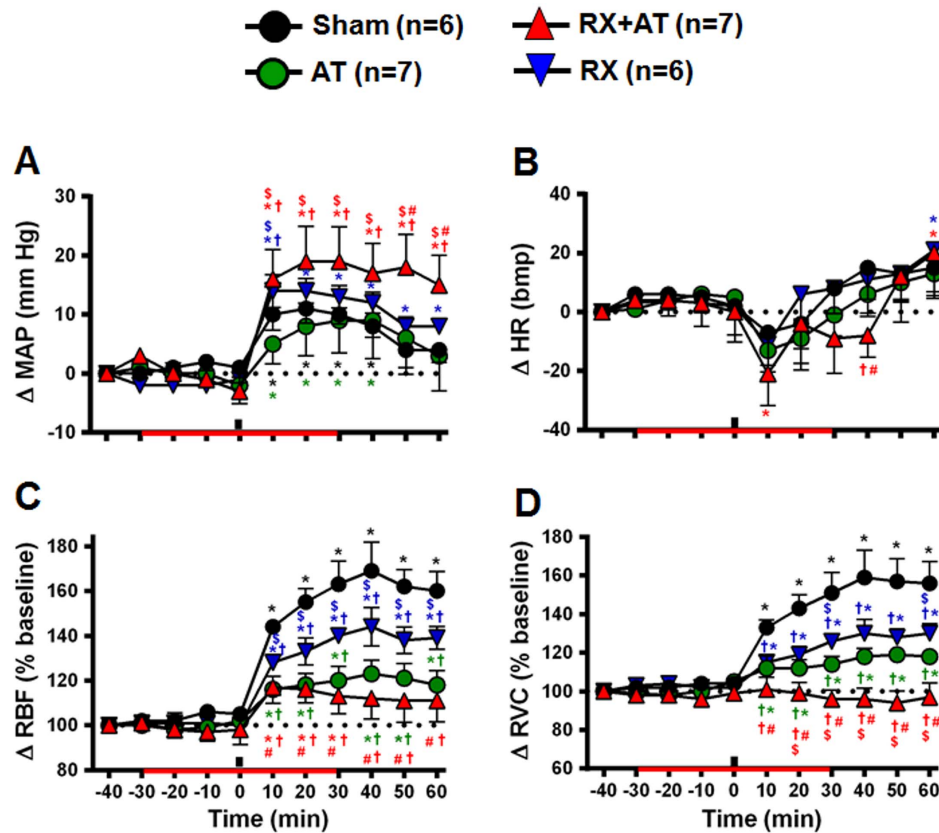


Figure 6. Effects of OXTR antagonist treatment (atosiban; AT), renal denervation (RX) and the combination of AT and RX (RX+AT) on cardiovascular changes induced by intravenous HS infusion (3 M NaCl, 1.8 ml · kg⁻¹ b.wt., i.v.). A) Mean arterial pressure (MAP). B) Heart rate (HR). C) Renal blood flow (RBF). D) Renal vascular conductance (RVC). Black bars indicate the moment of HS infusion. Red bars indicate the period of OXTR-antagonist or saline (150 mmol · l⁻¹ NaCl; Sham and RX groups). *different from baseline, †different from sham, \$different from atosiban, #different from RX, both at p<0.05.
doi:10.1371/journal.pone.0109620.g006

effectiveness of the endothelium was evaluated by observing the response to 10 μmol · l⁻¹ acetylcholine.

Effect of OXTR antagonist and renal denervation on cardiovascular and renal responses induced by hypertonic saline

Additional rats were anesthetized and fitted with cannulas in the femoral vein and artery and a flow probe around the renal artery, as described above. The bladder was catheterized through a suprapubic incision for collection of urine. About 60 min later, hypertonic saline (3 M NaCl, 1.8 ml · kg⁻¹ b.wt., i.v.) was infused over 60 s. In some rats, the selective OXTR antagonist, [Mpa1, D-Try(Et)2, Thr4, Orn8]-OT (atosiban, Ferring, Sweden), was infused for 1 h, starting 30 min before the infusion of hypertonic NaCl. The total amount infused was 40 μg · kg⁻¹ in a volume of 3 ml · kg⁻¹. This dose has been shown previously to block the natriuretic effects of OT but not to interfere with VP-receptors [33,43].

In another group of rats (RX), the left and right kidney innervation was removed surgically as previously described [8,45–50]. Briefly, the renal arteries were dissected under a surgical microscope, and the renal nerves running along them were carefully removed. The connective tissue of the renal artery and vein were stripped and the renal artery was coated with a solution of 10% phenol in absolute alcohol.

In another group of rats, the innervation of the left and right kidney was removed and the animals were submitted to atosiban infusion 60 minutes after the renal denervation (RX+AT). In sham rats, the renal artery was dissected and renal nerves bundles were visualized and kept intact. These rats received the same volume (3 ml · kg⁻¹) of saline (NaCl 150 mmol · l⁻¹).

Blood samples (0.20 ml each) were withdrawn from the arterial cannula 10 min before and 10, 30, 60 and 90 min after i.v. infusion of hypertonic saline. The sample was replaced by an equal volume of sterile 150 mM NaCl. Blood hemoglobin concentration was measured immediately with a kit from Sigma (Drabkin's reagent, kit 525). The rest of the sample was centrifuged for 5 min at 6000 g. The plasma was removed and stored at -20°C. Sodium concentrations in urine and plasma were measured with a flame photometer (model DM6, Digimed, São Paulo, Brazil).

The amount of sodium in the urine was determined by the product of urine volume and sodium concentration. Sodium balance was calculated as the difference between the amount infused and the amount excreted.

Molecular analysis for ANP in heart

Rats were euthanized, the cardiac muscle was cut in small pieces and frozen in liquid nitrogen. The tissues were disrupted by vigorous mixing with glass beads as described before. qRT-PCR analysis was performed in triplicate from a cDNA pool of each treatment. For natriuretic peptide precursor A (ANP), we used as a

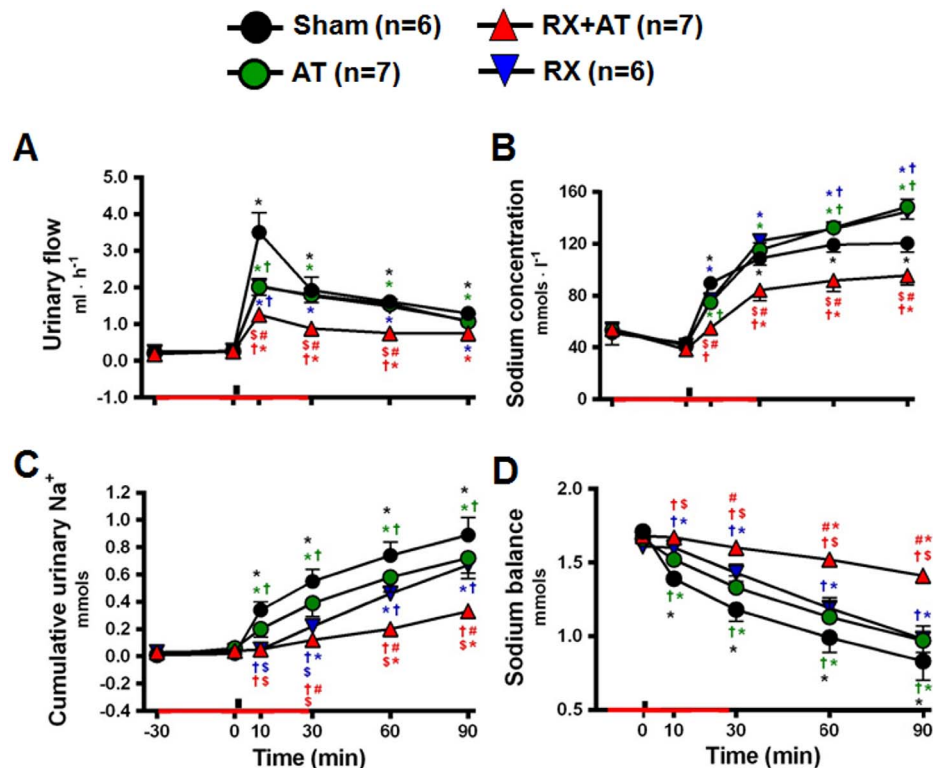


Figure 7. Effects of OXTR antagonist treatment (atosiban; AT), renal denervation (RX) and the combination of AT and RX (RX+AT) on urinary changes induced by intravenous HS infusion (3 M NaCl, 1.8 ml · kg⁻¹ b.wt., i.v.). A) Urine flow. B) Urinary sodium concentration. C) Cumulative urinary sodium. D) Sodium balance. Black bars indicate the moment of HS infusion. Red bars indicate the period of OXTR-antagonist infusion or saline (150 mmol · l⁻¹ NaCl; Sham and RX groups). *different from baseline, †different from sham, § different from atosiban, #different from RX, both at p<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0109620.g007

forward primer 5-GGA TTT CAA GAA CCT GCT AGA-3, and as a reverse primer 5-GCT TCA TCG GTC TGC TCG C-3, resulting in a PCR product of 96 bp. For GAPDH, we used as a forward primer 5-GTC GGT GTG AAC GGA TTT G-3, and as

a reverse primer 5-CCG CCG CTG CCG TCT TGA G-3, with a PCR product of 150 bp. All primers were specific for *Rattus norvegicus*. The data were normalized using the constitutive gene GAPDH as the endogenous control, amplified in each set of qRT-PCR experiments. Data were expressed as mean ± standard deviation of the triplicates of independent experiments. Standard curves were generated by diluting the cDNA solution 1:5. Relative expression levels of genes of interest were calculated using the standard curve method for relative quantification [51].

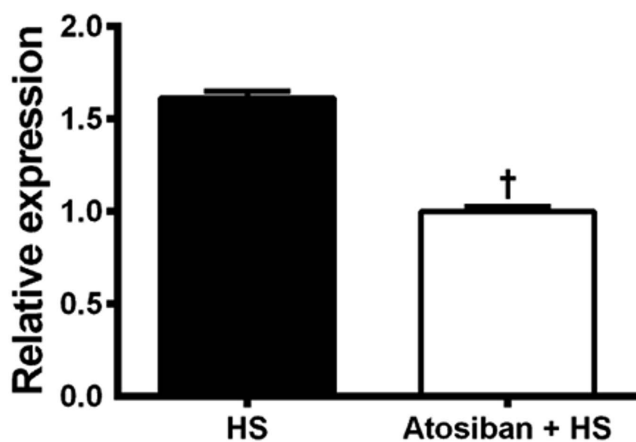


Figure 8. Effect of blockade of OXTR (Atosiban) on atrial natriuretic peptide (ANP) mRNA in the heart of rats submitted to HS infusion 3 M NaCl, 1.8 ml · kg⁻¹ b.wt., i.v. ANP mRNA levels were assessed by the real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction. The results are presented as mean ± standard deviation of the triplicates of independent experiments. †different from Sham, at p<0.05. doi:10.1371/journal.pone.0109620.g008

Data analysis

Results are presented as means ± S.E.M. Cardiovascular baseline values and the effects of OT infusion and OXTR and VP-antagonist were analyzed by one-way ANOVA. When groups differed significantly, the Bonferroni post hoc test was used. The effects of HS infusion on renal and cardiovascular parameters were analyzed by two-way ANOVA. When groups differed significantly, the LSD-Fisher post hoc test was used. Effects of OT infusion and OXTR and VP-antagonist were analyzed by one-way ANOVA. When groups differed significantly, the Bonferroni post hoc test was used. The EC₅₀ for the effect of OT on vascular relaxation was obtained by linear regression of vascular relaxation and the log of the OT concentration using GraphPad Prism statistical software version 6.03 for Windows (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA, USA). Molecular data were compared by the T test. A value of P<0.05 was considered to denote a significant difference.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: GHMS CHC AHF CHX AASR SLC GRP. Performed the experiments: NOA TSO LMN FPF MLF DBC GTB CLB. Analyzed the data: FPF MLF GHMS DAR GTB CLB CMAS

References

- Strange K (1993) Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation. Boca Raton: CRC Press.
- Bourque CW, Oliet SH, Richard D (1994) Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 15: 231–274.
- Toney GM, Chen QH, Cato MJ, Stocker SD (2003) Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand* 177: 43–55.
- Bourque CW (2008) Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 9: 519–531.
- Badoer E, Ng CW, De Matteo R (2003) Glutamatergic input in the PVN is important in renal nerve response to elevations in osmolality. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F640–F650.
- Nishida Y, Sugimoto I, Morita H, Murakami H, Hosomi H, et al. (1998) Suppression of renal sympathetic nerve activity during portal vein infusion of hypertonic saline. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 274: R97–103.
- Weiss ML, Claassen DE, Hirai T, Kenney MJ (1996) Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion. *J Auton Nerv Syst* 57: 109–115.
- Pedrinio GR, Rosa DA, Korim WS, Cravo SL (2008) Renal sympathoinhibition induced by hypernatremia: involvement of A1 noradrenergic neurons. *Auton Neurosci* 142: 55–63.
- Fujita T, Matsuda Y, Shibamoto T, Uematsu H, Sawano F, et al. (1991) Effect of hypertonic saline infusion on renal vascular resistance in anesthetized dogs. *Jpn J Physiol* 41: 653–663.
- Pedrinio GR, Nakagawa Sera CT, Cravo SL, Colombari DS (2005) Anteroventral third ventricle lesions impair cardiovascular responses to intravenous hypertonic saline infusion. *Auton Neurosci* 117: 9–16.
- Pedrinio GR, Monaco LR, Cravo SL (2009) Renal Vasodilation Induced By Hypernatremia: Role Of Alpha-Adrenoceptors In The Median Preoptic Nucleus. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 36: e83–89.
- Pedrinio GR, Maurino I, Almeida Colombari DS, Cravo SL (2006) Role of catecholaminergic neurones of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular responses induced by acute changes in circulating volume in rats. *Exp Physiol* 91: 995–1005.
- Morris M, Alexander N (1988) Baroreceptor influences on plasma atrial natriuretic peptide (ANP): sinoaortic denervation reduces basal levels and the response to an osmotic challenge. *Endocrinology* 122: 373–375.
- Rauch AL, Callahan MF, Buckalew VM, Jr., Morris M (1990) Regulation of plasma atrial natriuretic peptide by the central nervous system. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258: R531–R535.
- Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Murphy D, Paulin RF, Antunes-Rodrigues J, 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. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 304: R531–R542.
- Godino A, Pitra S, Carrer HF, Vivas L (2013) Body sodium overload modulates the firing rate and fos immunoreactivity of serotonergic cells of dorsal raphe nucleus. *PLoS One* 8: e74689.
- Huang W, Lee SL, Sjoquist M (1995) Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. *Am J Physiol* 268: R634–R640.
- Morris M, Alexander N (1989) Baroreceptor influences on oxytocin and vasopressin secretion. *Hypertension* 13: 110–114.
- da Silva EF, Freiria-Oliveira AH, Custodio CH, Ghedini PC, Bataus LA, et al. (2013) A1 noradrenergic neurons lesions reduce natriuresis and hypertensive responses to hypernatremia in rats. *PLoS One* 8: e73187.
- Bealer SL, Caldwell RW, Songu-Mize E (1988) Mechanisms of altered sodium excretion after preoptic hypothalamic lesions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 254: R84–R89.
- Bealer SL (1983) Sodium excretion following lesions of preoptic recess periventricular tissue in the rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 244: R815–R822.
- Schoorlemmer GH, Johnson AK, Thunhorst RL (2000) Effect of hyperosmotic solutions on salt excretion and thirst in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R917–R923.
- Pedrinio GR, Freiria-Oliveira AH, Almeida Colombari DS, Rosa DA, Cravo SL (2012) A2 noradrenergic lesions prevent renal sympathoinhibition induced by hypernatremia in rats. *PLoS One* 7: e37587.
- DALE HH (1906) On some physiological actions of ergot. *J Physiol* 34: 163–206.
- Ott I, Scott JC (1910) The Action of Infundibulum upon Mammary Secretion. *Proc Soc Exp Biol* 8: 48–49.
- Stoop R (2012) Neuromodulation by oxytocin and vasopressin. *Neuron* 76: 142–159.
- Lee HJ, Macbeth AH, Pagani JH, Young WS, III (2009) Oxytocin: the great facilitator of life. *Prog Neurobiol* 88: 127–151.
- Balment RJ, Brimble MJ, Forsling ML (1980) Release of oxytocin induced by salt loading and its influence on renal excretion in the male rat. *J Physiol* 308: 439–449.
- Conrad KP, Gellai M, North WG, Valtin H (1993) Influence of oxytocin on renal hemodynamics and sodium excretion. *Ann N Y Acad Sci* 689: 346–362.
- Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto ALV, Gutkowska J, McCann SM, et al. (1995) Oxytocin Mediates Atrial-Natriuretic-Peptide Release and Natriuresis After Volume Expansion in the Rat. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 7902–7906.
- Conrad KP, Gellai M, North WG, Valtin H (1986) Influence of oxytocin on renal hemodynamics and electrolyte and water excretion. *Am J Physiol* 251: F290–F296.
- Verbalis JG, Mangione MP, Stricker EM (1991) Oxytocin produces natriuresis in rats at physiological plasma concentrations. *Endocrinology* 128: 1317–1322.
- Huang W, Lee SL, Sjoquist M (1994) Effects of neurohypophyseal antagonists in postnephrectomy natriuresis in male rats. *Kidney Int* 45: 692–699.
- Sjoquist M, Huang W, Jacobsson E, Skott O, Stricker EM, et al. (1999) Sodium excretion and renin secretion after continuous versus pulsatile infusion of oxytocin in rats. *Endocrinology* 140: 2814–2818.
- Soares TJ, Coimbra TM, Martins AR, Pereira AG, Carnio EC, et al. (1999) Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 278–283.
- Young WS, III, Gainer H (2003) Transgenesis and the study of expression, cellular targeting and function of oxytocin, vasopressin and their receptors. *Neuroendocrinology* 78: 185–203.
- DiBona GF, Kopp UC (1997) Neural control of renal function. *Physiol Rev* 77: 75–197.
- Horan MJ, Blaustein MP, Dunbar JB, Grundy S, Kachadorian W, et al. (1985) NIH report on research challenges in nutrition and hypertension. *Hypertension* 7: 818–823.
- Law MR, Frost CD, Wald NJ (1991) By how much does dietary salt reduction lower blood pressure? III—Analysis of data from trials of salt reduction. *BMJ* 302: 819–824.
- Simons-Morton DG, Obarzanek E (1997) Diet and blood pressure in children and adolescents. *Pediatr Nephrol* 11: 244–249.
- Callahan MF, Ludwig M, Tsai KP, Sim LJ, Morris M (1997) Baroreceptor input regulates osmotic control of central vasopressin secretion. *Neuroendocrinology* 65: 238–245.
- Cravo SL, Lopes OU, Pedrinio GR (2011) Involvement of catecholaminergic medullary pathways in cardiovascular responses to acute changes in circulating volume. *Braz J Med Biol Res* 44: 877–882.
- Huang W, Sjoquist M, Skott O, Stricker EM, Sved AF (2000) Oxytocin-induced renin secretion in conscious rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 278: R226–R230.
- Gutkowska J, Jankowski M, Lambert C, Mukaddam-Daher S, Zingg HH, et al. (1997) Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11704–11709.
- Boer PA, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA (2005) Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): role of renal nerves. *Life Sci* 76: 1805–1815.
- Guadagnini D, Gontijo JA (2006) Altered renal sodium handling in spontaneously hypertensive rats (SHR) after hypertonic saline intracerebroventricular injection: role of renal nerves. *Life Sci* 79: 1666–1673.
- Jacob F, Ariza P, Osborn JW (2003) Renal denervation chronically lowers arterial pressure independent of dietary sodium intake in normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284: H2302–H2310.
- Jacob F, LaBine BG, Ariza P, Katz SA, Osborn JW (2005) Renal denervation causes chronic hypotension in rats: role of beta1-adrenoceptor activity. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 32: 255–262.
- Khan SA, Sattar MA, Rathore HA, Abdulla MH, Ud Din AF, et al. (2014) Renal denervation restores the baroreflex control of renal sympathetic nerve activity and heart rate in Wistar-Kyoto rats with cisplatin-induced renal failure. *Acta Physiol (Oxf)* 210: 690–700.
- Trostel KA, Osborn JW (1992) Do renal nerves chronically influence renal function and arterial pressure in spinal rats? *Am J Physiol* 263: R1265–R1270.
- Bookout AL, Cummins CL, Mangelsdorf DJ, Pesola JM, Kramer MF (2006) High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. *Curr Protoc Mol Biol* Chapter 15.

Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 20/2013 referente à pesquisa "PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA MELANOCORTINA E SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA NAS ALTERAÇÕES CARDIORRESPIRATÓRIAS EM RATOS SUBMETIDOS À DIETA HIPERLIPÍDICA" sob a responsabilidade da Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pela legislação brasileira atualmente em vigor, tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara-UNESP.

CERTIFICATE

We certify that the protocolo 20/2013 referring to the research "Involvement of the melanocortin system and the renin-angiotensin system on the cardiorespiratory changes in high-fat diet feeding rats" under responsibility Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari in agreement with the nowadays specific brazilian laws and was approved by the Araraquara Dental School-UNESP Ethical Committee for Animal Research (CEUA).

Araraquara, 28 de Junho de 2016.



Prof. Dr. PAULO SÉRGIO CERRI

Coordenador da CEUA/FOAr/UNESP



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



Goiânia, 11 de junho de 2012.

**PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE
PESQUISA/ENSINO PROTOCOLADO NA CEUA SOB O Nº. 034/12**

I. IDENTIFICAÇÃO:

1. *Título do projeto:* Vias e Mecanismos Neuronais Envolvidos nos Ajustes Cardiovasculares, Autonômicos e Endócrinos Induzidos por Alterações do Compartimento Extracelular
2. *Pesquisador Responsável:* Gustavo Rodrigues Pedrino
3. *Unidade/Órgão:* Instituto de Ciências Biológicas/ICB-UFG
4. *Pesquisadores Participantes:* Paulo César Ghedini; Daniel Alves Rosa; Diego Basile Colugnati.
5. *Unidade onde será realizado:* Instituto de Ciências Biológicas/ICB-UFG
6. *Data de apresentação do protocolo à CEUA:* 28/03/12
7. *Data do Relato:* 14/05/12
8. *Data de Atendimento das Pendências:* 06/06/12

II - Parecer da CEUA:

Informamos que a Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA da Universidade Federal de Goiás, após análise das adequações solicitadas, **Aprovou**, o projeto acima referido, e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

O pesquisador responsável deverá encaminhar à CEUA/UFG, relatórios da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões) de acordo com as recomendações da Resolução n. 01, da Lei 11.794/08.

III - Informação aos pesquisadores:

Reiteramos a importância deste Parecer Consubstanciado, e lembramos que o(a) pesquisador(a) responsável deverá encaminhar à CEUA-PRPPG-UFG o Relatório Final baseado na conclusão do estudo e na incidência de publicações decorrentes deste, de acordo com o disposto na Lei nº. 11.794 de 08/10/2008, e Resolução Normativa nº. 01, de 09/07/2010 do Conselho Nacional de Controle de



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



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

IV - Data da reunião: 11/06/12

5-12-12
Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFG

Prof.ª Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFG

Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia
(Campus II) - CEP: 74001-970, Goiânia - Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.
Email: ceua.ufg@gmail.com