



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

**CONTRIBUIÇÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS
NORADRENÉRGICOS A1, A2 E DO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO
MEDIANO (MnPO) NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E
AUTONÔMICAS INDUZIDAS PELA SOBRECARGA DE SÓDIO EM
RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA HIPOVOLÊMICA**

LARA MARQUES NAVES

**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: Lara Marques Naves

Título do trabalho: CONTRIBUIÇÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS NORADRENÉRGICOS A1, A2 E DO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIANO (MnPO) NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E AUTÔNOMICAS INDUZIDAS PELA SOBRECARGA DE SÓDIO EM RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA HIPOVO-LÊMICA

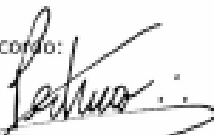
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

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


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 03 / 03 / 19

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. O embargo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

² A assinatura deve ser escaneada.

LARA MARQUES NAVES

**CONTRIBUIÇÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS
NORADRENÉRGICOS A1, A2 E DO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO
MEDIANO (MnPO) NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E
AUTONÔMICAS INDUZIDAS PELA SOBRECARGA DE SÓDIO EM
RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA HIPOVOLÊMICA**

Dissertação 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 Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino

GOIÂNIA-GO

2018

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

Naves, Lara Marques
CONTRIBUIÇÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS
NORADRENÉRGICOS A1, A2 E DO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO MEDIANO
(MnPO) NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS
INDUZIDAS PELA SOBRECARGA DE SÓDIO EM RATOS
SUBMETIDOS À HEMORRAGIA HIPOVOLÊMICA [manuscrito] / Lara
Marques Naves. - 2018.
83 f.: il.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino.
Trabalho de Conclusão de Curso Stricto Sensu (Stricto Sensu) -
Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas
(ICB), Programa de Pós-Graduação em Biologia, Goiânia, 2018.
Bibliografia.

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

1. Hipovolemia. 2. Hiperosmolaridade. 3. Núcleo do Trato
Solitário. 4. Região Caudodorsolateral do Bulbo. 5. Atividade
Nervosa Simpática Renal. I. Pedrino, 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 DISSERTAÇÃO DE Nº 471

Aos dois dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito, às nove 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, Profa. Dra. Aline Priscila Pansani e Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira para, em sessão pública presidida pelo primeiro examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada "CONTRIBUIÇÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS NORADRENÉRGICOS A1, A2 E DO NÚCLEO PRÉ-OPTICO MEDIANO (MnPO) NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E AUTONÔMICAS INDUZIDAS PELA SOBRECARGA DE SÓDIO EM RATOS SUBMETIDOS A HEMORRAGIA HIPOVOLÊMICA", em nível de mestrado, área de concentração em Farmacologia e Fisiologia, de autoria de **Lara Marques Naves**, 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 dissertação que em cerca de 21 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 dissertação. 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 dissertação foi APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na Secretaria do programa, com as devidas correções



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

27 sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da
28 defesa. Cumpridas as formalidades de pauta, às 10:57 horas e
29 57 minutos, encerrou-se a sessão de defesa de dissertação e, para
30 constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da
31 Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da
32 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e aprovada,
33 será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias de igual
34 teor.

35
36
37
38 
39 **Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino**
40 **Presidente da Banca**
41 **Universidade Federal de Goiás**

42
43
44 
45 **Prof. Dra. Aline Priscila Pansani**
46 **Universidade Federal de Goiás**

47
48
49 
50 **Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira**
Universidade Federal de Goiás

LARA MARQUES NAVES

**CONTRIBUIÇÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS
NORADRENÉRGICOS A1, A2 E DO NÚCLEO PRÉ-ÓPTICO
MEDIANO (MnPO) NAS RESPOSTAS CARDIOVASCULARES E
AUTONÔMICAS INDUZIDAS PELA SOBRECARGA DE SÓDIO EM
RATOS SUBMETIDOS À HEMORRAGIA HIPOVOLÊMICA**

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Aline Panssani
Universidade Federal de Goiás

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

Profa. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino
Universidade Federal de Goiás

Aprovada em: 02/03/2018

Dedicatória

*Aos meus pais, **Maria Lúcia Naves Marques e Alício Marques da Silva**, por todo amor e carinho que me dedicam a cada dia. Seus ensinamentos me proporcionaram chegar até aqui e me impulsionam seguir em busca dos meus sonhos.*

Agradecimentos

Ao senhor meu Deus pelo dom da vida, graça e misericórdia. Por ter permitido que cada etapa deste trabalho fosse realizada com sabedoria, serenidade e perseverança. Minha sincera gratidão pela coragem, força e fé que me alimentam diariamente. Todo meu louvor e gratidão serão para ti!

Aos meus pais, Maria Lucia e Alício, por serem toda minha base. Obrigada por acreditarem e lutarem por cada sonho meu. Obrigada pelo exemplo impecável de amor, respeito, luta, trabalho e fé que me inspira a cada dia. Amo eternamente vocês!

Aos meus irmãos (Daniel, David – in memoria, Danilo e Jivago) pela compressão e apoio diário. Ji, obrigada pelo apoio tecnológico a uma irmã desesperada. Amo vocês!

A minha família, em especial aos meus avós (Maria e Joaquim –in memoria, Helena e Alívo). Vô Quinca, o senhor me ensinou muito além de pedaladas em uma bicicleta. Meu respeito e amor eterno a vocês!

A Universidade Federal de Goiás, por ter me recebido calorosamente e ter se tornado parte da minha história. Ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas pela dedicação na formação de seus alunos. Ao apoio financeiro do CNPq, CAPES e FAPEG que permitiram a construção deste projeto.

Ao Professor Gustavo pela oportunidade e confiança de fazer parte da sua equipe e desenvolver este trabalho. Minha imensurável gratidão pelos seus esforços e busca constante para fornecer a melhor formação e orientação possível. Você será sempre meu exemplo e inspiração de dedicação, perseverança e amor ao trabalho. Obrigada por todo apoio!

A minha amiga/irmã de coração, Stefanne, por toda dedicação, cuidado e amor. Sem você este trabalho não seria realizado com tanto carinho. Obrigada por dividir momentos de alegrias, choro, raiva e tantas emoções que vivemos diariamente. Prometi ser Jônatas na sua vida e cumprirei até o fim!

Aos amigos e colegas do CPNFC pelos momentos diversos que vivemos. Em especial a minha mãe de laboratório, Nathalia, por todo ensinamento. Ao Paulo, pelo apoio em todos os momentos. A Kássia, pelas infinitas disciplinas que enfrentamos com “puras” noites de estudo e boas risadas. A minha filha de laboratório, Amandinha, pelo auxílio e pelos memes que renderam boas gargalhadas. A Aline, Aryanne, João Batista, Laíla, Marina, Melissa, Thaís, Karla, Keilah, James e tantos outros amigos que tornaram a rotina de laboratório mais leve e divertida.

A todos que torceram e acompanharam essa importante etapa na minha vida, meu muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	10
LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE TABELAS	17
RESUMO.....	18
ABSTRACT	20
1. INTRODUÇÃO.....	22
2. OBJETIVOS	27
2.1 OBJETIVO GERAL.....	27
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	27
3. METODOLOGIA.....	28
3.1 MODELO ANIMAL UTILIZADO	28
3.2 PROTOCOLOS	28
3.3 NANOINJEÇÕES NA REGIÃO CVLM E NTS	28
3.4 INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO NÚCLEO MnPO	30
3.5 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS GERAIS.....	31
3.6 HEMORRAGIA HIPOTENSIVA	32
3.7 SOBRECARGA DE SÓDIO	32
3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	32
3.9 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA	33
3.10 REGISTRO DA ATIVIDADE NERVOSA SIMPÁTICA RENAL (ANSR)	33
3.11 RETIRADA E PROCESSAMENTO DO TECIDO CEREBRAL	34
3.12 COLORAÇÃO POR VERMELHO NEUTRO	35
3.13 IMUNOISTOQUÍMICA	35
3.14 CONTAGEM NEURONAL	36
3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA	36
4. RESULTADOS	38
4.1. ANÁLISE DA LESÃO DO GRUPAMENTO NEURONAL A2 PELAS NANOINJEÇÕES DE SAPORINA-ANTI-D β H NO NTS.....	38
4.2. ANÁLISE DOS EFEITOS DA LESÃO DO GRUPAMENTO NEURONAL A2 SOBRE A INFUSÃO DE SALINA HIPERTÔNICA APÓS A HEMORRAGIA HIPOTENSIVA	41

4.3.	ANÁLISE DA LESÃO DO GRUPAMENTO NEURONAL A1 PELAS NANOINJEÇÕES DE SAPORINA-ANTI-D β H NA REGIÃO CVLM	45
4.4.	ANÁLISE DOS EFEITOS DA LESÃO DO GRUPAMENTO NEURONAL A1 SOBRE A INFUSÃO DE SALINA HIPERTÔNICA APÓS A HEMORRAGIA HIPOTENSIVA	48
4.5.	ANÁLISE DA LESÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS A1 E A2 PELAS NANOINJEÇÕES DE SAPORINA-ANTI-D β H NA REGIÃO CVLM E NO NTS.....	52
4.6.	ANÁLISE DOS EFEITOS DA LESÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS A1 E A2 SOBRE A INFUSÃO DE SALINA HIPERTÔNICA APÓS A HEMORRAGIA HIPOTENSIVA.....	55
4.7.	ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS NANOINJEÇÕES NO NÚCLEO MnPO....	59
4.8.	ANÁLISE DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO NÚCLEO MnPO SOBRE A INFUSÃO DE SALINA HIPERTÔNICA APÓS A HEMORRAGIA HIPOTENSIVA.....	60
5.	DISCUSSÃO	65
6.	CONCLUSÕES.....	74
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A1 - Grupamento neuronal A1

A2 - Grupamento neuronal A2

ANSR - Atividade Nervosa Simpática Renal

ANSR_c - Atividade Nervosa Simpática Renal Corrigida

AV3V - Região anteroventral do III ventrículo

C1 - Grupamento neuronal C1

C2 - Grupamento neuronal C2

CVLM - Caudodorsolateral do Bulbo

CVR - Condutância Vascular Renal

FC - Frequência Cardíaca

g - Gramas

HH - Hemorragia Hipotensiva

IB - Immunobuffer

IML - Coluna Intermediolateral

IP - Intraperitoneal

i.v - Intravenosa

Kg - Quilograma

M - Molar

MnPO - Núcleo Pré-óptico Mediano

min - Minutos

mL - Mililitros

mm - Milímetros

mmHg - Milímetros de Mercúrio

ng - Nanogramas

nL - Nanolitros

NTS - Núcleo do Tracto Solitário

OVL - Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal

PAM - Pressão Arterial Média

PAP - Pressão Arterial Pulsátil

PBS - Salina Tamponada com Fosfato

PFA - Paraformaldeído

PVN - Núcleo Paraventricular do Hipotálamo

RVLM - Rostroventrolateral do Bulbo

SAPORINA-ANTI-D β H - Saporina-anti-dopamina- β -hidroxilase

SFO - Órgão Subfornicial

SH - Salina Hipertônica

SNC - Sistema Nervoso Central

TH - Tirosina Hidroxilase

u.a - Unidades Arbitrarias

VLM - Ventrolateral Bulbo

EPM - Erro Padrão da Média

μ m - Micrômetros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo do delineamento experimental dos grupos controle A2, experimental A2, controle A1, experimental A1, controle A1 + A2 e experimental A1 + A2 (A) e controle MnPO e experimental MnPO (B).....31
- Figura 2.** Fotomicrografia representativa dos cortes coronais do bulbo (40 μ m) marcados pela técnica de imunoistoquímica. As setas indicam a marcação dos neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamento neuronal A2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A2) no NTS. Escala = 100 μ m.....38
- Figura 3.** Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) do número de neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamentos neuronais A2 e C2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A2) no NTS. † diferente do controle; $p < 0,05$39
- Figura 4.** Traçado representativo das alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade nervosa simpática renal (IANSR) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A2) no NTS. Estão representados no traçado o período basal, 10 e 20 minutos de HH, 30 e 60 minutos após a infusão de SH e o período após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio.....41
- Figura 5.** Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) das alterações da pressão arterial média (PAM – A), frequência cardíaca (FC – B) e variação da

atividade nervosa simpática renal (Δ ANSR – C) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A2) no NTS. *Diferente do tempo 0; † diferente do controle; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de HH e a linha tracejada representa a infusão de SH.....43

Figura 6. Fotomicrografia representativa dos cortes coronais do bulbo (40 μ m) marcados pela técnica de imunoistoquímica. As setas indicam a marcação dos neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamento neuronal A2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1) na região CVLM. Escala = 100 μ m.....45

Figura 7. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) do número de neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamentos neuronais A2 e C2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1) na região CVLM. † diferente do controle; $p < 0,05$46

Figura 8. Traçado representativo das alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade nervosa simpática renal ($\int$ ANSR) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1) na região CVLM. Estão representados no traçado o período basal, 10 e 20 minutos de HH, 30 e 60 minutos após a infusão de SH e o período após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio.....48

Figura 9. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) das alterações da pressão arterial média (PAM – A), frequência cardíaca (FC – B) e variação da

atividade nervosa simpática renal (Δ ANSR – C) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1) na região CVLM. *Diferente do tempo 0; † diferente do controle; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de HH e a linha tracejada representa a infusão de SH.....50

Figura 10. Fotomicrografia representativa dos cortes coronais do bulbo (40 μ m) marcados pela técnica de imunoistoquímica. As setas indicam a marcação dos neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamento neuronal A2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1+ A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1 + A2) na região CVLM e no NTS. Escala = 100 μ m.....52

Figura 11. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) do número de neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamentos neuronais A2 e C2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1 + A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1 + A2) na região CVLM e no NTS. † diferente do controle; $p < 0,05$53

Figura 12. Traçado representativo das alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade nervosa simpática renal ($\int$ ANSR) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1 + A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1 + A2) na região CVLM e no NTS. Estão representados no traçado o período basal, 10 e 20 minutos de HH, 30 e 60 minutos após a infusão de SH e o período após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio.....55

Figura 13. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) das alterações da pressão arterial média (PAM – A), frequência cardíaca (FC – B) e variação da atividade nervosa simpática renal (Δ ANSR – C) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1 + A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1 + A2) na região CVLM e no NTS. *Diferente do tempo 0; † diferente do controle; p <0.05. A barra preta representa o período de HH e a linha tracejada representa a infusão de SH.....57

Figura 14. Fotomicrografia de uma seção coronal do hipotálamo (40 μ m) mostrando um sítio típico de nanoinjeção no núcleo pré-óptico mediano (MnPO). A seta indica a marcação do núcleo MnPO com corante azul de evans 4%. CA: comissura anterior. Escala = 100 μ m.....58

Figura 15. Traçado representativo das alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade nervosa simpática renal ($\int$ ANSR) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de soro fisiológico (Grupo controle MnPO) ou muscimol (Grupo experimental MnPO) no núcleo MnPO. Estão representados no traçado o período basal, 10 e 20 minutos de HH, 30 e 60 minutos após a infusão de SH e o período após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio60

Figura 16. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) das alterações da pressão arterial média (PAM – A), frequência cardíaca (FC – B) e variação da atividade nervosa simpática renal (Δ ANSR – C) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de soro fisiológico (Grupo controle MnPO) ou muscimol (Grupo experimental MnPO) no núcleo MnPO. *Diferente do tempo 0; † diferente do controle; p <0.05. A barra preta representa o período de HH, a linha tracejada representa a infusão de SH e a seta indica a nanoinjeção no núcleo MnPO.....63

Figura 17. Vias centrais envolvidas na ressuscitação cardiovascular e autonômica promovida pela infusão de salina hipertônica (SH) em ratos submetidos à hemorragia hipotensiva (HH). Região caudoventrolateral do bulbo (CVLM), núcleo do tracto solitário (NTS), núcleo paraventricular do hipotálamo magnocelular (mPVN), núcleo paraventricular do hipotálamo parvocelular (pPVN), núcleo pré-óptico mediano (MnPO), órgão subfornicial (SFO), órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), ocitocina (OT) e vasopressina (VP).....73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Coordenadas utilizadas para nanoinjeções na região CVLM e no NTS.....	28
Tabela 2. Coordenadas utilizadas para nanoinjeções no núcleo MnPO.....	30
Tabela 3. Fórmulas usadas para cálculo da ANSR corrigida (ANSRc) e variação da ANSR (%ANSR).....	33
Tabela 4. Valores basais dos parâmetros analisados nos animais do grupo Controle A2 e Experimental A2.....	40
Tabela 5. Valores basais dos parâmetros analisados nos animais do grupo Controle A1 e Experimental A1.....	47
Tabela 6. Valores basais dos parâmetros analisados nos animais do grupo Controle A1 + A2 e Experimental A1 + A2.....	54
Tabela 7. Valores basais dos parâmetros analisados nos animais do grupo Controle MnPO e Experimental MnPO.....	59

RESUMO

Os benefícios hemodinâmicos e cardiovasculares provenientes do uso de solução salina hipertônica (SH) no tratamento da hemorragia hipotensiva (HH) são relatados há vários anos. Recentes investigações mostraram a participação de regiões do sistema nervoso central (SNC), como os grupamentos neuronais A1 (localizado na região caudoventrolateral do bulbo; CVLM), A2 (localizado no núcleo do tracto solitário; NTS) e do núcleo Pré-óptico mediano (MnPO) nas respostas hemodinâmicas induzidas pela sobrecarga de cloreto de sódio em animais normovolêmicos. Entretanto, o papel das estruturas acima relacionadas na recuperação cardiovascular e nas alterações autonômicas induzidas pela administração de solução SH em animais submetidos à HH ainda não foi avaliado. Assim, o presente estudo buscou avaliar o envolvimento dos grupamentos neuronais A1, A2 e do núcleo MnPO nas respostas cardiovasculares e autonômicas promovidas pela infusão de solução SH em animais hipovolêmicos. Para isto, ratos Wistar (280-320 g) foram separados em quatro protocolos: I. Lesão do grupamento neuronal A2 (Controle A2: n=6; Experimental A2: n=6); II. Lesão do grupamento neuronal A1 (Controle A1: n=6; Experimental A1: n=6); III. Lesões concomitantes dos grupamentos neuronais A1 e A2 (Controle A1 + A2: n=6; Experimental A1 + A2: n=6) e IV. Inibição farmacológica do núcleo MnPO (Controle MnPO: n=6; Experimental MnPO: n=6). Os animais dos três primeiros protocolos foram anestesiados e submetidos a nanoinjeções de saporina-anti-D β H para lesão neuronal (100 nL, 0,105 ng/nL) nos grupos experimentais e Saporina (100 nL, 0,022 ng/nL) nos grupos controles para lesão neuronal fictícia, respectivamente, no NTS, na região CVLM ou conjuntamente no NTS e CVLM. Após 20 dias de recuperação, os animais foram novamente anestesiados e instrumentalizados para registro da pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e atividade nervosa simpática renal (ANSR). Em seguida, a HH foi realizada através da retirada de sangue até que a PAM atingisse aproximadamente 60 mmHg. Após 20 min de HH foi conduzida a sobrecarga de sódio (NaCl 3M, 1,8 mL/kg, 90 segundos de infusão, i.v). Em outra série de experimentos, os animais dos grupos controle MnPO e Experimental MnPO foram anestesiados e instrumentalizados para registro da PAM, FC, ANSR. Em seguida, foram submetidos à HH e a infusão de solução

SH ao final da hemorragia. Nanoinjeções do agonista GABAérgico, muscimol (4 mM, 100 nL, grupo experimental MnPO) ou salina (0,15 M; 100 nL; grupo controle MnPO) foram realizadas no MnPO após 10 min do início da HH. A HH promoveu hipotensão, bradicardia e simpatoinibição no território renal nos animais dos grupos controle A2, controle A1, controle A1 + A2 e controle MnPO. Nos grupos controle, a infusão de solução SH após a HH reestabeleceu a PAM, FC e não alterou a simpatoinibição renal gerada durante a hipovolemia. Nos animais dos grupos experimental A2 e experimental A1, a lesão específica dos neurônios A1 ou A2 não alterou a hipotensão, bradicardia e simpatoinibição provocados durante a HH. Em adição, a lesão específica dos neurônios A1 ou A2 não alterou o reestabelecimento da PAM, FC e a queda da ANSR gerada após a infusão de solução SH. Entretanto, nos animais do grupo experimental A1 + A2, a lesão simultânea dos neurônios A1 e A2 não alterou a queda da PAM, da FC observada durante a HH, mas aboliu a simpatoinibição renal. Ademais, a lesão simultânea dos neurônios A1 e A2 aboliu a restauração da PAM e a redução da ANSR após a infusão de solução SH, enquanto a restauração da FC não foi modificada. Nos animais do grupo experimental MnPO, a inibição do MnPO não alterou a queda da PAM e da FC observadas durante a HH, entretanto aboliu a simpatoinibição renal. Porém, a inibição do núcleo MnPO aboliu a restauração da PAM e promoveu forte simpatoexcitação no leito renal após a infusão de solução SH, enquanto a restauração da FC não foi modificada. Esses resultados sugerem que os neurônios dos grupamentos A1, A2 e o núcleo MnPO fazem parte dos circuitos de integração e transmissão de informações a respeito de mudanças na osmolaridade plasmática, participando da recuperação cardiovascular e autonômica induzida pela sobrecarga de cloreto de sódio em animais submetidos à HH.

Palavras-Chave: Hipovolemia, Hiperosmolaridade, Núcleo do Trato Solitário, Região Caudodolateral do Bulbo, Atividade Nervosa Simpática Renal, Pressão Arterial.

ABSTRACT

Hemodynamic and cardiovascular benefits from the hypertonic saline solution (HS) use in the hypotensive hemorrhage (HH) treatment have been reported for several years. Recent investigations have shown the participation of central nervous system (CNS) regions, such as A1 neuronal clusters (located in the caudal ventrolateral medulla; CVLM), A2 neuronal clusters (located in the nucleus of the solitary tract; NTS) and the Median Preoptic Nucleus (MnPO) on hemodynamic responses induced by sodium chloride overload in normovolemic animals. However, the role of the above structures in cardiovascular recovery and autonomic changes induced by HS solution administration in animals submitted to HH has not yet been evaluated. Thus, the present study evaluated the A1, A2 neuronal clusters and MnPO nucleus involvement in the cardiovascular and autonomic responses promoted by HS solution infusion in hypovolemic animals. For this, wistar rats (280-320 g) were separated into four protocols: I. A2 neuronal cluster lesion (A2 Sham: n = 6; A2 Experimental: n = 6); II. A1 neuronal cluster lesion (A1 Sham: n = 6; A1 Experimental: n = 6); III. A1 and A2 neural clusters concomitant lesions (A1 + A2 Sham: n = 6; A1 + A2 Experimental: n = 6) and IV. Pharmacological inhibition of MnPO (MnPO Sham: n = 6; MnPO Experimental: n = 6). The animals of the first three protocols were anesthetized and subjected to saporin-anti-D β H nanoinjections for neuronal lesion (100 nL, 0.105 ng/nl) in experimental groups and Saporin nanoinjections (100 nL, 0.022 ng/nL) in sham groups for fictitious neuronal lesion, respectively, in the NTS, CVLM or simultaneously in the NTS and CVLM regions. After 20 days of recovery, the animals were anesthetized and instrumented to mean arterial pressure (MAP), heart rate (HR) and renal sympathetic nervous activity (RSNA) recordings. Then, HH was performed by blood withdrawal until MAP reached approximately 60 mmHg. After 20 min of HH, sodium overload (3M NaCl, 1.8 mL/g, 90 seconds of infusion, i.v) was conducted. In another series of experiments, MnPO Sham and MnPO Experimental groups were anesthetized and instrumented for MAP, HR and RSNA recordings. Then, the animals were submitted to HH and HS infusion at the end of the hemorrhage. GABAergic agonist Muscimol (4 mM, 100 nL, MnPO Experimental group) or saline nanoinjections (0.15 M, 100 nL, MnPO Sham group) were performed in the MnPO

after 10 min from the start of HH. HH-induced hypotension, bradycardia and renal sympathoinhibition in the animals of the A2 Sham, A1 Sham, A1 + A2 Sham and MnPO Sham groups. In the sham groups, HS infusion after HH reestablished MAP, HR, and did not alter the renal sympathoinhibition generated during hypovolemia. In the A2 Experimental and A1 Experimental groups, the specific lesion of A1 or A2 neurons did not alter the hypotension, bradycardia and renal sympathoinhibition caused during HH. In addition, the A1 or A2 neurons specific lesion did not alter the reestablishment of MAP, HR and the RSNA reduction after HS solution infusion. However, in the animals of the A1 + A2 experimental group, the simultaneous A1 and A2 neurons lesion did not alter the decrease in MAP and HR observed during HH, but abolished renal sympathoinhibition. In addition, simultaneous A1 and A2 neurons lesion abolished MAP restoration and ANSR reduction after HS infusion, while HR restoration was not modified. In the MnPO experimental animals, MnPO nucleus inhibition did not alter the decrease in MAP and HR observed during HH, but abolished renal sympathoinhibition. However, MnPO inhibition abolished the MAP restoration and promoted strong sympathetic activation in the renal bed after HS infusion, while HR restoration was not modified. These results suggest that the A1, A2 neuronal clusters and MnPO nucleus are part of the integration and transmission information circuits about changes in plasma osmolarity, participating in cardiovascular and autonomic recovery induced by sodium chloride overload in animals submitted to HH.

Key words: Hypovolemia, Hyperosmolarity, Nucleus of the Solitary Tract, Caudal Ventrolateral Medulla, Renal Sympathetic Nervous Activity, Blood Pressure.

1. INTRODUÇÃO

A homeostase corporal, ou seja, a manutenção das condições do meio interno, é a finalidade de todo processo fisiológico (1). Diversos componentes corporais são frequentemente regulados a fim de manter o estado homeostático. A manutenção da volemia, ou seja, o volume de sangue circulante, é essencial para o equilíbrio do meio interno. De fato, distúrbios e alterações de volemia, como quadros hemorrágicos, representam grandes riscos à manutenção da homeostase corporal.

Dentre as alterações de volemia, destaca-se a hemorragia hipotensiva (HH). Caracterizada pela perda de grande volume sanguíneo decorrente de lesões graves, esta patologia gera uma consequente incapacidade do organismo em manter uma perfusão sanguínea adequada a órgãos e sistemas vitais (2). Este estado de hipoperfusão tecidual conduz a uma baixa oferta de oxigênio e nutrientes, os quais são necessários para a manutenção da função celular e de órgãos e tecidos (3).

Atuando como um fator de risco para o desenvolvimento de uma série de complicações, a perda de sangue ocorrida durante a HH leva a uma série de eventos e agravantes. Sequencialmente, ocorrem instabilidade hemodinâmica, o surgimento de coagulopatia, hipoxemia, hipovolemia, hipotensão, diminuição da perfusão tecidual, hipóxia celular, distúrbios da microcirculação, aumento do estresse oxidativo, liberação de quantidades significativas de mediadores químicos tóxicos e apoptose celular (4). Essas alterações são as bases para o posterior desenvolvimento de falência múltipla de órgãos, um processo inflamatório sistêmico que leva à disfunção de órgãos vitais, sendo responsável por altas taxas de mortalidade (4,5).

A HH tem se tornado um forte preditor de mortalidade. De fato, os elevados índices de óbitos em decorrência dessa patologia são observados em âmbito civil, militar e clínico (6–8). Gerando mais de seis milhões de mortes anualmente, o trauma é a maior causa de mortalidade em pacientes com idade inferior a 44 anos (9,10). Estudos mostram ainda que 30 a 40% das mortes geradas por lesões traumáticas são consequências de hemorragia

descontrolada ou de suas complicações (11,12). Efetivamente, a HH representa a segunda maior causa de óbitos entre feridos, independente do mecanismo de lesão (11). Investigações mostram ainda que a hemorragia é a maior causa evitável de mortalidade materna (8,13).

Esses dados, somados ao fato do choque circulatório ser a principal causa de mortalidade em unidades de terapia intensiva (14,15) evidenciam a importância desta patologia no contexto atual e a necessidade de tratamentos mais efetivos. Estudos que visem o melhor entendimento da fisiopatologia da HH são requeridos para desenvolvimento de estratégias terapêuticas com resultados mais satisfatórios e com um menor número de efeitos adversos. De fato, a compreensão do mecanismo da HH é essencial para que ocorram avanços na terapêutica e reduções nas taxas de mortalidade.

Diversas terapias foram desenvolvidas para o tratamento da HH (16,17). Entretanto, o controle da perda de sangue aliado com correções do déficit de volume vascular são postulados como as bases do tratamento dessa patologia (18). A terapia com fluidos surge como um conceito central para manutenção do volume intravascular e perfusão de órgãos e tecidos (19). De fato, a reanimação com fluidos é um dos primeiros tratamentos essenciais da HH grave e pode gerar efeitos significativos sobre a recuperação dos pacientes (20). Idealmente, o fluido para a reanimação combina a expansão de volume, a capacidade do sangue de transporte de oxigênio sem risco de transmissão de doenças e a restauração e manutenção da composição e distribuição dos líquidos corporais (21).

Em âmbito pré-hospitalar, atualmente, são recomendados quatro tipos de fluidos para o tratamento da HH: os cristalóides, as soluções coloidais, os substitutos do sangue e as soluções hipertônicas (3). O uso de solução salina hipertônica (NaCl; SH) destaca-se dentre as soluções hipertônicas. Este tipo de fluido, além de combinar as vantagens dos cristalóides, pode ser infundido em volumes menores (21). Ademais, estudos relatam resultados mais satisfatórios com o uso de fluidos hipertônicos quando comparado ao uso de fluidos isotônicos no tratamento da HH (22,23).

O emprego de soluções hipertônicas no tratamento da HH remonta há vários anos (24). Estudos pioneiros mostraram que a infusão de solução SH em um volume equivalente a 10% do volume retirado para promover hemorragia resultou em melhora hemodinâmica e promoveu sobrevivência dos cães (25). Em adição, o aumento da osmolaridade induzido por este mesmo tipo de protocolo gerou melhora hemodinâmica em pacientes internados em unidade de terapia intensiva com choque refratário a tratamentos convencionais (26), enfatizando a relevância e os benefícios do uso de solução SH no tratamento da HH.

A hiperosmolaridade induzida pela sobrecarga de cloreto de sódio é capaz de reestabelecer os parâmetros cardiovasculares que são prejudicados pela HH. Efetivamente, o uso de solução SH promove elevação instantânea da pressão arterial média (PAM), aumento da pressão de pulso, retorno do débito cardíaco ao valor basal e reestabelecimento da circulação mesentérica, renal e dos membros posteriores (27,28). De fato, inúmeros estudos relatam melhora nos parâmetros cardiovasculares após a infusão de solução SH em estados de hipovolemia, sepse ou lesão traumática (29–31).

Estudos demonstraram que os aferentes aórticos e carotídeos, quimiorreceptores e barorreceptores, podem estar envolvidos nos ajustes cardiovasculares induzidos por alterações de volume e na composição do compartimento extracelular (32,33). Essas investigações revelam um papel mais abrangente desses aferentes dentre o já descrito na regulação da pressão arterial e na detecção de variações de pH e da pressão parcial de O₂ e CO₂ (34–36). Recentemente, foi demonstrado que os aferentes aórticos e carotídeos estão envolvidos nas respostas cardiovasculares e na simpatoinibição renal induzidas por hipernatremia aguda em ratos normovolêmicos (37). Esses estudos mostram a importância desses aferentes para os ajustes reflexos provocados por mudanças na concentração plasmática de sódio e indicam uma possível participação do sistema nervoso central (SNC) nesses ajustes (37–39).

Evidências sugerem ainda que os efeitos hemodinâmicos e cardiovasculares promovidos por soluções hipertônicas, já descritos anteriormente, não são atribuídos somente à expansão do volume plasmático (40). Autores demonstraram que lesão eletrolítica da região anteroventral do III ventrículo (AV3V) ou bloqueio dos receptores AT1 de angiotensina, pela

administração intracerebroventricular de losartan (antagonista AT1), atenuou a restauração da pressão arterial promovida pela sobrecarga de sódio durante a HH (41,42). Ademais, a restauração da pressão arterial induzida pela infusão de solução SH durante a hemorragia foi impedida após a denervação não seletiva dos barorreceptores (43). Estes resultados sugerem que a melhora hemodinâmica promovida pela infusão de solução SH requer, pelo menos em parte, o recrutamento de aferentes neuronais periféricos. Reafirmando as evidências experimentais anteriores, foi demonstrado que a inativação específica dos quimiorreceptores carotídeos aboliu a recuperação da pressão arterial induzida pela sobrecarga de sódio em ratos submetidos à HH (44). Ressalta-se assim a relevância dos aferentes neuronais periféricos nas respostas à infusão de solução SH em estado de hipovolemia. Ademais, essas investigações sugerem o envolvimento de componentes e vias do SNC nessas respostas. Apesar das evidências da possível mediação do SNC no reestabelecimento cardiovascular e hemodinâmico promovido pela infusão de solução SH durante a HH, as áreas e estruturas centrais envolvidas continuam a ser esclarecidas.

Informações a respeito de alterações da composição e do volume circulante, detectadas por aferentes neuronais periféricos, são enviadas e integralizadas no núcleo do tracto solitário (NTS; neurônios do grupamento catecolaminérgico A2) (45). A partir do NTS, essas informações são conduzidas a diversas regiões e núcleos bulbares, pontíneos e hipotalâmicos responsáveis por processar e promover ajustes autonômicos, cardiovasculares e humorais (46–50). Dentre essas regiões, destaca-se a região caudoventrolateral do bulbo (CVLM; neurônios do grupamento catecolaminérgico A1) e o núcleo pré-óptico mediano (MnPO).

Corroborando com as evidências da relevância dos neurônios dos grupamentos catecolaminérgicos A1 e A2 nas respostas à hiperosmolaridade, investigações mostraram que esses grupamentos são ativados por aumentos na osmolaridade plasmática (51). Outros estudos revelam ainda a existência de projeções diretas e indiretas dos grupamentos neuronais A1 e A2 para a região AV3V, a qual é constituída pela região ventral do núcleo MnPO, o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e as porções mediais do núcleo pré-óptico

periventricular (50,52,53). Dentro da região AV3V, o núcleo MnPO atua como centro de integração de informações e está intimamente relacionado com o controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico (54–56). De fato, autores mostraram ainda que o núcleo MnPO, o NTS e a região CVLM enviam densas projeções para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), um núcleo pré-motor simpático que regula as respostas autonômicas e neuroendócrinas à hiperosmolaridade (50,55–57).

Seguramente, uma série de evidências experimentais enfatizam a importância dos grupamentos neuronais A1, A2 e do núcleo MnPO nos mecanismos de integração e ajustes do equilíbrio hidroeletrolítico (45,53). Além do mais, estudos anteriores demonstraram a participação dos grupamentos neuronais A1, A2 e do núcleo MnPO nas respostas à hiperosmolaridade, onde a lesão dessas regiões bulbares ou o bloqueio da neurotransmissão adrenérgica no núcleo MnPO eliminaram as respostas cardiovasculares e autonômicas induzidas pela sobrecarga de sódio em ratos normovolêmicos (58–60). Entretanto, em estado de hipovolemia, essas respostas ainda não foram avaliadas.

Do até aqui exposto é lícito hipotetizar que os neurônios dos grupamentos neuronais A1, A2 e o núcleo MnPO participam das vias e mecanismos neuronais que regulam as respostas reflexas à sobrecarga de sódio em quadros de hipovolemia. Ademais, a melhor compreensão das vias e estruturas neuronais envolvidas nessas respostas reflexas pode auxiliar no aperfeiçoamento do emprego de soluções hipertônicas no tratamento da HH e na formulação de novas abordagens terapêuticas. Assim, torna-se importante investigar o envolvimento dos grupamentos de neurônios catecolaminérgicos A1, A2 e do núcleo MnPO nas respostas cardiovasculares e autonômicas compensatórias à infusão de solução SH em ratos submetidos à HH.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a participação dos grupamentos de neurônios catecolaminérgicos A1, A2 e do núcleo MnPO nas respostas reflexas cardiovasculares e autonômicas a sobrecarga de sódio durante a HH.

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar o envolvimento dos neurônios catecolaminérgicos A2 nas respostas da PAM, frequência cardíaca (FC) e atividade nervosa simpática renal (ANSR) após a infusão de solução SH em ratos anestesiados submetidos à HH.

Verificar a participação dos neurônios catecolaminérgicos A1 nas respostas da PAM, FC e ANSR após a infusão de solução SH em ratos anestesiados submetidos à HH.

Analisar a participação conjunta dos neurônios catecolaminérgicos A1 e A2 nas respostas da PAM, FC e ANSR após a infusão de solução SH em ratos anestesiados submetidos à HH.

Avaliar o papel do núcleo MnPO nas respostas da PAM, FC e ANSR após a infusão de solução SH em ratos anestesiados submetidos à HH.

3. METODOLOGIA

3.1 MODELO ANIMAL UTILIZADO

Foram utilizados ratos adultos da linhagem Wistar (8-10 semanas), pesando entre 280-320g, fornecidos pelo biotério central da Universidade Federal de Goiás (UFG). Os animais foram mantidos no biotério setorial do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCiF) em salas climatizadas (22-24°C) e tiveram acesso *ad libitum* à água e ração, atendendo a todas as normas de manejo e cuidado animal. Todos os protocolos utilizados foram aprovados pelo comitê de ética da UFG (nº034/12).

3.2 PROTOCOLOS

Os animais foram divididos em quatro protocolos: I. Lesão do grupamento neuronal A2 (Controle A2: n=6; Experimental A2: n=6); II. Lesão do grupamento neuronal A1 (Controle A1: n=6; Experimental A1: n=6); III. Lesões concomitantes dos grupamentos neuronais A1 e A2 (Controle A1 + A2: n=6; Experimental A1 + A2: n=6) e IV. Inibição farmacológica do núcleo MnPO (Controle MnPO: n=6; Experimental MnPO: n=6).

3.3 NANOINJEÇÕES NA REGIÃO CVLM E NTS

Os animais pertencentes ao protocolo de lesão dos grupamentos neuronais A1, A2 e A1 + A2 foram anestesiados com Cetamina (10%, 1 mL/kg, intraperitoneal – IP, Syntec, Santana de Parnaíba, SP, Brasil) associada a Xilazina (2%, 0,7 mL/kg, IP, Syntec Santana de Parnaíba, SP, Brasil) e posicionados em decúbito ventral em um aparelho estereotático (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) com a barra de incisivos 11 mm abaixo da linha interaural. Em seguida, foi realizada uma incisão na região ínfero-posterior da cabeça, a musculatura da nuca foi rebatida, expondo-se o osso occipital e a membrana atlanto-occipital. Com auxílio de uma pinça goiva o osso occipital foi removido, a dura-máter rebatida e o calamus scriptorius localizado para ser usado como ponto de referência para obtenção das coordenadas estereotáticas.

Para promover a lesão específica dos neurônios dos grupamentos neuronais A1, A2 e A1 +A2 os animais receberam nanoinjeções centrais do complexo saporina-anti-dopamina- β -hidroxilase (saporina-anti-D β H, 100 nL, 0,105 ng/nL, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, EUA) respectivamente, na região CVLM, no NTS ou conjuntamente na região CVLM e no NTS. Nos grupos controle foram realizadas nanoinjeções centrais de doses equimolares de Saporina (100 nL, 0,022 ng/nL, Advanced Targeting Systems, San Diego, CA, EUA) nas mesmas áreas (61,62).

Todas as nanoinjeções centrais foram realizadas utilizando micropipetas de vidros acopladas a um sistema de pressão manual. O controle do volume injetado de cada fármaco foi realizado pelo deslocamento do menisco da solução na micropipeta através de um microscópio cirúrgico dotado de uma lente ocular com retículo calibrado. As coordenadas utilizadas foram obtidas e modificadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1997) (63) e são mostradas na tabela 1:

Tabela 1. Coordenadas utilizadas para nanoinjeções na região CVLM e no NTS

Coordenadas	CVLM	NTS
Ântero – Posterior	0,1 e 0,4 mm rostral e 0,2 mm caudal ao <i>calamus scriptorius</i>	0,5 e 0,0 caudal ao <i>calamus scriptorius</i>
Latero – Medial	1,8 mm lateral ao <i>calamus scriptorius</i>	0,0 mm lateral ao <i>calamus scriptorius</i>
Dorso – Ventral	1,8 mm ventral à superfície dorsal	0,5 mm ventral à superfície dorsal
Linha Interaural	11 mm abaixo da linha interaural	11 mm abaixo da linha interaural

Ao final das nanoinjeções centrais, a incisão foi suturada com linha cirúrgica e aplicado doses profiláticas de analgésico (Flunixin, 0,02 mL/Kg, Intramuscular, CHEMITEC, Brasil, SP). Após o procedimento cirúrgico os animais foram mantidos em gaiolas com água e ração *ad libitum* por 20 dias para recuperação cirúrgica e estabelecimento das lesões nos grupos experimentais.

3.4 INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO NÚCLEO MnPO

Os animais pertencentes ao protocolo de inibição farmacológica do núcleo MnPO foram posicionados em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil) com a barra de incisivos 3,5 mm abaixo da linha interaural. Antes do início da HH, a pele e a musculatura localizada acima dos ossos parietais foram removidas com auxílio de um bisturi. Em seguida, o bregma (encontro das suturas sagital e coronal) foi localizado e as coordenadas registradas através do posicionamento da pipeta de vidro sobre o bregma. Parte dos ossos parietais e do osso frontal foi removida com o auxílio de uma broca cirúrgica. As coordenadas do seio sagital também foram registradas e este foi lateralizado. As nanoinjeções no núcleo MnPO foram realizadas após 10 minutos do início da HH por meio de uma micropipeta de vidro acoplada a um sistema de pressão manual. O volume injetado de cada solução foi controlado pelo deslocamento do menisco da solução na micropipeta através de um microscópio cirúrgico dotado de uma lente ocular com retículo calibrado.

Para promover a inibição farmacológica do núcleo MnPO os animais receberam nanoinjeções de Muscimol (agonista dos receptores GABAérgicos, 4 mM, 100 nL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) no núcleo MnPO, potencializando a inibição promovida pelo neurotransmissor inibitório GABA nesse núcleo. No grupo controle MnPO foram realizadas nanoinjeções de soro fisiológico (NaCl, 0,15 M, 100 nL) na mesma região. Ao final dos experimentos foi injetado no mesmo sítio de nanoinjeção o corante azul de Evans (4%, 100 nL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para confirmação histológica dos sítios de nanoinjeção.

As coordenadas utilizadas foram obtidas e modificadas a partir do Atlas de Paxinos & Watson (1997) (63) e são mostradas no quadro esquemático a seguir:

Tabela 2. Coordenadas utilizadas para nanoinjeções no núcleo MnPO

Coordenadas	MnPO
Ântero - Posterior	0,6 mm rostral ao bregma
Latero - Medial	0,0 mm lateral ao seio venoso sagital
Dorso – Ventral	7,2 mm ventral ao seio venoso sagital
Linha Interaural	3,5 mm abaixo da linha interaural

3.5 PROCEDIMENTOS CIRÚRGICOS GERAIS

Os animais foram submetidos à indução anestésica com halotana (2%, Tanohalo, Cristália, Itapira, SP, Brasil) em O₂ a 100%. Em seguida, cateteres de polietileno PE-10 fundidos com PE-50 foram inseridos nas artérias e veias femorais direitas para o registro da pressão arterial e a infusão de drogas, respectivamente. Após a inserção do cateter venoso a anestesia foi mantida pela administração de uretano (1,2 g/kg, i.v., Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Um cateter adicional foi inserido na artéria carótida direita para retirada de sangue durante a HH. A traqueostomia foi realizada a fim de minimizar o esforço respiratório dos animais.

Posteriormente, os animais foram fixados em decúbito ventral em um aparelho estereotático (Insight Ltda., Ribeirão Preto, SP, Brasil). Nos experimentos de inibição farmacológica do núcleo MnPO os animais foram submetidos a craniotomia para realização das nanoinjeções no núcleo MnPO durante a HH. Em seguida, para registro da ANSR os animais foram submetidos inicialmente a uma incisão retro peritoneal. Posteriormente o nervo renal esquerdo foi isolado e posicionado sobre um par de eletrodos bipolar de prata acoplado a um micromanipulador conectado ao sistema de aquisição e registro da ANSR. A temperatura corporal dos animais foi mantida entre 36° C e 37°C com o auxílio de uma mesa térmica durante todos os procedimentos.

3.6 HEMORRAGIA HIPOTENSIVA

A HH foi promovida através da retirada de sangue pela artéria carótida direita ao longo de 10 minutos, até que a PAM atingisse valores próximos a 60 mmHg. Posteriormente esse nível de PAM foi mantido por mais 10 minutos através da retirada e reinfusão sangue quando necessário.

3.7 SOBRECARGA DE SÓDIO

A sobrecarga de sódio foi promovida através da infusão de solução SH (NaCl 3M, i.v, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) após 20 minutos do início da HH. A administração da solução foi realizada ao longo de aproximadamente 90 segundos, na dose de 1,8 mL/kg de massa corpórea.

3.8 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Na figura 1 é mostrado o delineamento experimental dos quatro grupos realizados.

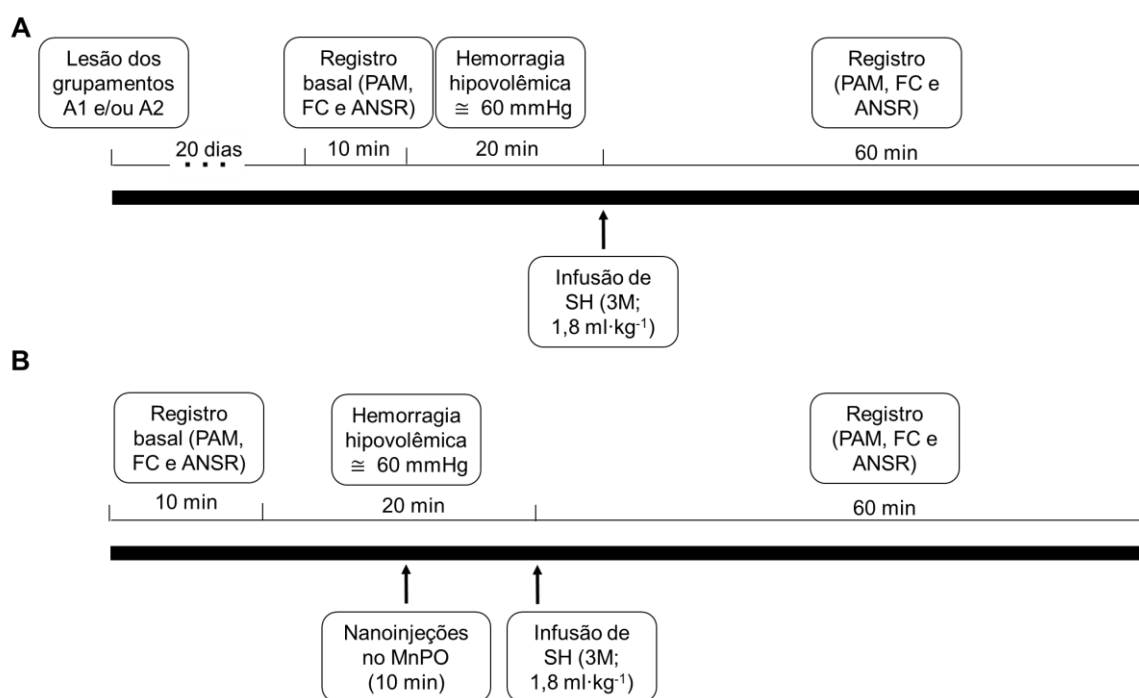


Figura 1. Esquema representativo do delineamento experimental dos grupos controle A2, experimental A2, controle A1, experimental A1, controle A1 + A2 e experimental A1 + A2 (A) e controle MnPO e experimental MnPO (B).

3.9 REGISTRO DA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA CARDÍACA

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

3.10 REGISTRO DA ATIVIDADE NERVOSA SIMPÁTICA RENAL (ANSR)

O registro da ANSR foi obtido através do posicionamento do nervo renal sobre um par de eletrodos bipolar de prata acoplado a um sistema de aquisição e registro de dados. O sinal da ANSR foi amplificado em 20.000 vezes e filtrado entre 30 e 1.000 Hz (Grass Technologies, P511 AC amplifier, Warwick, EUA). Posteriormente, os sinais gerados foram digitalizados em uma frequência de 2.000 amostras/s utilizando-se um conversor analógico digital (PowerLab 4/25, ML845, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Para quantificar o ruído do sinal obtido, foi administrado o bloqueador ganglionar hexametônio (30 mg/kg, i.v, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) ao final dos experimentos. Óleo mineral (Nujol, Schering-Plough, SP, Brasil, $\pm 37,5^{\circ}\text{C}$) foi adicionado ao campo cirúrgico a fim de evitar ressecamento e isolar a captação de ruídos externos.

O sinal de ANSR foi quantificado através da integração do valor absoluto em intervalos de 1s (LabChart 7 v7.3.7, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). A ANSR corrigida (ANSR_c) em cada ponto foi calculada pela subtração do ruído do sinal bruto. As variações da atividade nervosa simpática renal (%ANSR) foram calculadas como a razão percentual em relação ao valor basal. As fórmulas utilizadas para os cálculos são mostradas no quadro a seguir.

Tabela 3. Fórmulas usadas para cálculo da ANSR corrigida (ANSR_c) e variação da ANSR (%ANSR)

ANSR	FÓRMULAS
ANSR corrigida (ANSR_c)	$ANSR_c = ANSR_{final} - \text{Ruído}$
Variação ANSR (%ANSR)	$\%ANSR = \left[\frac{ANSR_c - ANSR_{basalcorrigida}}{ANSR_{basalcorrigida}} \right] \times 100$

3.11 RETIRADA E PROCESSAMENTO DO TECIDO CEREBRAL

Ao final dos experimentos os animais foram submetidos à perfusão transcardíaca com soro fisiológico (NaCl, 0,15 M, 200 mL) seguido por solução de paraformaldeído (PFA, 4%, 500 mL, LabSynth, Diadema, SP, Brasil) em tampão fosfato (0,1 M, pH 7,4, LabSynth, Diadema, SP, Brasil). A perfusão foi realizada pela inserção de uma agulha conectada a um cateter de polietileno, acoplado a uma bomba de perfusão, no ventrículo esquerdo. Em seguida, os bulbos dos animais submetidos a nanoinjeções na região CLVM e/ou no NTS foram removidos, mantido em PFA 4% por 2 horas e mantidos em solução de sacarose (0,8 M, LabSynth, Diadema, SP, Brasil) para posterior corte histológico e processamento por imunoistoquímica. Os animais submetidos a nanoinjeções no núcleo MnPO tiveram os encéfalos removidos após a perfusão transcardíaca e mantidos em formaldeído (10%, LabSynth, Diadema, SP, Brasil) até a realização dos cortes histológicos.

As regiões bulbares e hipotalâmicas foram seccionadas em cortes coronais de 40 µm de espessura com o auxílio de um criostato (Leica, Wetzlar, Alemanha) e armazenadas em solução salina tamponada com fosfato (PBS, 0,01 M, pH 7,4, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Os cortes bulbares foram submetidos à técnica de imunoistoquímica para detecção da enzima tirosina hidroxilase (TH) e posterior contagem neuronal. Os cortes hipotalâmicos dos animais submetidos a nanoinjeções no núcleo MnPO foram organizados em

lâminas e corados pela técnica de vermelho neutro para determinar a extensão das nanoinjeções.

3.12 COLORAÇÃO POR VERMELHO NEUTRO

Os cortes hipotalâmicos da região do MnPO dos animais submetidos a nanoinjeções nesse núcleo foram submetidos à coloração de vermelho neutro para evidenciar a marcação do corante azul de Evans (4%, 100 nL, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a montagem em lâminas e secagem em temperatura ambiente, os cortes foram submergidos em vermelho neutro ($C_{15}H_{17}ClN_4$, 1%) por 5 minutos. Em seguida foram lavados em água destilada e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (C_2H_6O , 70%, 90%, 100%, 3 min). Os cortes foram ainda submergidos em xilol (C_8H_{10} , 30min, Neon, Suzano, SP, Brasil) para remoção do álcool e clarificação. Posteriormente foram recobertos com lamínulas com auxílio de DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.13 IMUNOISTOQUÍMICA

Para determinar a extensão da lesão dos neurônios dos grupamentos neuronais A2 e/ou A1, os cortes bulbares foram processados pela técnica de imunistoquímica para a marcação das células tirosina hidroxilase positivas (TH +). Para o bloqueio da peroxidase endógena os cortes foram lavados com peróxido de hidrogênio (1%, 1 x 10 min, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS (0,1M, pH 7,4, 3 x 10 min, LabSynth, Diadema, SP, Brasil) e em seguida lavados com ImmunoBuffer (IB, Triton 0,3% em PBS, 3 x 10 min, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) para promover o aumento da solubilidade da membrana plasmática. Posteriormente, foram incubados com soro normal de cavalo (2% em IB, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) por 30 minutos, para bloqueio de sítios inespecíficos de ligação. Após a pré-incubação, os cortes foram incubados em solução contendo anticorpo primário anti-tirosina-hidroxilase feito em camundongo (1:2000, ImmunoStar, Inc., Hudson, WI, EUA) e soro normal de cavalo (2% em IB, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) por 18 a 24 horas.

No dia seguinte, os cortes foram novamente lavados em tampão PBS 0,01M e incubados em solução contendo anticorpo secundário biotinilado anti-IgG de camundongo obtido em cavalo (1:500, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) e soro normal de cavalo (1% em IB) por 18 a 24 horas. Posteriormente, os cortes foram lavados em PBS 0,01M e incubados em solução contendo o conjugado avidina-biotina-peroxidase (1:200, ABC kit standard, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA) por 4 horas. Por fim, os cortes foram incubados com solução contendo Diaminobenzidina (DAB) e peróxido de hidrogênio (peroxidase substrate kit DAB, Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA, EUA). A reação foi interrompida após dois minutos por meio de lavagens sucessivas em tampão PBS 0,01M. Os cortes obtidos foram montados em lâminas de vidro selanizadas, secos a temperatura ambiente, desidratados em concentrações crescentes de álcool (C_2H_6O , 70%, 90%, 100%, 3 min), clarificados em xilol (C_8H_{10} , 30 min, Neon, Suzano, SP, Brasil) e posteriormente recobertos com lamínulas com auxílio de DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.14 CONTAGEM NEURONAL

Os neurônios marcados para TH através da técnica de imunoistoquímica foram contados em cada quarta seção do bulbo (40 de cada 160 μm). Todas as células nas quais foram possíveis identificar o corpo celular e pelo menos uma ramificação (dendrito ou axônio) no bulbo ventrolateral (VLM; grupamentos de neurônios A1/C1) e no NTS (grupamentos de neurônios A2/C2) foram contadas bilateralmente para quantificar a extensão da lesão induzida por saporina-anti-D β H. Os neurônios foram contados em aumento de duzentas vezes (200X) utilizando um microscópio óptico (Leica DM500, Leica Microsystems, SP, Brasil) acoplado a um sistema digital de aquisição de imagens (Leica Application Suite, V.3.10, Leica Microsystems, SP, Brasil).

3.15 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A confecção dos gráficos e as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (v 5.01). Os parâmetros cardiovasculares e autonômicos foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). Os

valores de PAM, FC e as variações da ANSR foram analisados usando análise de variância de duas vias (ANOVA two way; Fatores: grupo/tempo) com medidas repetidas seguido pelo pós teste de Tukey. Valor de $p < 0,05$ foi considerado para denotar diferença significativa.

A contagem celular foi expressa como média $\pm$ EPM. O número de células contadas para cada seção foi comparado por análise de variância de uma via (ANOVA one way; Fator: grupo) seguido pelo pós teste de Tukey. O total das contagens de células para os grupamentos A1, C1, A2 e C2 foi comparado entre os grupos por teste t-Student. Valor de $p < 0,05$ foi considerado para denotar diferença significativa.

4. RESULTADOS

4.1. ANÁLISE DA LESÃO DO GRUPAMENTO NEURONAL A2 PELAS NANOINJEÇÕES DE SAPORINA-ANTI-D β H NO NTS

As análises histológicas qualitativas (Figura 2, 6 e 10) e quantitativas (Figura 3, 7 e 11) revelaram a presença de neurônios TH positivos por toda extensão do VLM e do NTS, regiões compreendidas entre 1.900 μ m caudal e 1.900 μ m rostral ao óbex (63).

A quantificação dos neurônios TH positivos demonstrou que os animais do grupo controle A2 (n=6), os quais receberam nanoinjeções de saporina no NTS, apresentaram em média 30 células por seção na região do NTS que abrange o grupamento neuronal A2, compreendida a 1900 μ m caudal ao óbex. Já nos animais do grupo experimental A2 (n=6), os quais receberam nanoinjeções de saporina-anti-D β H, a média do número de células por seção foi reduzida para 10. Assim, a redução percentual do número de neurônios A2 no grupo experimental foi de aproximadamente 66% em comparação ao grupo controle (Figura 2 e 3).

As nanoinjeções de saporina-anti-D β H no NTS não promoveram alterações significativas no número de células TH positivas na região do NTS que abrange o grupamento neuronal C2, localizada a 1900 μ m rostral ao óbex (Figura 3; 20% em relação ao grupo controle A2). Não foram observadas ainda mudanças no número de células A1 e C1 na VLM, distribuídas respectivamente entre 200 - 1900 μ m caudal ao óbex e 200 μ m rostral e 1900 μ m caudal ao óbex (Figura 2 e 3; A1: -13% e C1: 11% em relação ao grupo controle A2).

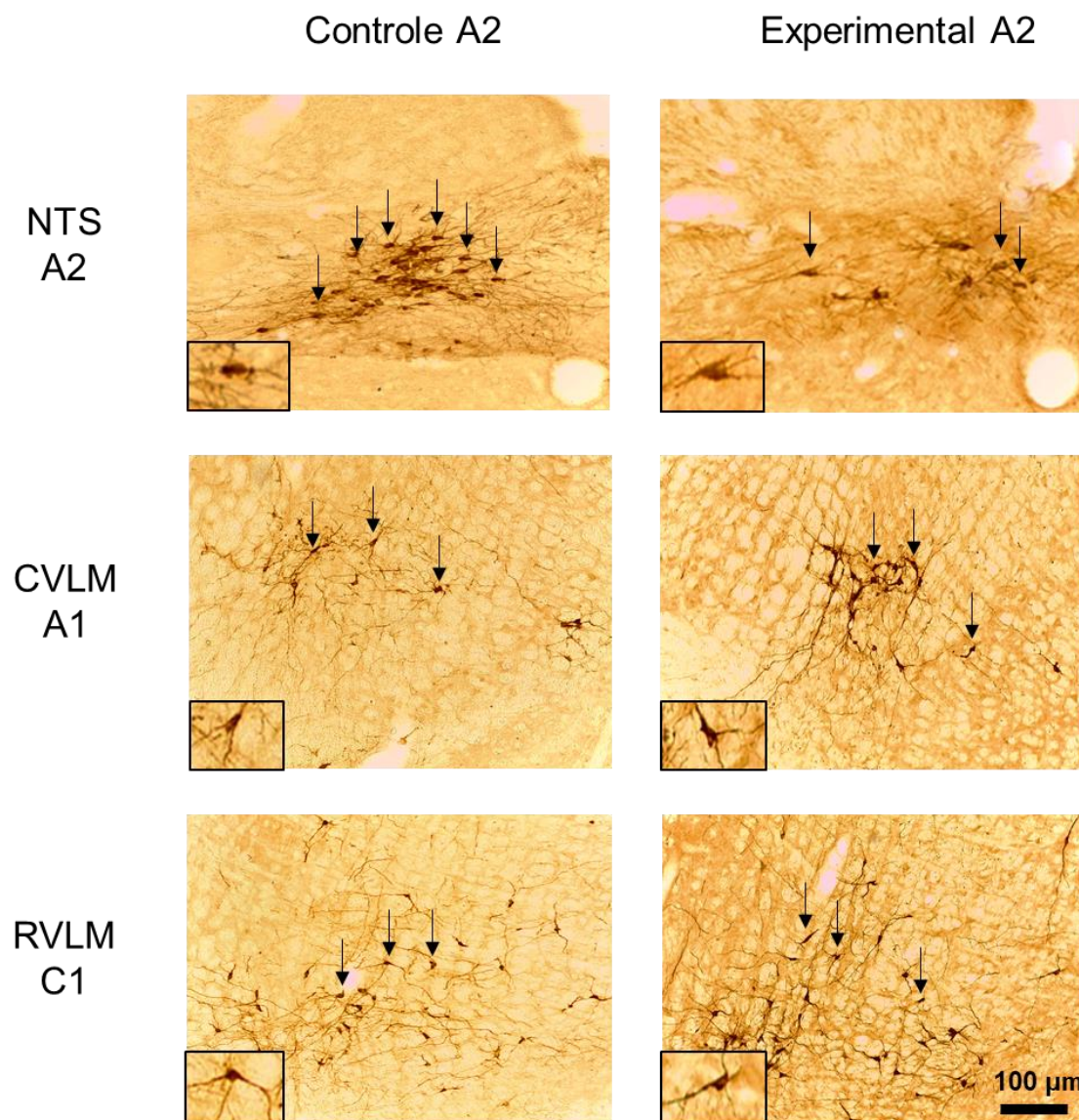


Figura 2. Fotomicrografia representativa dos cortes coronais do bulbo (40µm) marcados pela técnica de imunoistoquímica. As setas indicam a marcação dos neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamento neuronal A2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A2) ou saporina-anti-DβH (Grupo experimental A2) no NTS. Escala = 100 µm.

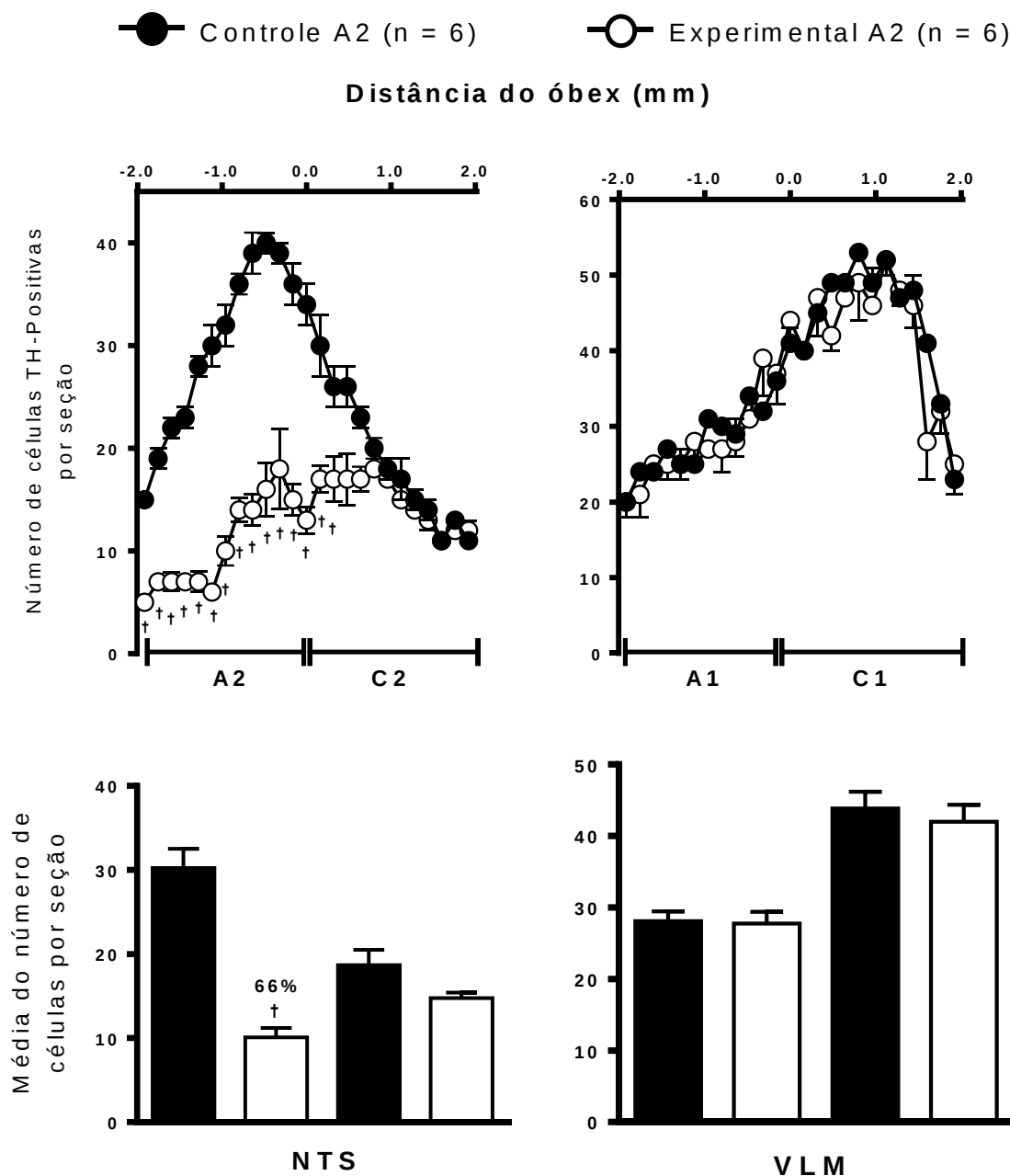


Figura 3. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) do número de neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamentos neuronais A2 e C2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A2) no NTS. † diferente do controle; $p < 0,05$.

4.2. ANÁLISE DOS EFEITOS DA LESÃO DO GRUPAMENTO NEURONAL A2 SOBRE A INFUSÃO DE SALINA HIPERTÔNICA APÓS A HEMORRAGIA HIPOTENSIVA

Os valores basais dos parâmetros cardiovasculares e o volume de sangue retirado para promover a HH foram similares nos animais dos grupos controle A2 e experimental A2 (Tabela 4).

Tabela 4. Valores basais dos parâmetros analisados nos animais do grupo Controle A2 e Experimental A2

Grupos	N	Massa Corporal (g)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	∫ANSR (u.a)	Volume de Sangue (mL)
Controle A2	6	320,5 ± 5,2	108,5 ± 4,5	413,8 ± 16,4	0,10 ± 0,03	3,7 ± 0,7
Experimental A2	6	322,5 ± 7,3	100,9 ± 2,9	431,5 ± 12,3	0,07 ± 0,02	3,9 ± 0,3

Média ± erro padrão da média (E.P.M) dos valores basais da massa corpórea (g), pressão arterial média (PAM- mmHg), frequência cardíaca (FC- bpm), integral da atividade simpática renal (∫ANSR- u.a) e volume sanguíneo (mL) retirado para promover a hemorragia hipotensiva (HH) nos animais do grupo controle A2 e Experimental A2.

As alterações promovidas durante a HH e após a infusão de salina hipertônica nos animais do grupo controle A2 e experimental A2 são esquematizadas nos traçados representativos a seguir (Figura 4).

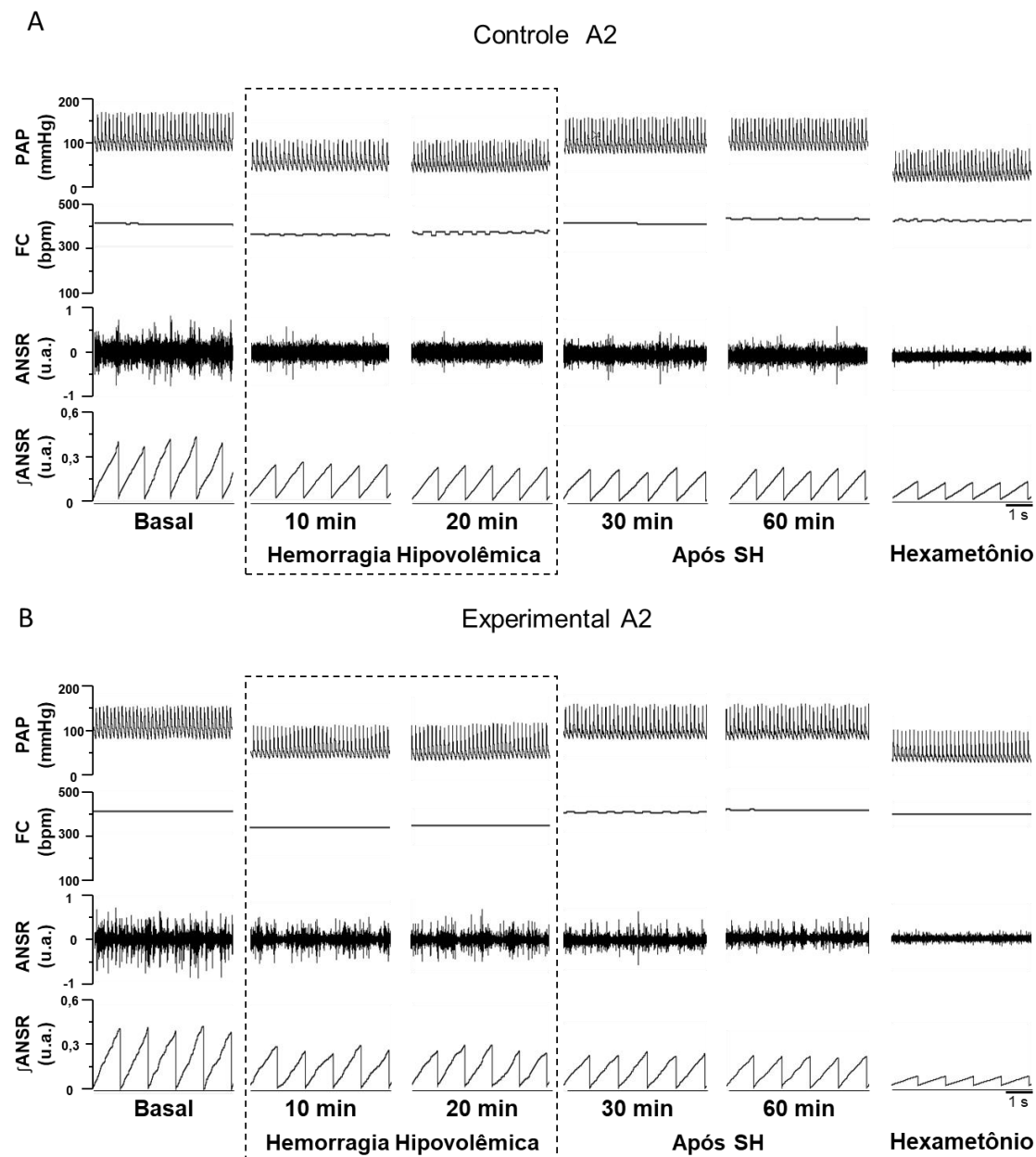


Figura 4. Traçado representativo das alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade nervosa simpática renal (JANSR) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A2) no NTS. Estão representados no traçado o período basal, 10 e 20 minutos de HH, 30 e 60 minutos após a infusão de SH e o período após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio.

A HH promoveu uma redução da PAM equivalente entre grupos (Controle A2: de $108,5 \pm 4,5$ para $60,8 \pm 0,4$ mmHg; Experimental A2: de $100,9 \pm 2,9$ para $61,2 \pm 0,6$ mmHg, 20 min após início da HH; $p < 0,05$; Figura 5A). De modo semelhante, a sobrecarga de sódio foi capaz de reverter a hipotensão gerada durante a HH em ambos os grupos, retornando a níveis basais (Controle A2: $92,8 \pm 4,0$ mmHg; Experimental A2: $106,2 \pm 5,7$ mmHg, 60 min após a infusão de SH; Figura 5A).

Bradicardia foi observada ao final da HH nos animais dos grupos controle A2 e experimental A2 (Controle A2: de $413,8 \pm 16,4$ para $325,9 \pm 23,9$ bpm; Experimental A2: de $431,5 \pm 12,3$ para $350,9 \pm 14,5$ bpm, 20 min após início da HH; $p < 0,05$; Figura 5B). Após a sobrecarga de sódio, houve uma tendência de restabelecimento da FC a níveis basais em ambos grupos (Controle A2: $365,4 \pm 20,8$ bpm; Experimental A2: $400,0 \pm 7,1$ bpm, 60 min após a infusão de SH; Figura 5B).

No leito renal, durante a HH foi gerada uma redução da ANSR semelhante nos grupos controle A2 e experimental A2 (Controle A2: $\Delta -52,0 \pm 14,4$ %; Experimental A2: $\Delta -57,6 \pm 10,2$ %, 20 min após início da HH, em relação ao basal; $p < 0,05$; Figura 5C). A infusão de salina hipertônica não alterou a simpatoinibição provocada em ambos os grupos pela HH (Controle A2: $\Delta -52,9 \pm 14,3$ %; Experimental A2: $\Delta -59,6 \pm 7,0$ %, 60 min após a infusão de SH, em relação ao basal; $p < 0,05$; Figura 5C).

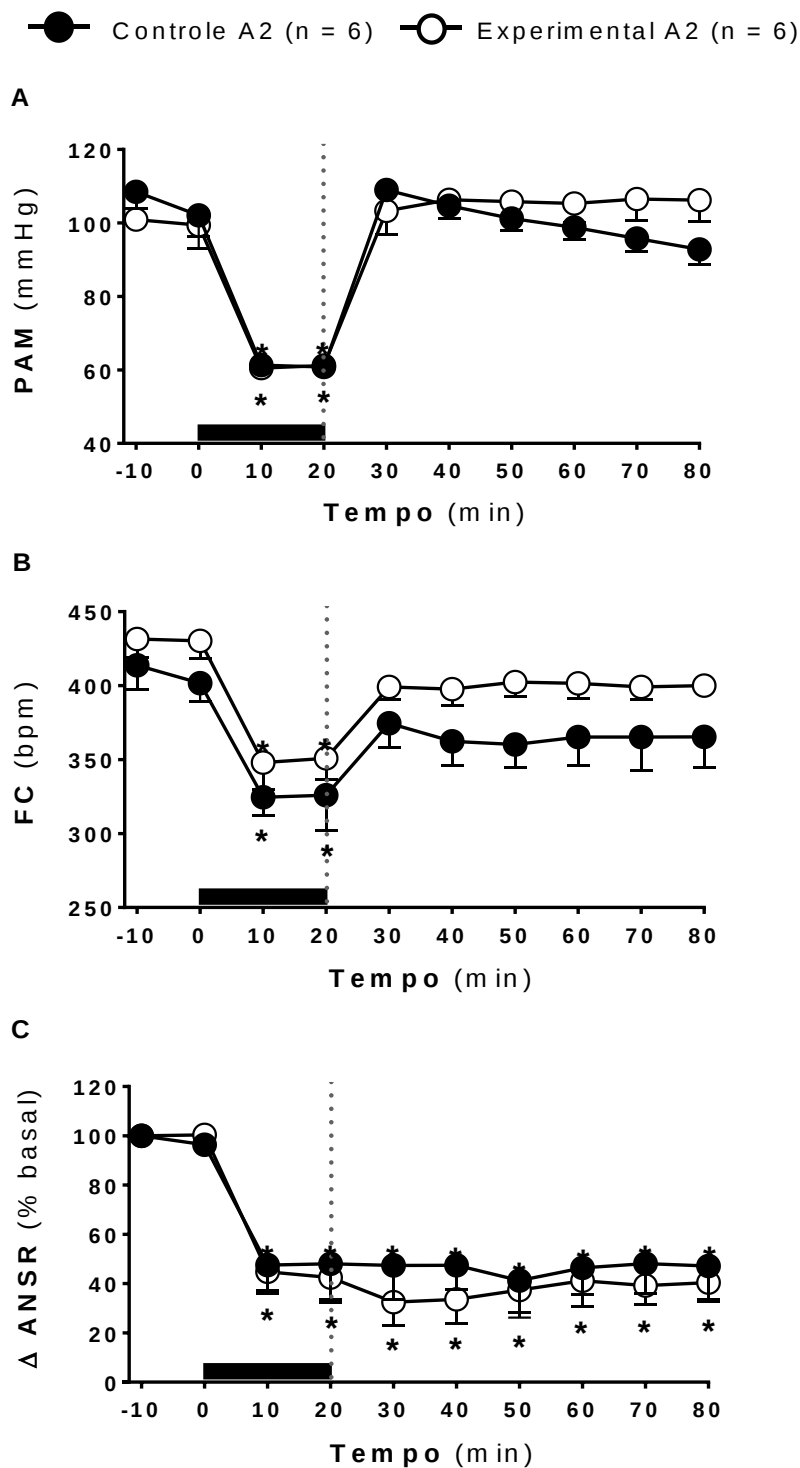


Figura 5. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) das alterações da pressão arterial média (PAM – A), frequência cardíaca (FC – B) e variação da atividade nervosa simpática renal (Δ ANSR – C) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A2) no NTS. *Diferente do tempo 0; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de HH e a linha tracejada representa a infusão de SH.

4.3. ANÁLISE DA LESÃO DO GRUPAMENTO NEURONAL A1 PELAS NANOINJEÇÕES DE SAPORINA-ANTI-D β H NA REGIÃO CVLM

A quantificação dos neurônios TH positivos demonstrou que os animais do grupo controle A1 (n=6), os quais receberam nanoinjeções de saporina na região CVLM, apresentaram em média 30 células por seção na região da VLM que abrange o grupamento neuronal A1, compreendida entre 200 μ m e 1900 μ m caudal ao óbex. Já nos animais do grupo experimental A1 (n=6), os quais receberam nanoinjeções de saporina-anti-D β H, a média do número de células por seção foi reduzida para 12. Assim, a redução percentual do número de neurônios A1 no grupo experimental foi de aproximadamente 60% em comparação ao grupo controle (Figuras 6 e 7).

As nanoinjeções de saporina-anti-D β H na região CVLM não promoveram alterações significativas no número de células TH + na região da VLM que abrange o grupamento neuronal C1, localizada entre 200 μ m rostral e 1900 μ m caudal ao óbex (Figura 6 e 7; 7% em relação ao grupo controle A1). Não foram observadas ainda mudanças no número de células C2 e A2 no NTS, distribuídas respectivamente entre 1900 μ m rostral e 1900 μ m caudal ao óbex (Figura 6 e 7; C2: 1% e A2: 5% em relação ao grupo controle A1).

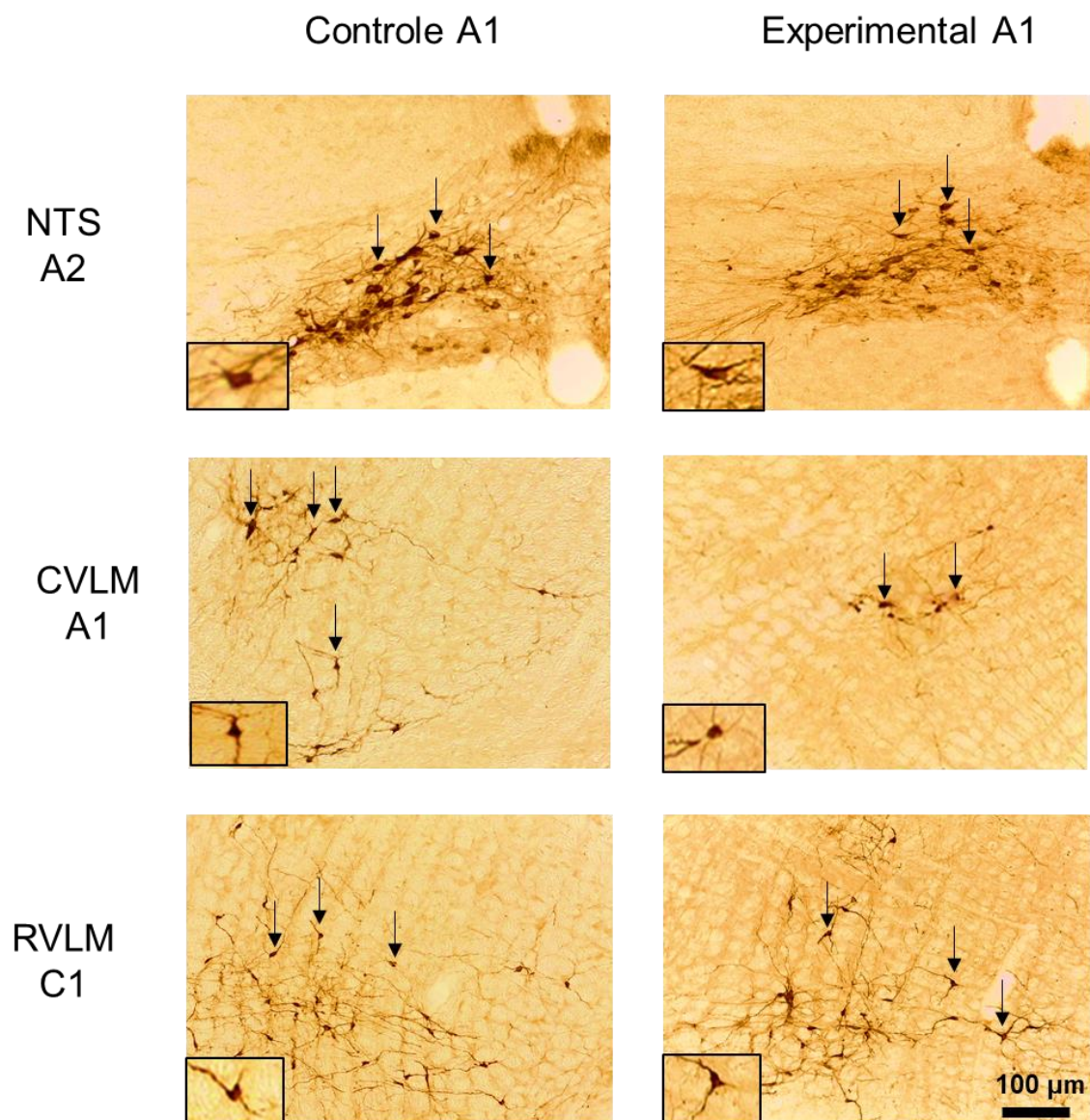


Figura 6. Fotomicrografia representativa dos cortes coronais do bulbo (40μm) marcados pela técnica de imunoistoquímica. As setas indicam a marcação dos neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamento neuronal A2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1) ou saporina-anti-DβH (Grupo experimental A1) na região CVLM. Escala = 100 μm.

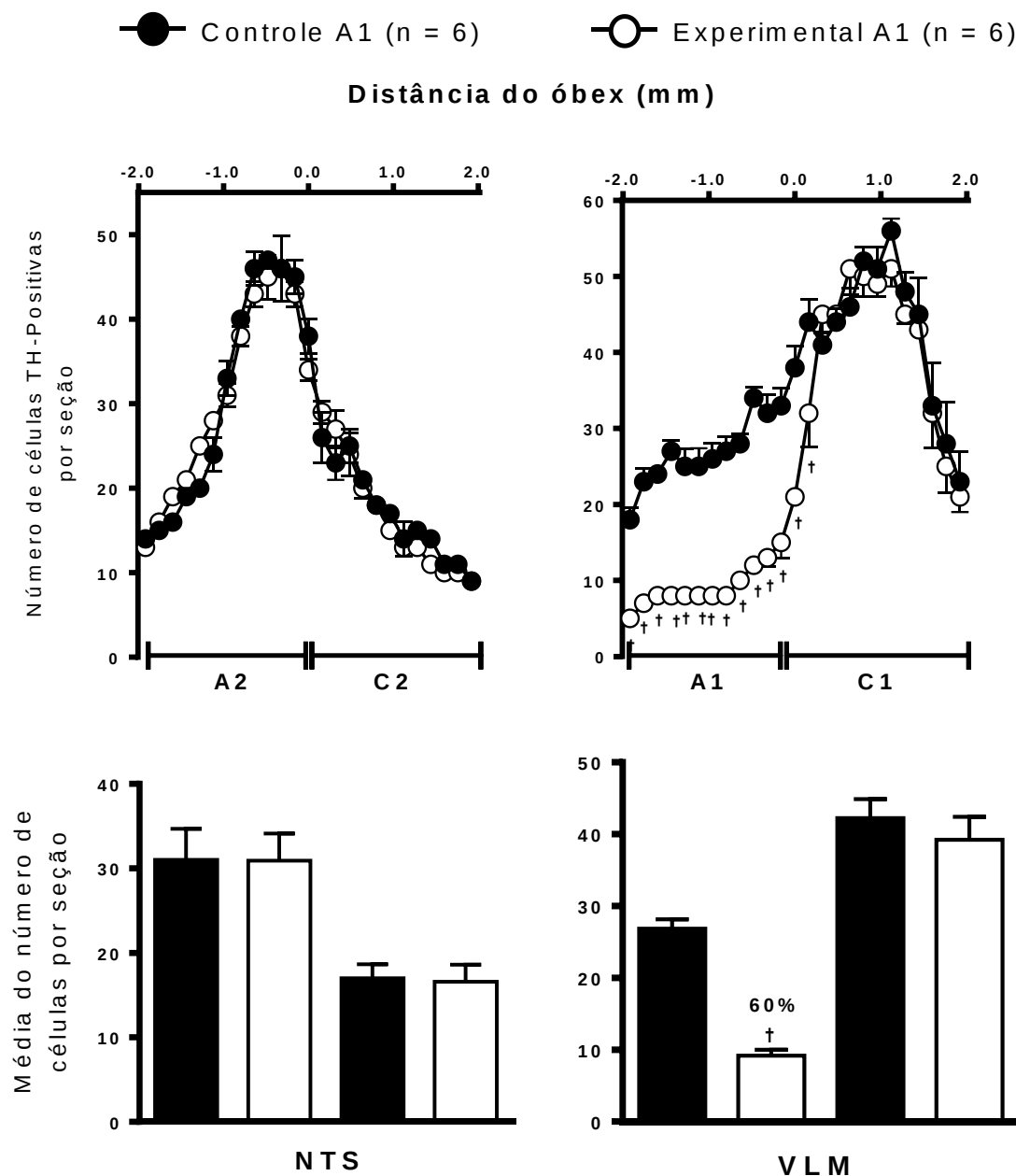


Figura 7. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) do número de neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamentos neuronais A2 e C2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1) na região CVLM. † diferente do controle; $p < 0,05$.

4.4. ANÁLISE DOS EFEITOS DA LESÃO DO GRUPAMENTO NEURONAL

A1 SOBRE A INFUSÃO DE SALINA HIPERTÔNICA APÓS A HEMORRAGIA HIPOTENSIVA

Os valores basais dos parâmetros cardiovasculares e o volume de sangue retirado para promover a HH foram similares nos animais dos grupos controle A1 e experimental A1 (Tabela 5).

Tabela 5. Valores basais dos parâmetros analisados nos animais do grupo Controle A1 e Experimental A1

Grupos	N	Massa Corporal (g)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	∫ANSR (u.a)	Volume de Sangue (mL)
Controle A1	6	319,6 ± 9,1	106,2 ± 4,4	419,4 ± 6,8	0,07 ± 0,02	3,7 ± 0,6
Experimental A1	6	320,4 ± 4,7	105,8 ± 4,5	429,7 ± 7,7	0,06 ± 0,01	4,0 ± 0,8

Média ± erro padrão da média (E.P.M) dos valores basais da massa corpórea (g), pressão arterial média (PAM- mmHg), frequência cardíaca (FC- bpm), integral da atividade simpática renal (∫ANSR- u.a) e volume sanguíneo (mL) retirado para promover a hemorragia hipotensiva (HH) nos animais do grupo controle A1 e Experimental A1.

As alterações promovidas durante a HH e após a infusão de salina hipertônica nos animais do grupo controle A1 e experimental A1 são esquematizadas no traçado representativo abaixo (Figura 8).

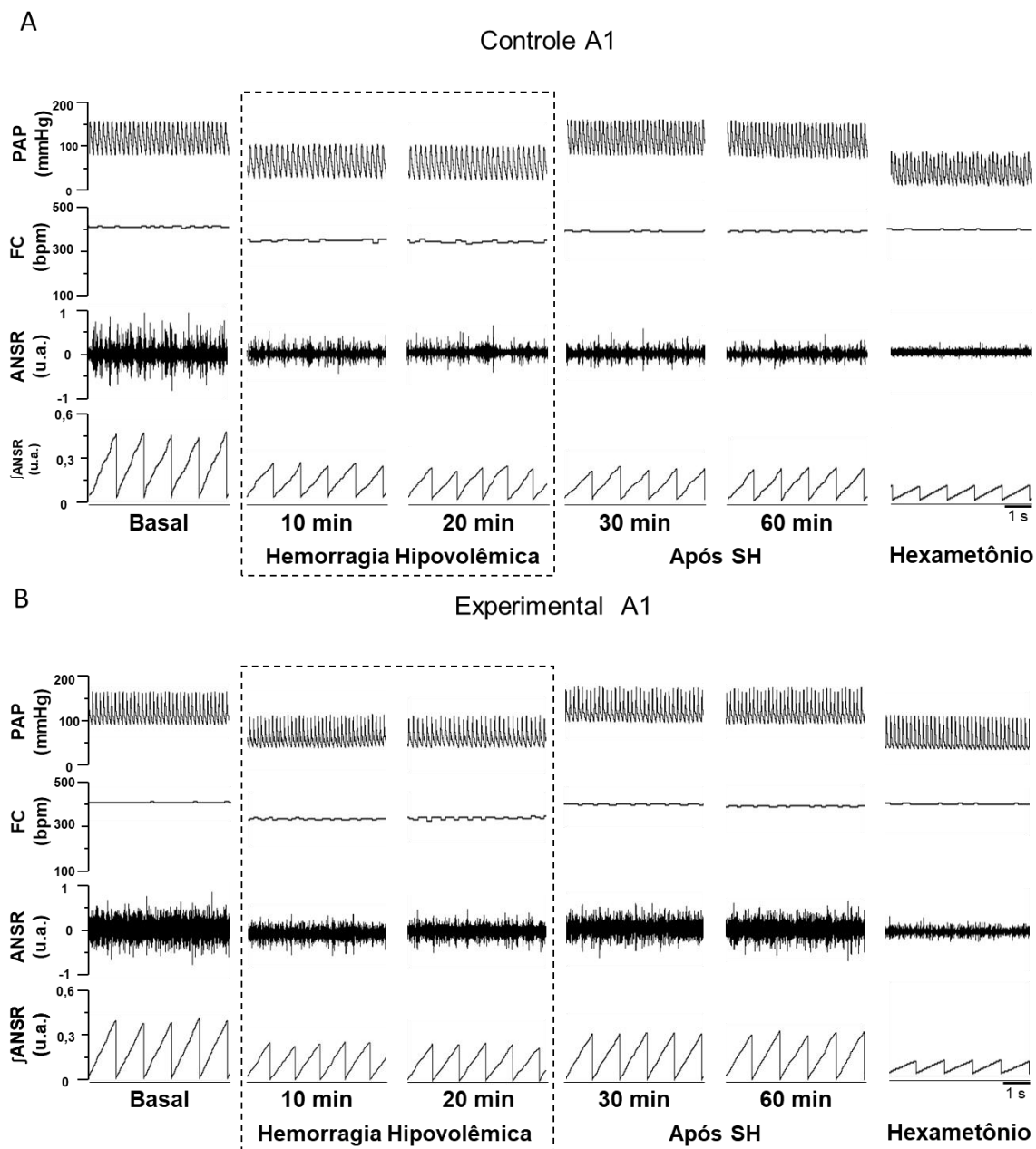


Figura 8. Traçado representativo das alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade nervosa simpática renal ($\int$ ANSR) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1) na região CVLM. Estão representados no traçado o período basal, 10 e 20 minutos de HH, 30 e 60 minutos após a infusão de SH e o período após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio.

A hipotensão gerada durante a HH foi semelhante entre grupos (Controle A1: de $106,2 \pm 4,4$ para $60,5 \pm 0,3$ mmHg; Experimental A1: de $105,8 \pm 4,4$ para $60,0 \pm 0,9$ mmHg, 20 min após início da HH; $p < 0,05$; Figura 9A). Após a sobrecarga de sódio a PAM foi restaurada a níveis basais de modo similar no grupo controle A1 e experimental A1, mantendo este padrão até o final dos experimentos (Controle A1: $105,8 \pm 4,9$ mmHg; Experimental A1: $97,4 \pm 6,6$ mmHg, 60 min após a infusão de SH; Figura 9A).

Ao final da HH houve bradicardia em ambos os grupos (Controle A1: de $419,4 \pm 6,8$ para $324,8 \pm 12,7$ bpm; Experimental A1: de $429,7 \pm 7,7$ para $367,9 \pm 20,3$ bpm, 20 min após início da HH; $p < 0,05$; Figura 9B). A infusão de salina hipertônica reestabeleceu a FC a valores basais nos grupos controle A1 e experimental A1 (Controle A1: $397,9 \pm 12,7$ bpm; Experimental A1: $418,4 \pm 7,0$ bpm, 60 min após a infusão de SH; Figura 9B).

A HH gerou simpatoinibição no leito renal em ambos os grupos (Controle A1: $\Delta -60,0 \pm 7,1$ %; Experimental A1: $\Delta -52,8 \pm 7,7$ %, 20 min após início da HH, em relação ao basal; $p < 0,05$; Figura 9C). Inicialmente, a sobrecarga de sódio não alterou a redução da ANSR observada durante a HH nos grupos controle A1 e experimental A1 (Controle A1: $\Delta -64,1 \pm 5,2$ %; Experimental A1: $\Delta -47,2 \pm 12,2$ %, 20 min após a infusão de SH, em relação ao basal; $p < 0,05$; Figura 9C). Entretanto, tardiamente, a simpatoinibição renal foi atenuada nos animais do grupo experimental A1, entretanto, não houve diferença entre grupos (Controle A1: $\Delta -50,2 \pm 3,3$ %; Experimental A1: $\Delta -23,9 \pm 11,8$ %, 60 min após a infusão de SH; Figura 9C).

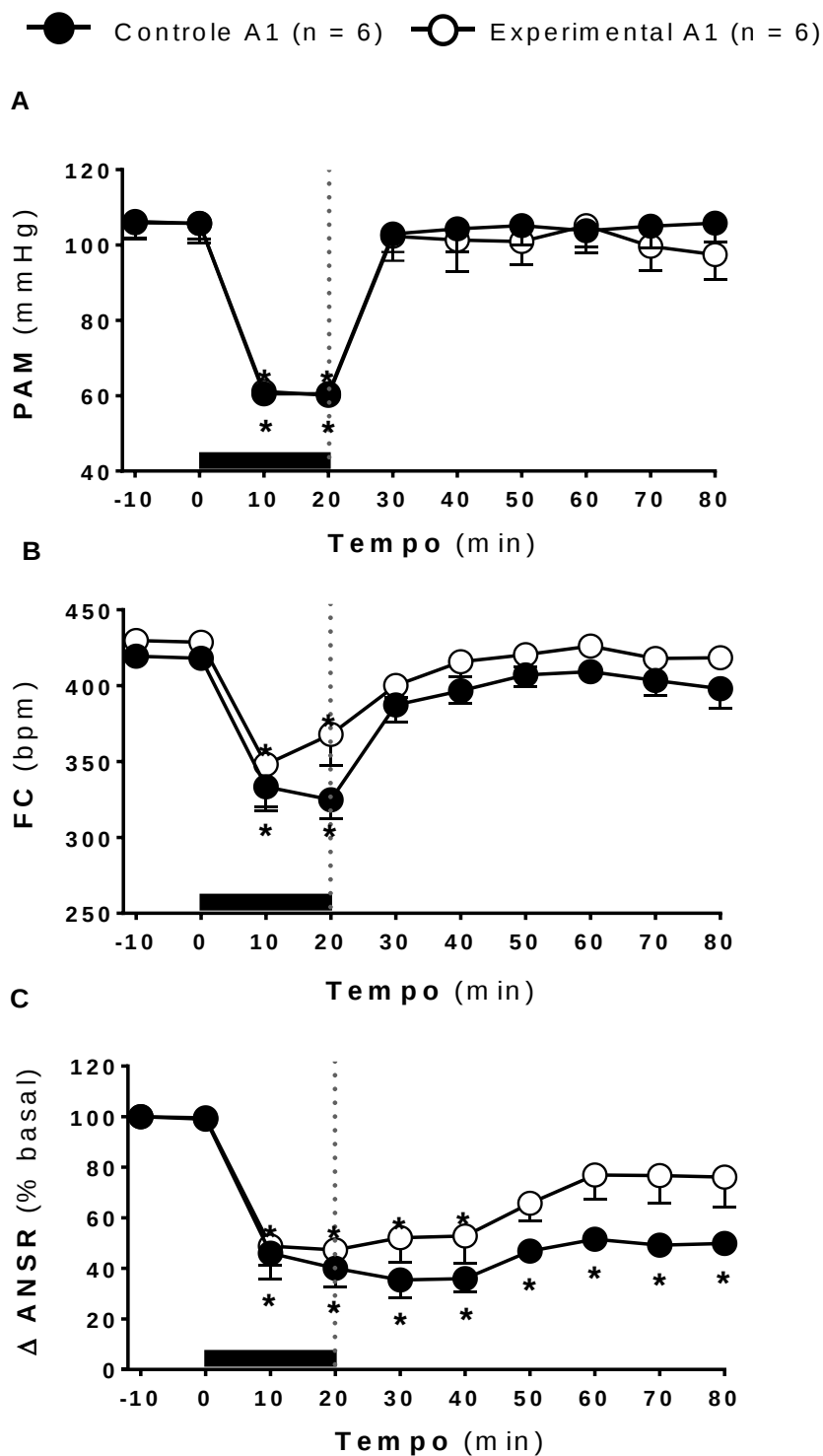


Figura 9. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) das alterações da pressão arterial média (PAM – A), frequência cardíaca (FC – B) e variação da atividade nervosa simpática renal (Δ ANSR – C) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1) na região CVLM. *Diferente do tempo 0; † diferente do controle; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de HH e a linha tracejada representa a infusão de SH.

4.5. ANÁLISE DA LESÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS A1 E A2 PELAS NANOINJEÇÕES DE SAPORINA-ANTI-D β H NA REGIÃO CVLM E NO NTS

A quantificação dos neurônios TH positivos demonstrou que os animais do grupo controle A1 + A2 (n=6), os quais receberam nanoinjeções de saporina na região CVLM e no NTS, apresentaram em média 28 células por seção na região CVLM que abrange o grupamento neuronal A1 e em média 30 células por seção na região do NTS que abrange o grupamento neuronal A2. Já nos animais do grupo experimental A1 + A2 (n=6), os quais receberam nanoinjeções de saporina-anti-D β H na região CVLM e no NTS, a média do número de células por seção na região CVLM foi reduzida para 11 e no NTS foi reduzida para 12. Assim, a redução percentual do número de neurônios A1 e A2 no grupo experimental foi de aproximadamente 59% e 61%, respectivamente, em comparação ao grupo controle A1 + A2 (figura 10 e 11).

As nanoinjeções de saporina-anti-D β H na região CVLM e no NTS não promoveram alterações significativas no número de células TH positivas na região do NTS que abrange o grupamento neuronal C2 (figura 10 e 11; 2% em relação ao grupo controle A1 + A2) e na região da VLM que abrange o grupamento neuronal C1 (figura 10 e 11; C1: 11% em relação ao grupo controle A1 + A2).

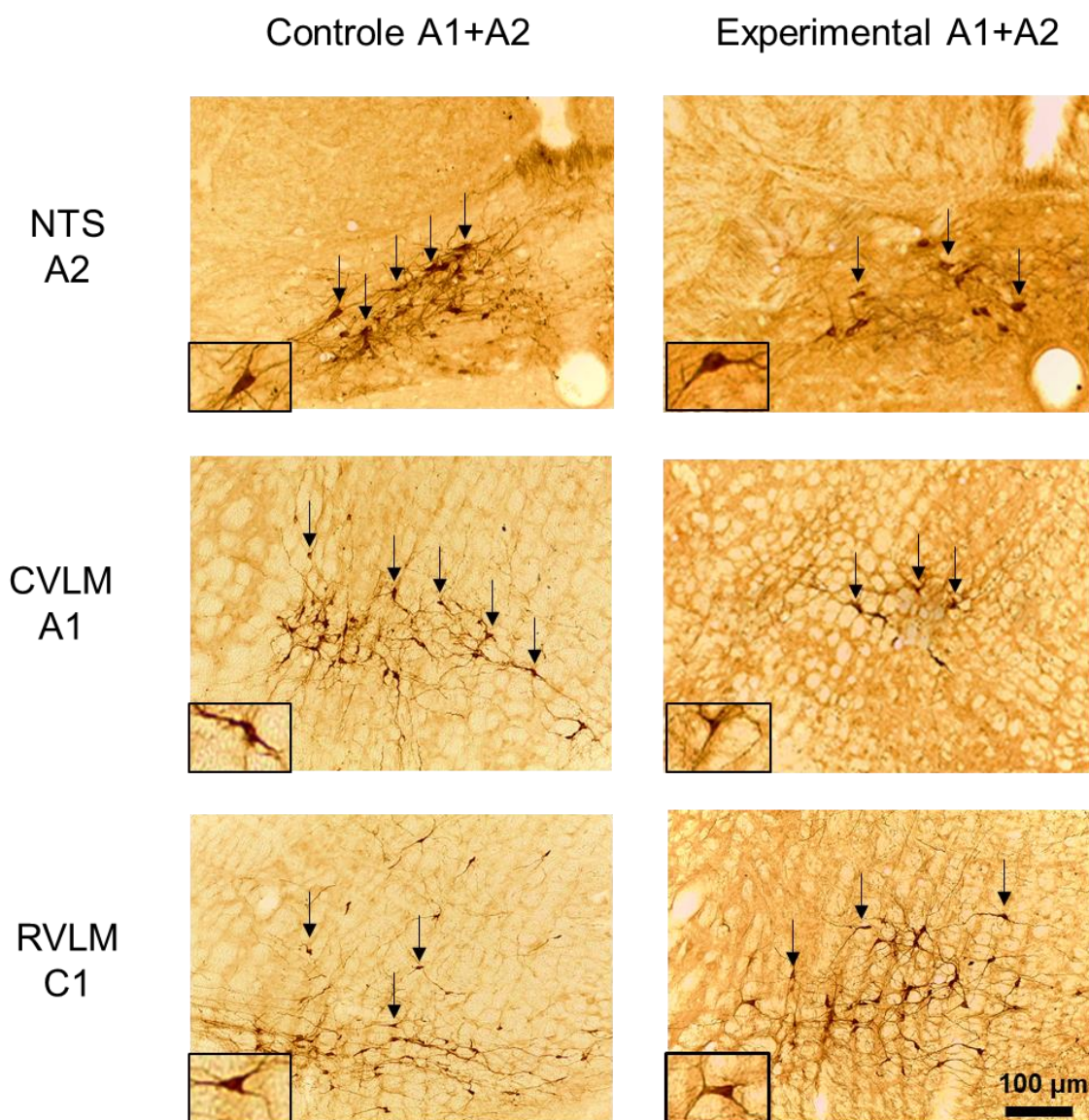


Figura 10. Fotomicrografia representativa dos cortes coronais do bulbo (40 μ m) marcados pela técnica de imunoistoquímica. As setas indicam a marcação dos neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamento neuronal A2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1+ A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1 + A2) na região CVLM e no NTS. Escala = 100 μ m.

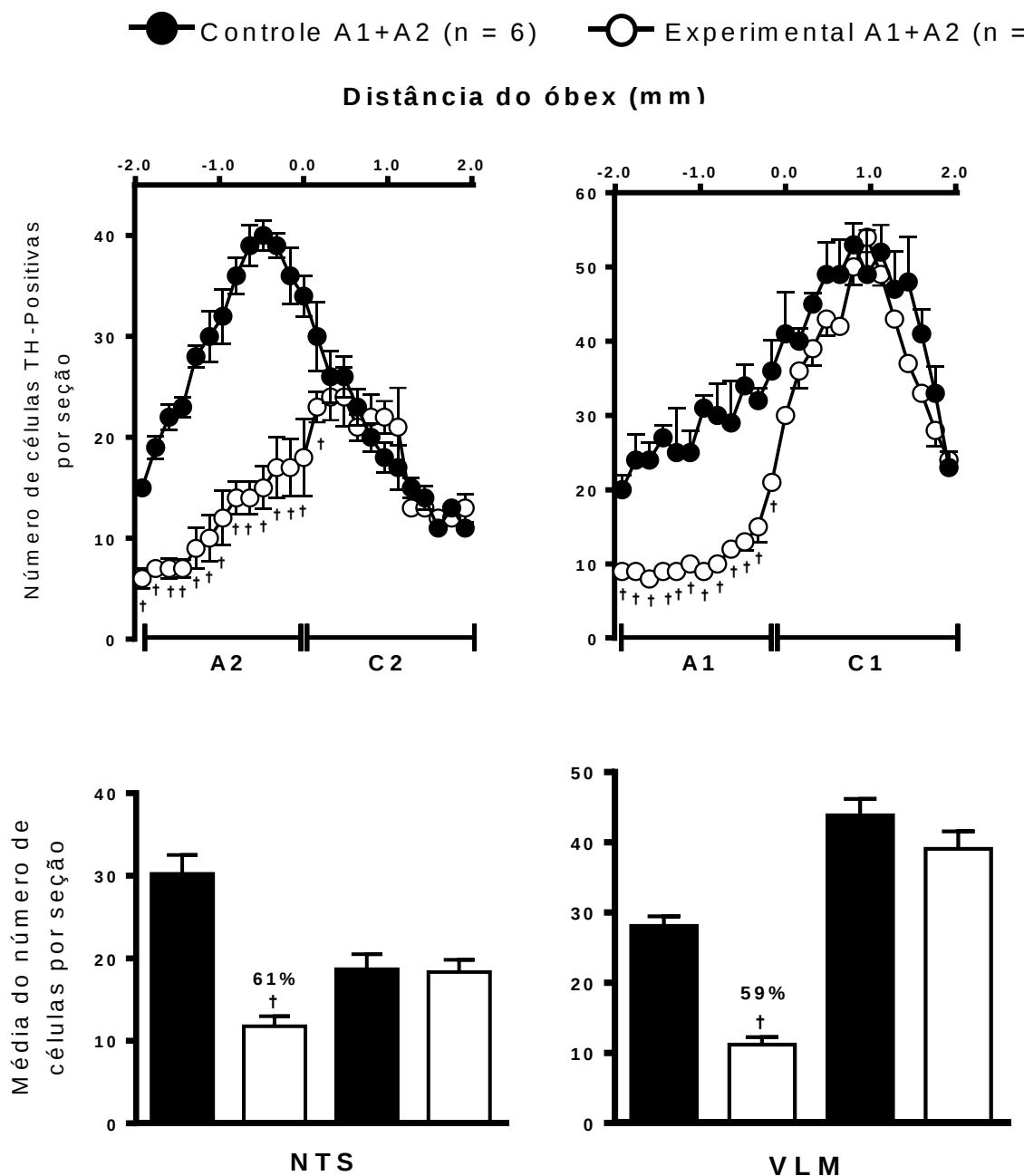


Figura 11. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) do número de neurônios tirosina hidroxilase positivos (TH +) no núcleo do tracto solitário (NTS – grupamentos neuronais A2 e C2), na região caudoventrolateral do bulbo (CVLM – grupamento neuronal A1) e rostroventrolateral do bulbo (RVLM – grupamento neuronal C1) dos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1 + A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1 + A2) na região CVLM e no NTS. † diferente do controle; $p < 0,05$.

4.6. ANÁLISE DOS EFEITOS DA LESÃO DOS GRUPAMENTOS NEURONAIS A1 E A2 SOBRE A INFUSÃO DE SALINA HIPERTÔNICA APÓS A HEMORRAGIA HIPOTENSIVA

Os valores basais dos parâmetros cardiovasculares e o volume de sangue retirado para promover a HH foram similares nos animais dos grupos controle A1 + A2 e experimental A1 + A2 (Tabela 6).

Tabela 6. Valores basais dos parâmetros analisados nos animais do grupo Controle A1 + A2 e Experimental A1 + A2

Grupos	N	Massa Corporal (g)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	∫ANSR (u.a)	Volume de Sangue (mL)
Controle A1 + A2	6	317,2 ± 6,1	111,2 ± 6,1	419,5 ± 12,6	0,10 ± 0,03	3,8 ± 0,5
Experimental A1 + A2	6	310,6 ± 8,5	106,6 ± 3,6	428,8 ± 8,4	0,07 ± 0,1	3,6 ± 0,9

Média ± erro padrão da média (E.P.M) dos valores basais da massa corpórea (g), pressão arterial média (PAM- mmHg), frequência cardíaca (FC- bpm), integral da atividade simpática renal (∫ANSR- u.a) e volume sanguíneo (mL) retirado para promover a hemorragia hipotensiva (HH) nos animais do grupo controle A1 + A2 e Experimental A1 + A2.

As alterações promovidas durante a HH e após a infusão de salina hipertônica nos animais do grupo controle A1 + A2 e experimental A1 + A2 são esquematizadas nos traçados representativos abaixo (Figura 12).

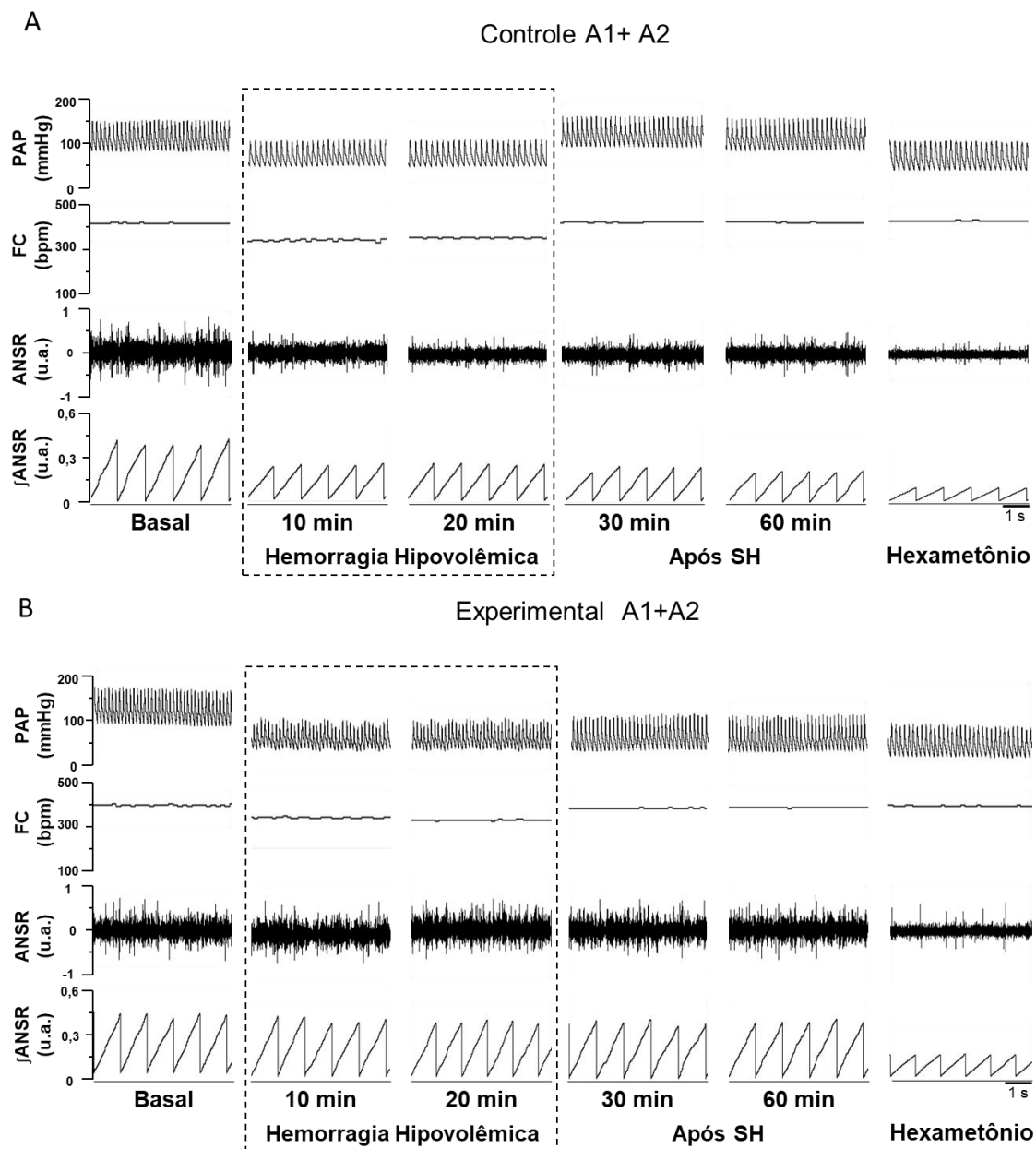


Figura 12. Traçado representativo das alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade nervosa simpática renal (JANSR) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1 + A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1 + A2) na região CVLM e no NTS. Estão representados no traçado o período basal, 10 e 20 minutos de HH, 30 e 60 minutos após a infusão de SH e o período após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio.

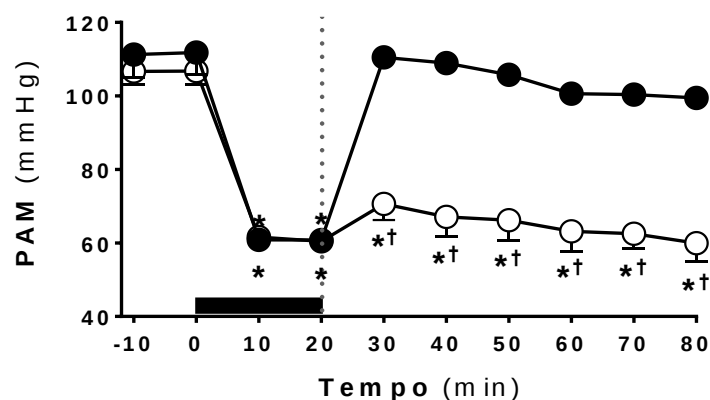
A redução da PAM promovida pela HH foi semelhante em ambos os grupos (Controle A1 + A2: de $111,2 \pm 6,19$ para $60,7 \pm 0,2$ mmHg; Experimental A1 + A2: de $106,6 \pm 3,6$ para $60,4 \pm 0,1$ mmHg, 20 min após início da HH; $p < 0,05$; Figura 13A). A infusão de salina hipertônica foi capaz de reestabelecer a PAM a níveis basais no grupo controle A1 + A2 (Controle A1 + A2: $99,4 \pm 1,7$ mmHg, 60 min após a infusão de SH; Figura 13A). Entretanto, diferente do grupo controle A1 + A2, após a sobrecarga de sódio os animais do grupo experimental A1 + A2 mantiveram a hipotensão gerada durante a HH e não apresentaram alteração neste parâmetro até o final do experimento (Experimental A1 + A2: $59,9 \pm 5,0$ mmHg, 60 min após a infusão de SH; $p < 0,05$; Figura 13A).

A resposta bradicárdica gerada durante a HH foi semelhante entre grupos (Controle A1 + A2: de $419,5 \pm 12,6$ para $325,5 \pm 21,5$ bpm; Experimental A1 + A2: de $428,8 \pm 8,4$ para $347,4 \pm 10,3$ bpm, 20 min após início da HH; $p < 0,05$; Figura 13B). De modo similar, a infusão de salina hipertônica restaurou a FC a níveis basais em ambos os grupos (Controle A1 + A2: $368,3 \pm 23,7$ bpm; Experimental A1 + A2: $385,1 \pm 9,1$ bpm, 60 min após a infusão de SH; Figura 13B).

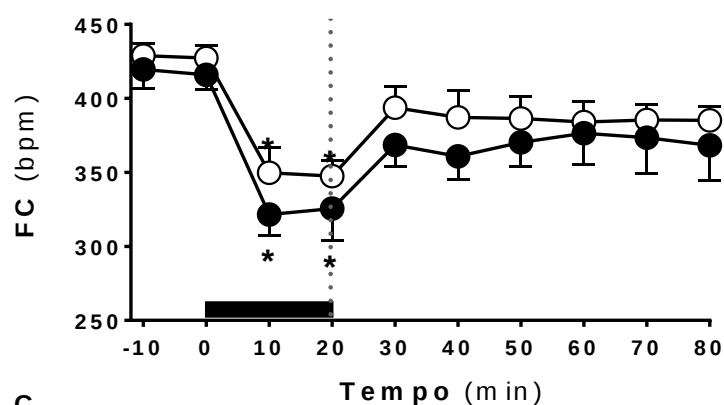
A HH provocou uma significativa simpatoinibição sobre o leito renal no grupo controle A1 + A2 (Controle A1 + A2: $\Delta -60,1 \pm 11,5$ %, 20 min após início da HH, em relação ao basal; $p < 0,05$; Figura 13C). Essa redução da ANSR não foi alterada pela sobrecarga de sódio (Controle A1 + A2: $\Delta -63,2 \pm 9,2$ %, 60 min após a infusão de SH, em relação ao basal; $p < 0,05$; Figura 13C). Entretanto, diferentemente do grupo controle A1 + A2, não houve alteração deste parâmetro no grupo experimental A1 + A2 durante a HH (Experimental A1 + A2: $\Delta -5,3 \pm 11,4$ %, 20 min após início da HH; Figura 13C) e após a sobrecarga de sódio (Experimental A1 + A2: $\Delta 4,6 \pm 11,1$ %, 60 min após a infusão de SH; Figura 13C).

● Controle A1+A2 (n = 6) ○ Experimental A1+A2 (n = 6)

A



B



C

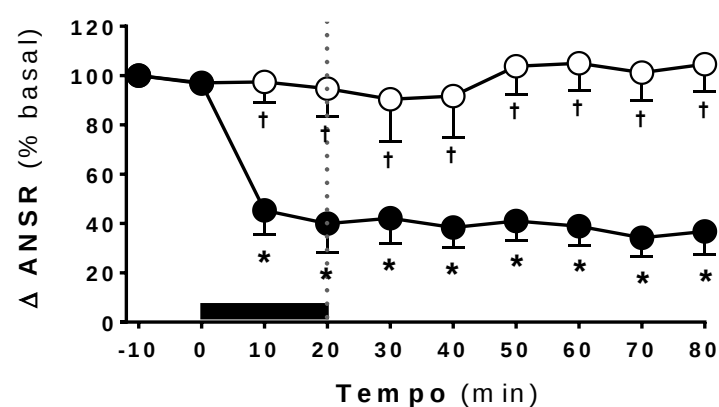


Figura 13. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) das alterações da pressão arterial média (PAM – A), frequência cardíaca (FC – B) e variação da atividade nervosa simpática renal (Δ ANSR – C) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de saporina (Grupo controle A1 + A2) ou saporina-anti-D β H (Grupo experimental A1 + A2) na região CVLM e no NTS. *Diferente do tempo 0; † diferente do controle; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de HH e a linha tracejada representa a infusão de SH.

4.7. ANÁLISE HISTOLÓGICA DAS NANOINJEÇÕES NO NÚCLEO MnPO

A análise histológica da propagação do corante Azul de Evans demonstrou que as nanoinjeções de soro fisiológico no grupo controle MnPO ou Muscimol no grupo experimental MnPO foram limitadas à região do núcleo MnPO (Figura 14). Assim, foram considerados para análise, exclusivamente os animais cujas nanoinjeções foram restritas a região do núcleo MnPO.

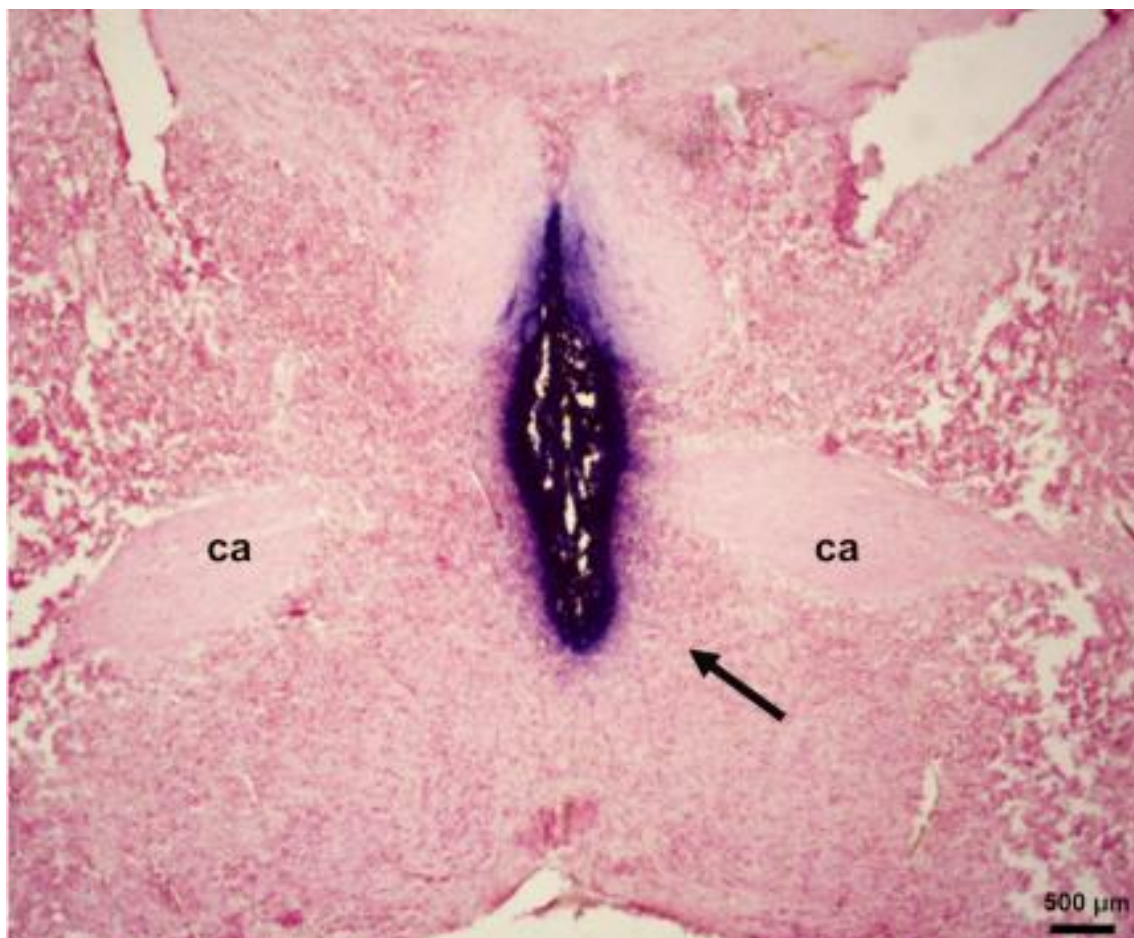


Figura 14. Fotomicrografia de uma seção coronal do hipotálamo (40µm) mostrando um sítio típico de nanoinjeção no núcleo pré-óptico mediano (MnPO). A seta indica a marcação do núcleo MnPO com corante azul de Evans 4%. ca: comissura anterior. Escala = 100 µm.

4.8. ANÁLISE DOS EFEITOS DA INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DO NÚCLEO MnPO SOBRE A INFUSÃO DE SALINA HIPERTÔNICA APÓS A HEMORRAGIA HIPOTENSIVA

Os valores basais dos parâmetros cardiovasculares e o volume de sangue retirado para promover a HH foram similares nos animais dos grupos controle e experimental (Tabela 7).

Tabela 7. Valores basais dos parâmetros analisados nos animais do grupo Controle MnPO e Experimental MnPO

Grupos	N	Massa Corporal (g)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	∫ANSR (u.a)	Volume de Sangue (mL)
Controle MnPO	6	325,9 ± 7,9	102,4 ± 3,7	416,0 ± 4,5	0,09 ± 0,01	3,6 ± 0,4
Experimental MnPO	6	318,6 ± 8,2	103,7 ± 4,7	429,3 ± 5,3	0,10 ± 0,02	3,4 ± 0,7

Média ± erro padrão da média (E.P.M) dos valores basais da massa corpórea (g), pressão arterial média (PAM- mmHg), frequência cardíaca (FC- bpm), integral da atividade simpática renal (∫ANSR- u.a) e volume sanguíneo (mL) retirado para promover a hemorragia hipotensiva (HH) nos animais do grupo controle MnPO e Experimental MnPO.

As alterações promovidas durante a HH e após a infusão de salina hipertônica nos animais do grupo controle MnPO e experimental MnPO são esquematizadas nos traçados representativos abaixo (Figura 15).

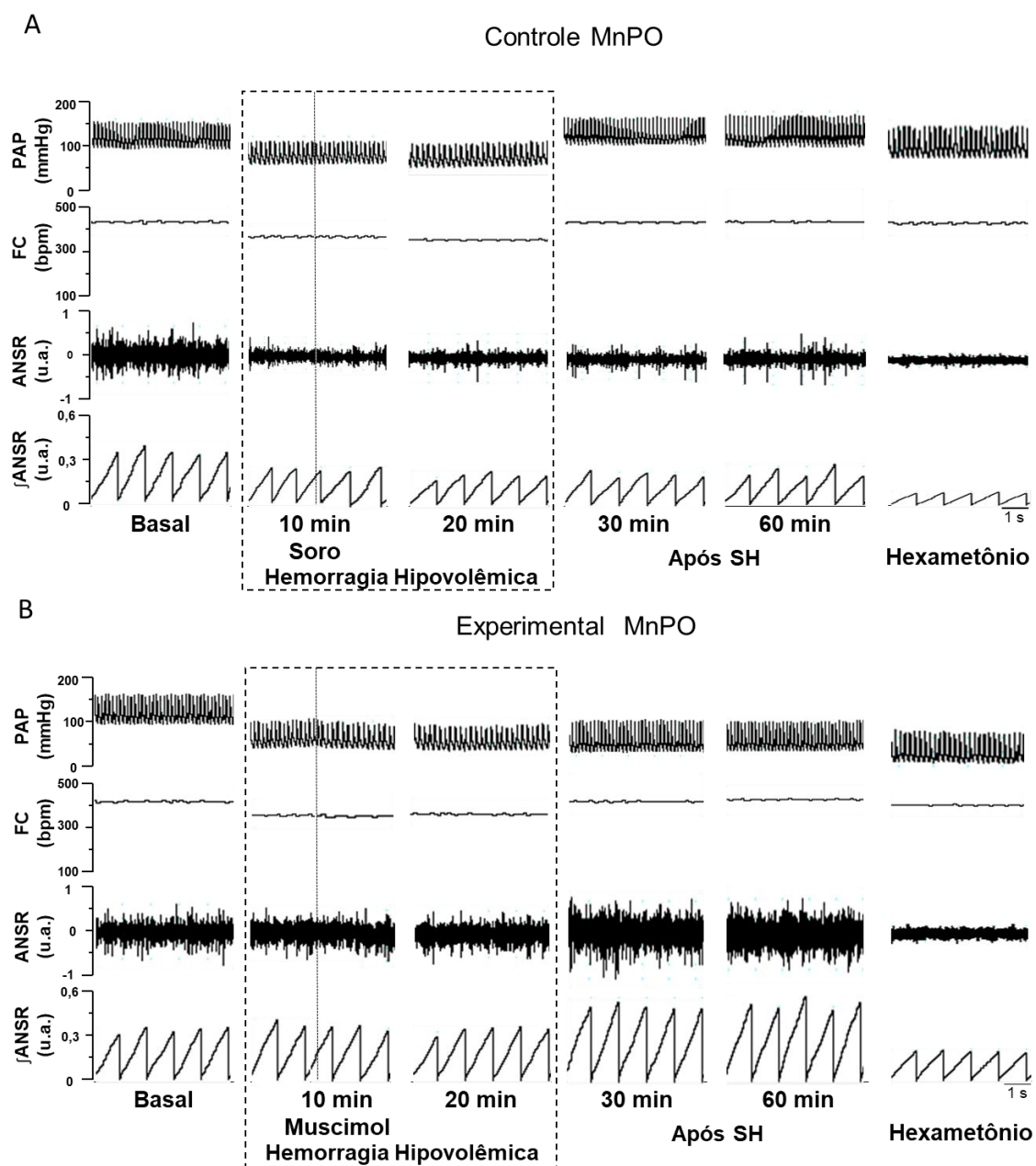


Figura 15. Traçado representativo das alterações da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), atividade nervosa simpática renal (ANSR) e integral da atividade nervosa simpática renal (JANSR) induzidas pela hemorragia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de soro fisiológico (Grupo controle MnPO) ou muscimol (Grupo experimental MnPO) no núcleo MnPO. Estão representados no traçado o período basal, 10 e 20 minutos de HH, 30 e 60 minutos após a infusão de SH e o período após a administração do bloqueador ganglionar hexametônio.

A hipotensão gerada pela HH foi semelhante nos grupos controle MnPO e experimental MnPO (Controle MnPO: de $102,5 \pm 3,4$ para $61,4 \pm 0,4$ mmHg; Experimental MnPO: de $103,1 \pm 4,3$ para $62,4 \pm 0,5$ mmHg, 10 min após início da HH; $p < 0,05$; Figura 16A). De modo similar, as nanoinjeções de soro fisiológico ou muscimol não alteraram a queda da PAM observadas em ambos os grupos durante a HH (Controle MnPO: $61,1 \pm 0,3$ mmHg vs. Experimental MnPO $60,9 \pm 0,4$ mmHg, 20 min após início da HH; Figura 16A). A sobrecarga de sódio reestabeleceu a PAM a níveis basais nos animais do grupo controle MnPO (Controle MnPO: $96,0 \pm 3,9$ mmHg, 60 min após a infusão de SH; Figura 16A). Entretanto, nos animais do grupo experimental MnPO, a infusão de SH não foi capaz de restaurar a PAM a níveis basais (Experimental MnPO: $62,7 \pm 5,0$ mmHg, 60 min após a infusão de SH; $p < 0,05$; Figura 16A), mantendo a hipotensão gerada durante a HH.

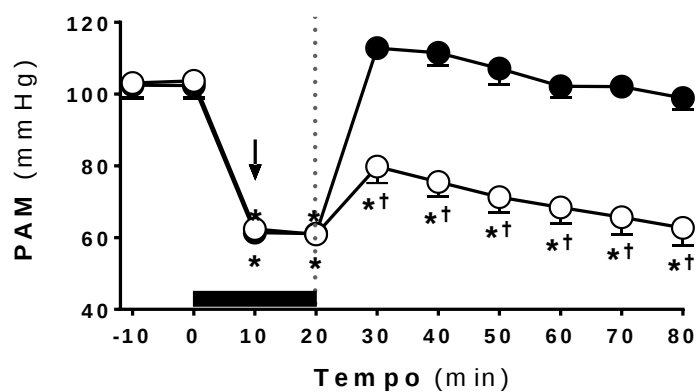
Bradicardia foi observada ao final da HH nos grupos controle MnPO e experimental MnPO (Controle MnPO: de $414,3 \pm 4,8$ para $371,4 \pm 13,1$ bpm; Experimental MnPO: de $427,4 \pm 5,3$ para $368,3 \pm 12,5$ bpm, 20 min após início da HH; $p < 0,05$; Figura 16B). As nanoinjeções de soro ou muscimol no MnPO não alteraram a FC (Controle MnPO: $371,4 \pm 13,1$ bpm vs. Experimental MnPO: $376,8 \pm 11,3$ bpm, 20 min após início da HH, em relação ao basal; Figura 16B). Em ambos grupos, a FC foi restaurada a níveis basais após a sobrecarga de sódio (Controle MnPO: $392,7 \pm 5,4$ bpm; Experimental MnPO: $405,4 \pm 7,9$ bpm, 60 min após a infusão de SH; Figura 16B).

Simpatoinibição renal foi gerada no grupo controle MnPO durante a HH (Controle MnPO: $\Delta -39,2 \pm 4,3$ %, 20 min após início da HH, em relação ao basal; $p < 0,05$; Figura 16C). Diferentemente, no grupo experimental MnPO não houve alteração da ANSR durante a HH (Experimental MnPO: $-12,3 \pm 5,2$ %, 10 min após início da HH; Figura 16C). Estes padrões não foram alterados pelas nanoinjeções de soro ou muscimol no núcleo MnPO (Controle MnPO: $\Delta -42, \pm 7,2$ % vs. Experimental MnPO: $\Delta 9,3 \pm 5,6$ %, 20 min após início da HH; Figura 16C). A redução da atividade simpática provocada no território renal nos animais do grupo controle MnPO foi mantida após a infusão de SH (Controle MnPO: $\Delta -45,3 \pm 7,8$ %, 60 min após a infusão de SH, em relação ao controle; $p < 0,05$; Figura 16C). Diferentemente, a sobrecarga de sódio promoveu forte

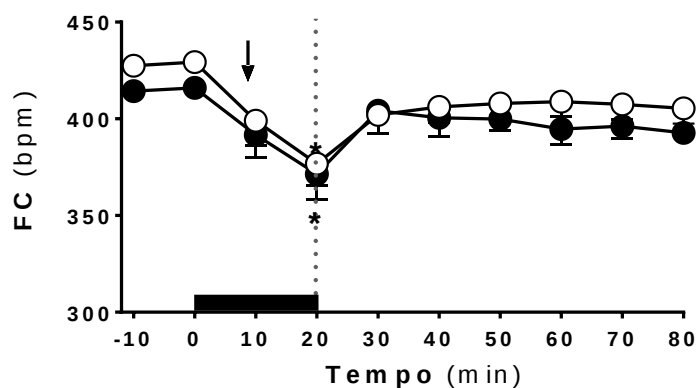
simpatoexcitação renal no grupo experimental MnPO (Experimental MnPO: $\Delta 48,0 \pm 10,8 \%$, 60 min após a infusão de SH, em relação ao controle; $p < 0,05$; Figura 16C), apresentando diferença significativa entre grupos.

● Controle MnPO (n=6) ○ Experimental MnPO (n=6)

A



B



C

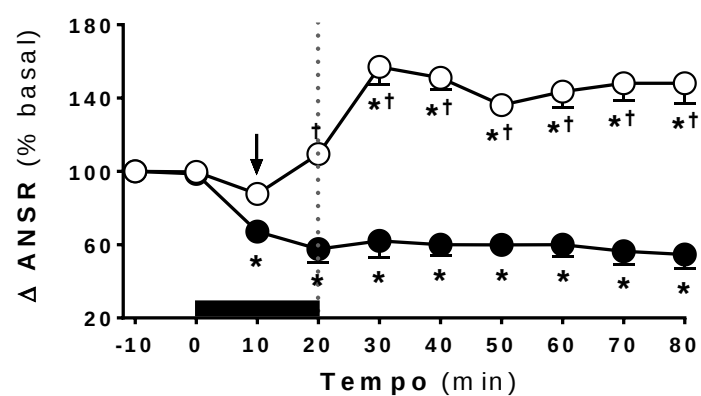


Figura 16. Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) das alterações da pressão arterial média (PAM – A), frequência cardíaca (FC – B) e variação da atividade nervosa simpática renal (Δ ANSR – C) induzidas pela hemorrhagia hipotensiva (HH) e pela infusão de salina hipertônica (SH) nos animais que receberam nanoinjeções de soro fisiológico (Grupo controle MnPO) ou muscimol (Grupo experimental MnPO) no núcleo MnPO. *Diferente do tempo 0; † diferente do controle; $p < 0.05$. A barra preta representa o período de HH, a linha tracejada representa a infusão de SH e a seta indica a nanoinjeção no núcleo MnPO.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com a hipótese que os neurônios dos grupamentos neuronais A1, A2 e o núcleo MnPO participam das vias e mecanismos centrais que regulam as respostas reflexas a sobrecarga de sódio durante a hipovolemia. Especificamente foi demonstrado que: I. A HH promoveu hipotensão, bradicardia e simpatoinibição no território renal nos ratos controles; II. A infusão de solução SH após a HH reestabeleceu a PAM, FC e manteve a simpatoinibição renal nos ratos do grupo controle; III. A lesão seletiva e específica dos neurônios A1 ou A2 não alterou os padrões das respostas cardiovasculares e autonômicas observadas durante a HH ou após a infusão de solução SH; IV. A lesão simultânea dos neurônios A1 e A2 não alterou as respostas cardiovasculares a HH, entretanto aboliu a simpatoinibição renal; V. A lesão simultânea dos neurônios A1 e A2 aboliu a recuperação da PAM e a manutenção da redução da ANSR após a infusão de solução SH; VI. A inibição do núcleo MnPO não alterou as respostas cardiovasculares durante a HH, entretanto aboliu a simpatoinibição renal; VII. A inibição do núcleo MnPO aboliu a restauração da PAM e promoveu forte simpatoexcitação para o território renal após a infusão de solução SH.

Estudos anteriores realizados em nosso laboratório demonstraram que a retirada de aproximadamente 15 – 25% do volume sanguíneo total é capaz de promover a HH e manter a PAM em aproximadamente 60 mmHg (28). Os resultados do presente estudo, utilizando protocolo semelhante, confirmaram estes achados anteriores. De fato, foi demonstrado que a retirada de volume sanguíneo é capaz de promover efetivamente um estado de hipovolemia.

Estudos demonstram que a rápida retirada de volume sanguíneo ocorrida durante a HH propicia a redução do retorno venoso, da FC e do débito cardíaco, contribuindo para queda abrupta da pressão arterial (44,64). Estudos mostram ainda que a HH promove uma resposta bifásica da ANSR (65). Inicialmente observa-se uma simpatoexcitação renal mediada pela ativação de barorreceptores arteriais, seguida de uma sustentada simpatoinibição renal mediada por aferentes cardiopulmonares vagais. Consistentes com estes

achados, estudos anteriores já mostraram que uma queda abrupta no volume de sangue pode promover a retirada da unidade vasoconstritora simpática (66).

Nossos resultados mostraram que a HH promove hipotensão, bradicardia e redução da ANSR. Desta forma, sugere-se que a queda da PAM promovida pela hipovolemia é, pelo menos em parte, devido à queda da FC e consequentemente do débito cardíaco. Somado a este fator, a redução da ANSR pode sugerir uma redução da resistência vascular no território renal e consequentemente conduzir a uma diminuição da resistência vascular periférica total, colaborando para a hipotensão observada. De fato, o sistema nervoso autônomo é capaz de controlar o débito cardíaco e resistência vascular (67). Assim, reduções na atividade simpática para um determinado leito e no débito cardíaco podem resultar em quedas na pressão arterial. Não é possível descartar ainda a influência do componente autonômico simpático sobre outros territórios não avaliados no presente estudo.

A melhora cardiovascular e hemodinâmica promovida pela sobrecarga de cloreto de sódio após a hipovolemia já foi consolidada em diversos estudos (28,44). Reafirmando esses achados, nossos dados mostraram que a infusão de solução SH nos animais dos grupos controle foi capaz de reestabelecer a PAM e FC. Destacando a influência do componente autonômico nas respostas a hiperosmolaridade, a simpatoinibição gerada no território renal durante a HH manteve-se após a sobrecarga de sódio. Esses dados estão de acordo com estudos de diversos autores os quais mostraram que elevações na concentração plasmática de sódio promovem reduções na atividade simpática no território renal, desencadeando mecanismos natriuréticos como a vasodilatação renal (39,68–70).

Estudos anteriores do nosso grupo de pesquisa mostraram que a infusão de solução SH não altera o volume plasmático (28), sugerindo que a sobrecarga de sódio nessas condições não promove expansão do volume plasmático. Assim, pode-se afirmar que a recuperação cardiovascular induzida pela hiperosmolaridade não pode ser explicada pela reposição do volume. Evidências experimentais sugerem que mecanismos mediados por componentes centrais são desencadeados após aumentos agudos da concentração plasmática de sódio (37). Estudos apontam ainda que, sob condições hipovolêmicas, os

aferentes aórticos e carotídeos, quimiorreceptores e barorreceptores, estão envolvidos na recuperação cardiovascular induzida pela infusão de solução SH (44). Estes relatos conduzem à ideia que áreas e estruturas do SNC participam das respostas reflexas a sobrecarga de sódio durante a HH.

Pela primeira vez na literatura, evidenciamos que a lesão simultânea dos grupamentos neuronais A1 e A2 ou a inibição do núcleo MnPO impede a restauração da PAM e altera a simpatoinibição renal induzida pela infusão de solução SH após a hipovolemia. Esses dados confirmam a presença de um componente neuronal na regulação dessa resposta reflexa. Desse modo, a integridade dos grupamentos neuronais A1, A2 e do núcleo MnPO parece ser fundamental para a conexão dos aferentes periféricos a núcleos e estruturas centrais responsáveis pela geração de respostas cardiovasculares e autonômicas promovidas por aumentos na osmolaridade plasmática durante a HH (Figura 17).

As informações a respeito de volume e composição do líquido circulante chegam ao SNC via fibras aferentes provenientes de sensores periféricos como, quimiorreceptores, barorreceptores, receptores cardiopulmonares, e osmorreceptores periféricos (67). Esses receptores são sensíveis a alterações da pressão parcial de O₂, CO₂ e pH (quimiorreceptores), estiramento dos vasos (barorreceptores), da câmara cardíaca (receptores cardiopulmonares) e mudanças na osmolaridade plasmática (osmorreceptores periféricos) (45), respectivamente. Essas informações chegam também ao SNC por meio de receptores centrais que identificam alterações na concentração plasmática de sódio e angiotensina II (presentes nos órgãos circuventriculares, como o OVLT, o Órgão Subfornicial - SFO e a Área Postrema – AP) (71).

No NTS essas fibras aferentes realizam a primeira sinapse e desencadeiam uma série conexões no SNC (72). Do NTS, neurônios do grupamento A2 projetam-se diretamente e indiretamente, via grupamento neuronal A1, para o núcleo MnPO (46–48). Densas projeções do núcleo MnPO são enviadas para o núcleo PVN, um núcleo hipotalâmico que regula as respostas humorais, pela secreção de vasopressina e ocitocina, e autonômicas, pelas projeções para os neurônios pré-ganglionares simpáticos, à

hiperosmolaridade (55,56). Estudos demonstram que o núcleo PVN regula as respostas autonômicas por meio de suas projeções para a coluna intermediolateral (IML) e para a região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), onde estão localizados os neurônios pré-ganglionares simpáticos e os neurônios pré-motores simpáticos, respectivamente (55,67). Desta forma, a integração dessa extensa rede neuronal culmina em reflexos autonômicos, hemodinâmicos e endócrinos a fim de manter a homeostase corporal em resposta a estímulos osmóticos e volêmicos (68,70) (Figura 17).

Dentro deste circuito neuronal, destacam-se os neurônios dos grupamentos noradrenérgicos A1 e A2. A ativação desses grupamentos por hiperosmolaridade os caracteriza como componentes fundamentais dos circuitos centrais que estão envolvidos na osmorregulação e na regulação cardiovascular (51,73). Recentemente, foi relatado que o grupamento neuronal A1 está envolvido nas vias neurais excitatórias que regulam as respostas hipertensivas e natriuréticas em decorrência de alterações agudas na composição dos fluidos corporais (62). Investigações sugerem ainda que a lesão dos grupamentos neuronais A1 ou A2 abole as respostas cardiovasculares e autonômicas induzidas pela sobrecarga de sódio em ratos normovolêmicos anestesiados (58,60). Ademais, as respostas cardiovasculares à gavagem de salina hipertônica (2M) são potencializadas pela lesão do grupamento A2 em animais não anestesiados (74). Essas evidências experimentais destacam a importância desses neurônios nas vias de transmissão de informações a respeito da osmolaridade plasmática.

No presente estudo, através da lesão neuronal farmacológica, avaliamos a relevância dos grupamentos neuronais A1 e A2 nas respostas a hiperosmolaridade após a HH. Nanoinjeções de saporina-anti-D β H foram realizadas para promover a lesão farmacológica. A saporina é uma proteína de inativação de ribossomal capaz de bloquear a subunidade ribossomal 60S e inibir a síntese de proteínas, promovendo assim a morte celular (75,76). Devido ao seu alto peso molecular, a saporina é conjugada ao anticorpo monoclonal contra a enzima dopamina- β -hidroxilase (D β H), formando o complexo saporina-anti-D β H, que é capaz de ser internalizado e provocar lesões específicas.

A alta especificidade da lesão neuronal, aliada com a preservação das fibras de passagem, constituem a grande vantagem desta técnica quando comparada a técnica de lesão eletrolítica para verificação de uma determinada função de regiões encefálicas (77). Classicamente, o complexo saporina-anti-D β H é capaz de lesionar células adrenérgica/noradrenérgicas pela internalização da toxina por meio de um sistema de transporte retrógrado, atingindo o corpo celular das células que se projetam para a região na qual a toxina foi injetada (76). Durante a excitotoxicidade somatodendrítica de neurônios catecolaminérgicos, ocorre a exposição na fenda sináptica da enzima D β H e a possível ligação do anticorpo monoclonal anti-D β H que permite a internalização do complexo através do corpo celular ou dendritos. Assim, somente células que contém a enzima D β H podem absorver a toxina acoplada ao anticorpo, ocasionando lesões específicas. Entretanto, trabalhos demonstraram que essa toxina é capaz de provocar lesões eficientes e satisfatórias em neurônios localizados no próprio sítio de nanoinjeção (78,79). Esses trabalhos sugerem que a liberação parácrina de noradrenalina nas terminações dendríticas pode resultar na exposição da enzima D β H e assim a promover a internalização do complexo. De fato, nossos resultados corroboram com as evidências anteriores.

Relatos indicam que a redução da imunorreatividade é um indicativo de morte neuronal (62,80). Através da técnica de imunoistoquímica demonstramos que a lesão dos grupamentos neuronais A1 e/ou A2 foi restrita a essas regiões. Assim, pode se inferir que os resultados obtidos no presente estudo são devido à lesão específica destes grupamentos e não a outros grupos celulares. Prévios estudos mostraram que a lesão de apenas 62 % dos neurônios A1 na região CVLM foi eficiente para abolir a queda na ANSR induzida pela sobrecarga de sódio em animais normovolêmicos (58). Esses resultados sugerem que reduções não tão extensas no número de neurônios são suficientes para gerar respostas fisiológicas significativas e reprodutíveis, apoiando os resultados encontrados no presente trabalho.

Demonstramos que a lesão específica dos neurônios A1 ou A2 não alterou as respostas cardiovasculares e autonômicas promovidas pela sobrecarga de sódio após a hipovolemia. Entretanto não podemos descartar que o SNC trabalha com vias paralelas para regular uma mesma função. Nesse sentido,

estudos prévios mostraram que a lesão concomitante, e não a lesão individual, da região AV3V e do núcleo do tracto solitário comissural (commNTS) reduz cronicamente a PAM em ratos espontaneamente hipertensos (81). Essas investigações apoiam a hipótese que componentes neuronais podem suprir uma resposta específica caso outro componente seja prejudicado.

Nesse sentido, a lesão conjunta dos grupamentos neuronais A1 e A2 poderia causar a perda completa dos mecanismos compensatórios. Testando este modelo conceitual, mostramos que a lesão concomitante desses grupamentos abole esse possível mecanismo compensatório, impedindo a restauração da PAM e a manutenção da redução ANSR promovida pela infusão de solução SH após a HH. Entretanto, esses neurônios não parecem estar diretamente envolvidos nas respostas relacionadas a FC, visto que a lesão neuronal concomitante não alterou a restauração da FC promovida pela sobrecarga de sódio após a HH. Salientando que os neurônios dos grupamentos A1 e A2 possuem a mesma origem embriológica, projeções similares para regiões hipotalâmicas e respondem de modo semelhante frente a estímulos hiperosmóticos, pode-se considerar esses grupamentos como vias paralelas de ação. Assim, a perda de parte de uma via pode ser suprida através da ativação ou super ativação da via paralela. Efetivamente os resultados mostraram que a retirada de parte dessas duas vias paralelas impediu o reestabelecimento da pressão arterial e a simpatoinibição renal induzida por solução SH após a hipovolemia.

Uma vez determinado que os neurônios do grupamento A1 e A2 são partes fundamentais na integração das informações e nos ajustes cardiovasculares e autonômicos promovidos pela sobrecarga de sódio após a HH, decidimos investigar a possível via por onde essas informações percorreriam. Considerando as densas projeções dos grupamentos neuronais A1 e A2 para o núcleo MnPO, apontamos este núcleo como potencial constituinte destas vias.

Destacando a importância do núcleo MnPO como centro de integração, estudos prévios demonstram que densas projeções excitatórias, em maioria de natureza glutamatérgica, de osmorreceptores centrais para o núcleo MnPO

(54,82). Dentre essas projeções, ressalta-se projeções provenientes do OVLT e o SFO, regiões do SNC capazes de detectar mudanças na osmolaridade plasmática, como as alterações promovidas por oscilações na concentração plasmática de sódio (54,83,84). De fato, aumentos na frequência de deflagração de potenciais de ação dos neurônios do núcleo MnPO já foram observadas em resposta à estimulação elétrica do SFO (85).

O papel do núcleo MnPO como centro de controle do equilíbrio eletrolítico já está bem estabelecido. Estudos evidenciaram o papel essencial deste núcleo no controle da liberação de hormônios, como a vasopressina, da atividade simpática e dos comportamentos relacionados com sede e o apetite ao sal (54–56). Além do mais, estudos anteriores do nosso grupo evidenciaram que a inibição farmacológica desse núcleo provoca reduções da PAM e simpatoinibição renal, indicando o envolvimento do núcleo MnPO na regulação tônica da pressão arterial e da ANSR (86,87).

Todos esses dados sumarizam e consolidam o núcleo MnPO como centro regulatório, participando do controle cardiovascular e da manutenção da homeostase dos fluidos corporais. Ademais, estudo prévio realizado em nosso laboratório mostrou o envolvimento deste núcleo nas respostas cardiovasculares promovidas pela sobrecarga de sódio após a hipovolemia (28). Neste estudo, evidenciamos que a inibição farmacológica do núcleo MnPO inibiu a recuperação da PAM induzida por solução SH em ratos submetidos à hemorragia. Entretanto, a influência do componente autonômico sobre essas respostas ainda não havia sido avaliada.

Os resultados do presente estudo corroboram com os achados anteriores, uma vez que a inibição farmacológica do núcleo MnPO aboliu a restauração da PAM induzida pela sobrecarga de cloreto de sódio após a HH. Reafirma-se assim a importância deste núcleo na ressuscitação cardiovascular induzida por aumentos na osmolaridade plasmática em quadros de hipovolemia. Ainda, evidenciamos que o núcleo MnPO não está diretamente envolvido nas respostas relacionadas a FC, visto que a inibição deste núcleo não alterou a restauração da FC promovida pela sobrecarga de sódio. Por fim, demonstramos pela primeira vez na literatura, que o bloqueio do núcleo MnPO foi capaz promover

simpatoexcitação no território renal após a infusão de solução SH. Esses dados estão em concordância com estudos anteriores onde a inibição do núcleo MnPO aboliu a vasodilatação renal induzida por aumentos na osmolaridade plasmática (28,59). De fato, é conhecido que a estimulação simpática renal promove aumento da resistência vascular renal (88). Esses novos dados, sugerem que o núcleo MnPO está envolvido não apenas nas respostas cardiovasculares, mas também nas respostas autonômicas para o leito renal promovidas pela infusão de solução SH após a hipovolemia. Entretanto, a contribuição do componente autonômico sobre outros territórios vasculares ainda deve ser investigada.

Cabe ressaltar ainda que não avaliamos o envolvimento dos grupamentos neuronais A1, A2 e do núcleo MnPO nas respostas humorais envolvidas na ressuscitação do quadro de hipovolemia promovida pela sobrecarga de sódio. Lesões do grupamento neuronal A1 reduziram significativamente a ativação de células parvocelulares do PVN e a secreção de vasopressina e oxitocina induzida por hemorragia (89). Além do mais, estudos mostraram que lesões no núcleo MnPO atenuaram a secreção de vasopressina pela neuro-hipófise em resposta a hiperosmolaridade (90,91). Esses relatos enfatizam a importância do componente humoral e sugerem a possível importância de componente humoral para o restabelecimento da pressão arterial induzida por solução SH em ratos submetidos à HH.

Em conjunto, os resultados obtidos no presente estudo fortalecem a hipótese que os neurônios dos grupamentos A1, A2 e o núcleo MnPO fazem parte dos circuitos de integração e transmissão de informações a respeito de mudanças na osmolaridade plasmática, modulando assim as respostas cardiovasculares e autonômicas induzidas pela sobrecarga de sódio após a hipovolemia. De fato, mostramos que a integridade dos grupamentos neuronais A1, A2 e do núcleo MnPO parece ser importante à simpatoinibição renal durante a HH, bem como às respostas cardiovasculares induzidas pela infusão intravenosa de SH após a HH. Assim, considerando que a ativação por aumentos da osmolaridade plasmática dos grupamentos A1, A2 e do núcleo MnPO é essencial para recuperação cardiovascular e autonômica, disfunções nessas regiões poderiam prejudicar a recuperação cardiovascular induzida pela infusão de solução SH após a HH.

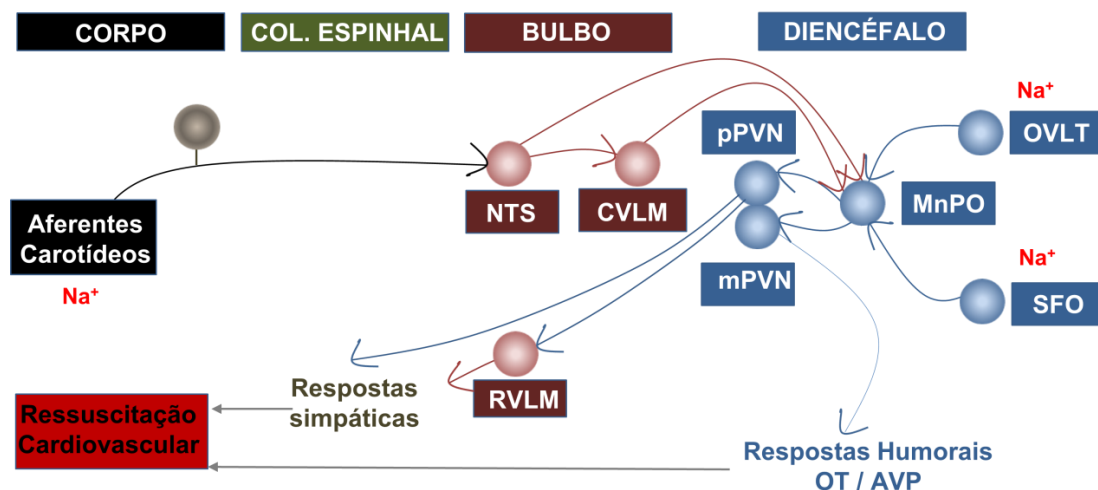


Figura 17. Vias centrais envolvidas na ressuscitação cardiovascular e autonômica promovida pela infusão de salina hipertônica (SH) em ratos submetidos à hemorragia hipotensiva (HH). Região caudoventrolateral do bulbo (CVLM), núcleo do tracto solitário (NTS), núcleo paraventricular do hipotálamo magnocelular (mPVN), núcleo paraventricular do hipotálamo parvocelular (pPVN), núcleo pré-óptico mediano (MnPO), órgão subfornicial (SFO), órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), região rostroventrolateral do bulbo (RVLM), ocitocina (OT) e vasopressina (VP).

6. CONCLUSÕES

Do até exposto aqui é lícito propor que o NTS, por meio do grupamento neuronal A2, a região CVLM, por meio do grupamento neuronal A1, e o núcleo MnPO modulam as respostas cardiovasculares e autonômicas induzidas pela sobrecarga de sódio após a HH. Assim, os resultados obtidos no presente estudo sugerem que essas regiões centrais fazem parte dos circuitos de integração e transmissão de informações a respeito de mudanças na volemia e osmolaridade plasmática, sendo fundamental para o reestabelecimento cardiovascular e autonômico promovido pela infusão de solução SH após o quadro de hipovolemia.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rodolfo K. What is homeostasis? *Sci Am.* 2000;1–10.
2. Kobayashi L, Costantini TW, Coimbra R. Hypovolemic Shock Resuscitation. *Surg Clin North Am.* 2012;92(6):1403–23.
3. Krausz MM. Initial resuscitation of hemorrhagic shock. *World J Emerg Surg.* 2006;1:14.
4. Angele MK, Schneider CP, Chaudry IH. Bench-to-bedside review: latest results in hemorrhagic shock. *Crit Care.* 2008;12(4):218.
5. Xu D, Gao C, Niu W, Li Y, Wang Y, Gao C, et al. Sodium hydrosulfide alleviates lung inflammation and cell apoptosis following resuscitated hemorrhagic shock in rats. *Acta Pharmacol Sin.* 2013;34(12):1515–25.
6. Sahdev P, Lacqua MJ, Singh B. Road Traffic Fatalities in Delhi : Causes , injury patterns, and incidence of preventable deaths. *Accid Anal Prev.* 1994;26(3):377–84.
7. Holcomb JB, McMullin NR, Pearse L, Caruso J, Wade CE, Oetjen-Gerdes L, et al. Causes of Death in U.S. Special Operations Forces in the Global War on Terrorism. *Ann Surg.* 2007;245(6):986–91.
8. Walfish M, Neuman A, Wlody D. Maternal haemorrhage. *Br J Anaesth.* 2009;103 Suppl 1:i47-56.
9. Sauaia A, Moore FA, Moore EE, Moser KS, Brennan R, Read RA, et al. Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *J Trauma.* 1995;38(2):185–93.
10. Curry N, Davis PW. What's new in resuscitation strategies for the patient with multiple trauma? *Injury.* 2012;43(7):1021–8.
11. Kauvar DS, Lefering R, Wade CE. Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *J Trauma.* 2006;60(6 Suppl):S3–11.

12. Cothren CC, Moore EE, Hedegaard HB, Meng K. Epidemiology of urban trauma deaths: A comprehensive reassessment 10 years later. *World J Surg.* 2007;31(7):1507–11.
13. Souza ML, Laurenti R, Knobel R, Monticelli M, Brüggemann OM, Drake E. Mortalidade materna por hemorragia no Brasil. *Rev Latino-Am Enferm.* 2013;21(3):1–8.
14. Vincent JL, Backer D. Circulatory Shock. Finfer SR, Vincent J-L, editors. *N Engl J Med.* 2013 Oct 31;369(18):1726–34.
15. Guidelines for trauma quality improvement programmes. *World Heal Organ.* 2009;1(1):1–105.
16. Aletti F, Maffioli E, Negri A, Santamaria MH, DeLano FA, Kistler EB, et al. Peptidomic Analysis of Rat Plasma: Proteolysis in Hemorrhagic Shock. *Shock.* 2016;45(5):540–54.
17. Dilmen S, Eryilmaz M, Balkan SM, Serdar M, Durusu M, Yıldırım AO, et al. Comparison of warm fluid and cold fluid resuscitation during uncontrolled hemorrhagic shock model in rats. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2017;23(4):287–93.
18. Zakaria RR, Garrison N, Kawabe T, Harris PD. Direct Peritoneal Resuscitation From Hemorrhagic Shock: Effect of Time Delay in Therapy Initiation. *J Trauma.* 2005;58(3):499–508.
19. Aditianingsih D, George YWH. Guiding principles of fluid and volume therapy. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2014;28(3):249–60.
20. Zhao J-X, Wang B, You G-X, Wang Y, Chen G, Wang Q, et al. Hypertonic Saline Dextran Ameliorates Organ Damage in Beagle Hemorrhagic Shock. *PLoS One.* 2015;10(8):e0136012.
21. Tremblay LN, Rizoli SB, Brenneman FD. Advances in fluid resuscitation of hemorrhagic shock. *Can J Surg.* 2001;44(3):172–9.
22. Whalen EJ, Johnson AK, Lewis SJ. Hemodynamic responses elicited by systemic injections of isotonic and hypertonic saline in hemorrhaged rats.

Microvasc Res. 2014 Jan;91:22–9.

23. Wu CY, Chan KC, Cheng YJ, Yeh YC, Chien CT. Effects of different types of fluid resuscitation for hemorrhagic shock on splanchnic organ microcirculation and renal reactive oxygen species formation. *Crit Care*. 2015;19(1):434.
24. Penfield WG. The treatment of severe and progressive hemorrhage by intravenous injections. *Am J Physiol -- Leg Content*. 1919;48(1):121–32.
25. Velasco IT, Pontieri V, Rocha e Silva M. J, Lopes OU. Hyperosmotic NaCl and severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 1980 Nov 1;239(5):H664-673.
26. Felipe J, Timoner J, Velasco IT, Lopes OU, Rocha-e-Silva M. Treatment of refractory hypovolaemic shock by 7.5% sodium chloride injections. *Lancet*. 1980;2(8202):1002–4.
27. Younes RN, Aun F, Tomida RM, Birolini D. The role of lung innervation in the hemodynamic response to hypertonic sodium chloride solutions in hemorrhagic shock. *Surgery*. 1985;98(5):900–6.
28. Amaral NO, Naves LM, Ferreira-Neto ML, Freiria-Oliveira AH, Colombari E, Rosa DA, et al. Median Preoptic Nucleus Mediates the Cardiovascular Recovery Induced by Hypertonic Saline in Hemorrhagic Shock. *Sci World J*. 2014;2014:1–9.
29. Rocha-e-Silva M, Negraes GA, Soares AM, Pontieri V, Loppnow L. Hypertonic resuscitation from severe hemorrhagic shock: patterns of regional circulation. *Circ Shock*. 1986;19(2):165–75.
30. Rocha-e Silva-M, Velasco IT, Nogueira da Silva RI, Oliveira MA, Negraes GA. Hyperosmotic sodium salts reverse severe hemorrhagic shock: other solutes do not. *Am J Physiol*. 1987;253(4 Pt 2):H751–62.
31. Kramer GC. Hypertonic resuscitation: physiologic mechanisms and recommendations for trauma care. *J Trauma*. 2003;54(5 Suppl):S89–99.
32. Antunes-Rodrigues J, Machado BH, Andrade HA, Mauad H, Ramalho MJ,

- Reis LC, et al. Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992;89(15):6828–31.
33. 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.
 34. Gonzalez C, Almaraz L, Obeso A, Rigual R. Carotid body chemoreceptors: from natural stimuli to sensory discharges. *Physiol Rev*. 1994;74(4):829–98.
 35. Benarroch EE. The arterial baroreflex: functional organization and involvement in neurologic disease. *Neurology*. 2008;71(21):1733–8.
 36. Wehrwein EA, Joyner MJ. Regulation of blood pressure by the arterial baroreflex and autonomic nervous system. *Handb Clin Neurol*. 2013;117:89–102.
 37. Silva EF, Sera CT, Mourão AA, Lopes PR, Moreira MC, Ferreira-Neto ML, et al. Involvement of sinoaortic afferents in renal sympathoinhibition and vasodilation induced by acute hypernatremia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2015;42(11):1135–41.
 38. Cravo SL, Lopes OU, Pedrino GR. Involvement of catecholaminergic medullary pathways in cardiovascular responses to acute changes in circulating volume. *Brazilian J Med Biol Res*. 2011;44(9):877–82.
 39. Moreira MCS, Naves LM, Marques SM, Silva EF, Rebelo AC, Colombari E, et al. Neuronal circuits involved in osmotic challenges. *Physiol Res*. 2017;66(3):411–23.
 40. Walsh JC, Kramer GC. Resuscitation of hypovolemic sheep with hypertonic saline/Dextran: the role of Dextran. *Circ Shock*. 1991;34(3):336–43.
 41. Frithiof R, Eriksson S, Bayard F, Svensson T, Rundgren M. Intravenous hypertonic NaCl acts via cerebral sodium-sensitive and angiotensinergic mechanisms to improve cardiac function in haemorrhaged conscious

- sheep. *J Physiol.* 2007;583(Pt 3):1129–43.
42. Barbosa SP, Camargo LA, Saad WA, Renzi A, De Luca Júnior LA, Menani J V. Lesion of the anteroventral third ventricle region impairs the recovery of arterial pressure induced by hypertonic saline in rats submitted to hemorrhagic shock. *Brain Res.* 1992;587(1):109–14.
 43. Costa EFA, Pedrino GR, Lopes OU, Cravo SL. Afferent pathways involved in cardiovascular adjustments induced by hypertonic saline resuscitation in rats submitted to hemorrhagic shock. *Shock.* 2009;32(2):190–3.
 44. Pedrino GR, Rossi M V., Schoorlemmer GHM, Lopes OU, Cravo SL. Cardiovascular adjustments induced by hypertonic saline in hemorrhagic rats: Involvement of carotid body chemoreceptors. *Auton Neurosci Basic Clin.* 2011;160(1–2):37–41.
 45. Pedrino GR, Rosa DA, Lopes OU, Cravo SL. Catecholaminergic Medullary Pathways and Cardiovascular Responses to Expanded Circulating Volume and Increased Osmolarity. *Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration.* 2014
 46. Sawchenko PE, Swanson LW. Central noradrenergic pathways for the integration of hypothalamic neuroendocrine and autonomic responses. *Science.* 1981;214(4521):685–7.
 47. Blessing WW, Jaeger CB, Ruggiero D a, Reis DJ. Hypothalamic projections of medullary catecholamine neurons in the rabbit: a combined catecholamine fluorescence and HRP transport study. *Brain Res Bull.* 1982;9(1–6):279–86.
 48. Tucker DC, Saper CB, Ruggiero D a, Reis DJ. Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J Comp Neurol.* 1987;259(4):591–603.
 49. Zardetto-Smith AM, Johnson AK. Chemical topography of efferent projections from the median preoptic nucleus to pontine monoaminergic cell groups in the rat. *Neurosci Lett.* 1995;199(3):215–9.

50. Tanaka J, Hayashi Y, Watai T, Fukami Y, Johkoh R, Shimamune S. A1 noradrenergic modulation of AV3V inputs to PVN neurosecretory cells. *Neuroreport*. 1997;8(14):3147–50.
51. Hochstenbach SL, Ciriello J. Plasma hypernatremia induces c-fos activity in medullary catecholaminergic neurons. *Brain Res*. 1995;674(1):46–54.
52. Saper CB, Levisohn D. Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: Anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. *Brain Res*. 1983;288(1–2):21–31.
53. Menani JV, Vieira AA, Colombari DSA, De Paula PM, Colombari E, De Luca LA. Preoptic–Periventricular Integrative Mechanisms Involved in Behavior, Fluid–Electrolyte Balance, and Pressor Responses. *Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration*. CRC Press/Taylor & Francis; 2014.
54. Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996;23(2):183–91.
55. Toney GM, Chen QH, Cato MJ, Stocker SD. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand*. 2003 Jan;177(1):43–55.
56. Stocker SD, Toney GM. Median preoptic neurones projecting to the hypothalamic paraventricular nucleus respond to osmotic, circulating Ang II and baroreceptor input in the rat. *J Physiol*. 2005;568(Pt 2):599–615.
57. Affleck VS, Coote JH, Pyner S. The projection and synaptic organisation of NTS afferent connections with presympathetic neurons, GABA and nNOS neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Neuroscience*. 2012;219:48–61.
58. 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.

59. Pedrino GR, Monaco LR, Cravo SL. Renal vasodilation induced by hypernatraemia: Role of alfa-adrenoceptors in the median preoptic nucleus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2009;36(12):83–9.
60. 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):1–9.
61. 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):1–9.
62. Silva EF, Freiria-Oliveira AH, Custódio CHX, Ghedini PC, Bataus LAM, Colombari E, et al. A1 Noradrenergic Neurons Lesions Reduce Natriuresis and Hypertensive Responses to Hypernatremia in Rats. *PLoS One*. 2013;8(9):1–11.
63. Paxinos, G. and Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. J Anat. 1997 Aug;191(2):1–317.
64. Copotoiu R, Cinca E, Collange O, Levy F, Mertes P-M. Physiopathologie du choc hémorragique. *Transfus Clin Biol*. 2016;23(4):222–8.
65. Zhang T, Tanida M, Uchida K, Suzuki Y, Yang W, Kuda Y, et al. Biphasic Renal Sympathetic Response to Hemorrhagic Hypotension in Mice. *SHOCK*. 2017;48(5):576–82.
66. Schadt JC, Ludbrook J. Hemodynamic and neurohumoral responses to acute hypovolemia in conscious mammals. *Am J Physiol Hear Circ Physiol*. 1991;260(2):H305-318.
67. Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci*. 2006;7(5):335–46.
68. 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.
69. 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.

70. 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.
71. Noda M, Hiyama TY. Sodium sensing in the brain. *Pflugers Arch.* 2015;467(3):465–74.
72. Vivas L, Godino A, Dalmaso C, Caeiro XE, Macchione AF, Cambiasso MJ. Neurochemical Circuits Subserving Fluid Balance and Baroreflex: A Role for Serotonin, Oxytocin, and Gonadal Steroids. *Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration.* 2014.
73. Godino A, Giusti-Paiva A, Antunes-Rodrigues J, Vivas L. Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. *Neuroscience.* 2005;133(2):493–505.
74. Freiria-Oliveira AH, Blanch GT, Pedrino GR, Cravo SL, Murphy D, Menani J V, et al. Catecholaminergic neurons in the commissural region of the nucleus of the solitary tract modulate hyperosmolality-induced responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015;309(9):R1082-91.
75. Picklo MJ, Wiley RG, Lappi DA, Robertson D. Noradrenergic lesioning with an anti-dopamine beta-hydroxylase immunotoxin. *Brain Res.* 1994;666(2):195–200.
76. Wrenn CC, Picklo MJ, Lappi DA, Robertson D, Wiley RG. Central noradrenergic lesioning using anti-DBH-saporin: anatomical findings. *Brain Res.* 1996;740(1–2):175–84.
77. Dashniani MG, Burjanadze MA, Naneishvili TL, Chkhikvishvili NC, Beselia G V., Kruashvili LB, et al. Exploratory behavior and recognition memory in medial septal electrolytic, neuro- and immunotoxic lesioned rats. *Physiol Res.* 2015;64(5):755–67.
78. Madden CJ, Sved AF. Cardiovascular regulation after destruction of the C1

- cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003;285(6):H2734-48.
79. 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.
 80. Madden CJ, Ito S, Rinaman L, Wiley RG, Sved AF. Lesions of the C1 catecholaminergic neurons of the ventrolateral medulla in rats using anti-DbetaH-saporin. *Am J Physiol*. 1999;277(4 Pt 2):R1063-75.
 81. Moreira TS, Takakura AC, Colombari E, Menani J V. Antihypertensive effects of central ablations in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009;296(6):R1797-806.
 82. Kolaj M, Bai D, Renaud LP. GABAB receptor modulation of rapid inhibitory and excitatory neurotransmission from subfornical organ and other afferents to median preoptic nucleus neurons. *J Neurophysiol*. 2004;92(1):111–22.
 83. Miselis RR, Shapiro RE, Hand PJ. Subfornical organ efferents to neural systems for control of body water. *Science*. 1979;205(4410):1022–5.
 84. Chiba T, Murata Y. Afferent and efferent connections of the medial preoptic area in the rat: a WGA-HRP study. *Brain Res Bull*. 1985;14(3):261–72.
 85. Tanaka J, Yamamuro Y, Saito H, Matsuda M, Nomura M. Differences in electrophysiological properties of angiotensinergic pathways from the subfornical organ to the median preoptic nucleus between normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Exp Neurol*. 1995;134(2):192–8.
 86. Silveira LL, da Silva EF, de Andrade AM, Xavier CH, Freiria-Oliveira AH, Colugnati DB, et al. Involvement of the median preoptic nucleus in blood pressure control. *Neurosci Lett*. 2014;558:91–6.
 87. Mourão AA, Moreira MCS, Melo ABS, Lopes PR, Rebelo ACS, Rosa DA,

- et al. Does the median preoptic nucleus contribute to sympathetic hyperactivity in spontaneously hypertensive rats? *Auton Neurosci.* 2016;195:29–33.
88. DiBona GF, Kopp UC. Neural control of renal function. *Physiol Rev.* 1997;77(1):75–197.
 89. Buller KM, Smith DW, Day TA. Differential recruitment of hypothalamic neuroendocrine and ventrolateral medulla catecholamine cells by non-hypotensive and hypotensive hemorrhages. *Brain Res.* 1999;834(1–2):42–54.
 90. Mangiavane ML, Thrasher TN, Keil LC, Simpson JB, Ganong WF. Deficits in drinking and vasopressin secretion after lesions of the nucleus medianus. *Neuroendocrinology.* 1983;37(1):73–7.
 91. McKinley MJ, Mathai ML, McAllen RM, McClear RC, Miselis RR, Pennington GL, et al. Vasopressin secretion: Osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *J Neuroendocrinol.* 2004;16(4):340–7.