

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

ELAINE FERNANDA DA SILVA

CONTRIBUIÇÃO DOS AFERENTES SINOÁORTICOS NOS
AJUSTES RENAIIS, CARDIOVASCULARES, SIMPÁTICOS E
VENTILATÓRIOS INDUZIDOS POR HIPEROSMOLALIDADE
AGUDA

GOIÂNIA – GO

2017

TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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: Elaine Fernanda da Silva

Título do trabalho: Contribuição dos aferentes sinoaórticos nos ajustes renais, cardiovasculares, simpáticos e ventilatórios induzidos por hiperosmolalidade aguda.

3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

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

Elaine Fernanda da Silva

Assinatura do (a) autor (a) ²

Data: 26 / 06 / 2019

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

²A assinatura deve ser escaneada.

ELAINE FERNANDA DA SILVA

**CONTRIBUIÇÃO DOS AFERENTES SINOÁORTICOS NOS
AJUSTES RENAI, CARDIOVASCULARES, SIMPÁTICOS E
VENTILATÓRIOS INDUZIDOS POR HIPEROSMOLALIDADE
AGUDA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas associado à Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título do Doutor em Ciências.

Área de concentração: Fisiologia

Orientador: Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino

Departamento de Ciências Fisiológicas – Universidade Federal de Goiás

Co-orientador: Dr. Eduardo Colombari

Departamento de Fisiologia e Patologia – Universidade Estadual de São Paulo

GOIÂNIA – GO

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

da Silva, Elaine Fernanda

Contribuição dos aferentes sinoaórticos nos ajustes renais, cardiovasculares, simpáticos e ventilatórios induzidos por hiperosmolalidade aguda [manuscrito] / Elaine Fernanda da Silva. - 2017.

CXLVII, 147 f.: il.

Orientador: Prof. Gustavo Rodrigues Pedrino; co-orientador Eduardo Colombari.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Ciências Biológicas (ICB), , Goiânia, 2017.

Bibliografia. Anexos.

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

1. Corpúsculo carotídeo. 2. Nervo do seio carotídeo. 3. Denervação sinoaórtica. 4. Salina Hipertônica. 5. Atividade Nervosa Simpática. I. Pedrino, Gustavo Rodrigues, orient. II. Título.

CDU 612.1

ATA DA DEFESA



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

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE TESE DE Nº 1

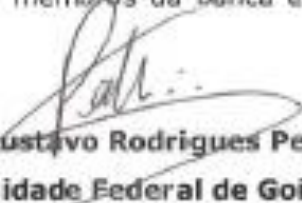
1
2 Aos vinte dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezessete, às catorze
3 horas, no Anfiteatro do ICB II da Universidade Federal de Goiás, reuniram-se
4 os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino,
5 Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga, Prof. Dr. Eduardo Colombari, Prof. Dr.
6 Carlos Henrique de Castro, Profa. Dra. Patricia Maria Ferreira e Profa. Dra.
7 Nusa de Almeida Silveira para, em sessão pública presidida pelo primeiro
8 examinador citado, procederem à avaliação da defesa de tese intitulada
9 "Contribuição dos aferentes sinoaórticos nos ajustes renais, cardiovasculares,
10 simpáticos e ventilatórios induzidos por hiperosmolalidade aguda", em nível de
11 doutorado, de autoria de **Elaine Fernanda da Silva**, discente do Programa
12 Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade
13 Federal de Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação
14 formal dos membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da
15 tese que, em cerca de 49 minutos, procedeu à apresentação de seu
16 trabalho. Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a
17 examinada, tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a
18 fase de arguição, procedeu-se à avaliação da tese. Tendo-se em vista o que
19 consta na Resolução nº1129 de maio de 2012 do Conselho de Ensino,
20 Pesquisa, Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa
21 Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, a tese foi
22 APROVADA, considerando-se integralmente cumprido este
23 requisito para fins de obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas
24 pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão do curso dar-se-á quando da
25 entrega da versão definitiva da tese na secretaria do programa, com as
26 devidas correções sugeridas pela banca examinadora, no prazo de trinta dias a
27 contar da data da defesa. Cumpridas as formalidades de pauta,
28 às 17 horas e 39 minutos, encerrou-se a sessão de defesa e, para




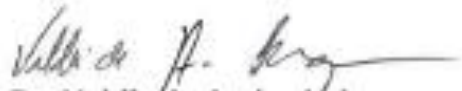
SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

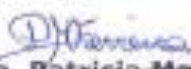
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS


29 constar, eu, Renato César Rodrigues, Assistente em Administração da
30 Secretaria de Pós-graduação do Instituto de Ciências Biológicas da
31 Universidade Federal de Goiás, lavrei a presente ata que, após lida e
32 aprovada, será assinada pelos membros da banca examinadora em três vias
33 de igual teor.


34
35 
36 **Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino**
Universidade Federal de Goiás

37
38 
39 **Prof. Dr. Eduardo Colombari**
40 **Universidade Estadual Paulista**

41
42 
43 **Prof. Dr. Valdir de Andrade braga**
44 **Universidade Federal da Paraíba**

45
46 
47 **Profa. Dra. Patricia Maria Ferreira**
48 **Universidade Federal de Goiás**

49
50 
51 **Profa. Dra. Nusa de Almeida Silveira**
52 **Universidade Federal de Goiás**

53
54 
55 **Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro**
56 **Universidade Federal de Goiás**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Discente: Elaine Fernanda da Silva

Título: Contribuição dos aferentes sinoaórticos nos ajustes renais, cardiovasculares, simpáticos e ventilatórios induzidos por hiperosmolalidade aguda

Aprovada em 20 de fevereiro de 2017

Banca Examinadora

Prof. Dr. Valdir de Andrade Braga

Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba.

Prof.^a Dr.^a Nusa de Almeida Silveira

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás

Prof.^a Dr.^a Patrícia Maria Ferreira

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Carlos Henrique de Castro

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás.

Prof. Dr. Eduardo Colombari (co-orientador)

Departamento de Fisiologia e Patologia, Universidade Estadual de São Paulo.

Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrino (orientador)

Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal de Goiás.

Dedico aos meus pais,

Carlos Fernandes da Silva

Rosa Gonçalves da Silva

Ao meu irmão,

Leandro Fernandes da Silva

Sem o quais não teria chegado até aqui.

***Obrigada pela educação, compreensão, incentivos e
companheirismo! Serei eterna devedora de todo este amor.***

AGRADECIMENTOS

A todas as pessoas que cruzaram meu caminho e contribuíram para meu crescimento. Mencionarei, em especial, aqueles que foram muito importantes e contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho.

Aos meus familiares pelo incentivo. Aos meus avós, irmão (a saber, Leandro Fernandes da Silva), tios e primos. Especialmente aos meus pais Carlos Fernandes da Silva e Rosa Gonçalves da Silva. Obrigada por todo o apoio, pelo incentivo e por acreditarem em minha capacidade de superar desafios quando minha fé vacilava. Agradeço por cada palavra de ânimo e por terem estado perto mesmo quando eu me encontrava longe. Por fim, agradeço por toda a dedicação prestada ao longo dos anos à minha formação educacional e, por terem implantado em mim, desde a infância, o dever de estudar. Aos senhores serei eterna devedora.

Ao Prof. Gustavo Rodrigues Pedrino pelo modo como conduziu a orientação deste trabalho e pelos muitos conselhos dados ao longo destes seis anos de convivência, os quais contribuíram para minha formação e crescimento. Obrigada pela confiança, pelas oportunidades oferecidas e, principalmente, por instigar sempre em seus alunos o apreço pelo conhecimento. Por se mostrar um pesquisador muito ativo, coerente e dinâmico. Por ser um exemplo de profissional que busca expandir seus horizontes, lembrando sempre do crescimento coletivo.

Ao Prof. Eduardo Colombari pela calorosa acolhida em seu laboratório em Araraquara. Por sua importantíssima atuação como co-orientador deste trabalho. Pelas oportunidades oferecidas, pela atenção dedicada e por mostrar-se sempre muito animado com os experimentos.

À Prof^a. Débora Simões de Almeida Colombari e aos Prof. Daniel Breseghello Zoccal e José Vanderlei Menani pela ativa colaboração com a realização deste trabalho. Pelo exemplo respeitoso no tratamento com a ciência e pelos preciosos ensinamentos. Obrigada por terem contribuído com meu amadurecimento científico enquanto trabalhamos juntos.

Aos Prof. Daniel Alves Rosa, André Henrique Freiria-Oliveira, Rodrigo Mello Gomes e Ana Cristina Silva Rebelo de nosso grupo de pesquisa na Universidade Federal de Goiás. A eles deixo meus sinceros agradecimentos pelas colaborações, disposição e discussões científicas que ajudaram a enriquecer este trabalho.

À Dr^a Mirian Bassi e às M.^a Aryanne Batista Soares de Melo e Aline Andrade Mourão pelo auxílio com a realização dos protocolos experimentais. Além disso, agradeço pela amizade e importantes palavras de incentivo.

Aos colegas do Laboratório de Química Analítica, do Instituto de Química, pelas inestimáveis e bem sucedidas colaborações que muito engrandeceram nosso trabalho.

A todos os professores do Departamento de Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos. E aos amigos do Departamento pela convivência, alegria e momentos de descontração.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina da USP/RP com os quais tive magníficas disciplinas. Para mim foi um privilégio ter aulas com estes senhores em Fisiologia. Obrigada por serem profissionais inspiradores.

Aos amigos feitos em Araraquara e Ribeirão Preto, os quais tornaram a estadia nestas cidades mais feliz e agradável.

Por fim, às instituições de fomento (UFG, CAPES, CNPq, FAPEG e FAPESP) por viabilizarem a realização deste trabalho.

A todos estes agradeço por terem contribuído com meu crescimento e amadurecimento.

***“Os obstáculos são essas coisas aterradoras que um
vê quando aparta os olhos de sua meta”***

Henry Ford

RESUMO

Estruturas prosencefálicas estão envolvidas no monitoramento de alterações na osmolalidade plasmática. Além dos mecanismos centrais, é postulado a participação de sensores periféricos na osmorregulação. No presente estudo investigamos a contribuição dos aferentes sinoaórticos nos mecanismos fisiológicos de regulação da tonicidade dos fluidos corporais durante a hiperosmolalidade aguda. Na primeira parte deste estudo avaliamos a participação dos aferentes sinoaórticos nos ajustes cardiovasculares, renais e autonômicos induzidos por hipernatremia. Ratos Wistar (280-350 g) foram anestesiados com halotano (2% em O₂) e submetidos à denervação sinoaórtica (DSA), remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) ou cirurgia fictícia e à implantação de cânulas na artéria e veia femoral direita para o registro da pressão arterial (PA) e administração de substâncias, respectivamente. No dia seguinte, os animais DSA foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg peso corporal, i.v.) e instrumentalizados para o registro da atividade nervosa simpática renal (ANSr). Animais CCX não anestesiados foram utilizados para o registro da PA e teste de excreção renal. Os parâmetros foram avaliados em resposta à infusão intravenosa de salina hipertônica (SH) (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal, em 60 segundos). A DSA aboliu a simpatoinibição renal induzida por infusão de SH (DSA: $-10,7 \pm 5,5\%$ do basal, vs. ratos controle: $-28,7 \pm 4,8\%$ do basal, 60 minutos após SH; $p < 0,05$). A CCX atenuou a resposta pressora (CCX: $5,7 \pm 2,0$ mmHg, vs. controle: $15,8 \pm 2,0$ mmHg, 12 minutos após SH; $p < 0,05$) e a excreção renal de sódio (CCX: $74,9 \pm 7,3\%$, vs. controle: $99,7 \pm 6,7\%$, 90 minutos após SH; $p < 0,05$) à SH. Estes resultados mostram que a integridade dos aferentes sinoaórticos são essenciais para os ajustes autonômicos, cardiovasculares e renais induzidos por hipernatremia aguda. Na segunda parte do estudo, investigamos o envolvimento dos corpúsculos carotídeos e do presencéfalo nas respostas simpática e ventilatória induzidas por infusão intra arterial de SH utilizando preparações *in situ* de ratos perfundidos arterialmente (Holtzman, 60-100 g). Infusões de SH (NaCl 0,17; 0,3; 0,7; 1,5 e 2 mol/L; 200 µL durante 20 segundos cada) foram realizadas em ordem ascendente acumulativa enquanto as atividades do nervo simpático torácico, nervo frênico e nervo do seio carotídeo foram registradas. Infusões intra arteriais de

SH 2 mol/L, aumentaram a frequência de disparo do nervo frênico ($5,8 \pm 0,9$ cpm, vs. Ringer: $0,4 \pm 0,2$ cpm; $p < 0,05$), provocou simpatoexcitação ($63,3 \pm 8,4\%$, vs. Ringer: $-0,8 \pm 1,9\%$; $p < 0,05$) e ativação do nervo do seio carotídeo ($105,1 \pm 13,2\%$, vs. Ringer: $-0,2 \pm 1,3\%$; $p < 0,05$). A remoção dos corpúsculos carotídeos atenuou a simpatoexcitação ($26,2 \pm 4,9\%$; $p < 0,05$), sem afetar a taquipneia ($3,6 \pm 0,5$ cpm) induzida por SH 2 mol/L. A desconexão do prosencéfalo ao nível pré colicular, aboliu a simpatoexcitação ($8,4 \pm 3,7\%$; $p < 0,05$) e a taquipneia ($1,2 \pm 0,4$ cpm; $p < 0,05$) em resposta à SH 2 mol/L. Os resultados indicam a participação do prosencéfalo nas respostas simpática e ventilatória promovidas por sobrecarga aguda de sódio. Ademais, sugerem que os corpúsculos carotídeos podem atuar como sensores periféricos de sódio contribuindo para as respostas autonômicas induzidas por hiperosmolalidade aguda.

Palavras chave: Corpúsculo carotídeo; Nervo do seio carotídeo; Denervação sinoaórtica; Salina Hipertônica; Atividade Nervosa Simpática.

ABSTRACT

The forebrain is suggested the main sensorial site for monitoring changes in plasma osmolality. In addition to the central mechanisms, it has been suggested that peripheral sensors may participate in the osmoregulation. In the present study we investigated the contribution of the sinoaortic afferents in the physiological mechanisms of regulation of the body fluids tonicity during acute hyperosmolality. In the first part of the study, we explored the participation of sinoaortic afferents in the cardiovascular, renal and autonomic responses induced by hypernatremia. Wistar rats (280-350 g) were anesthetized with halothane (2% in O₂) and submitted to sinoaortic denervation (SAD), carotid body removal (CBX) or fictitious surgery, and implantation of cannula in the right femoral artery and vein to blood pressure (BP) recording and substance administration, respectively. In the next day, SAD animals were anesthetized with urethane (1.2 g/kg body weight, i.v.) and instrumentalized for renal sympathetic nerve activity (rSNA) recording. Non-anaesthetized CBX animals were used to BP recording and renal excretion test. The parameters were evaluated in response to intravenous infusion of hypertonic saline (HS) (3 mol/L NaCl, 1.8 mL/kg body weight, in 60 seconds). Renal sympathoinhibition induced by infusion of HS was abolished in SAD rats (SAD: $-10.7 \pm 5.5\%$ of baseline, vs. control rats: $-28.7 \pm 4.8\%$ of baseline, 60 minutes after HS, $p < 0.05$). CBX attenuated the pressor response (CBX: 5.7 ± 2.0 mmHg, vs. control: 15.8 ± 2.0 mmHg, 12 minutes after HS; $p < 0.05$) and sodium renal excretion (CBX: $74.9 \pm 7.3\%$, vs. control: $99.7 \pm 6.7\%$, 90 minutes after HS; $p < 0.05$) to HS. These results show that the integrity of the aortic and carotid afferents are essential for autonomic, cardiovascular and renal adjustments induced by acute hypernatremia. In the second part we explored the involvement of the carotid bodies and forebrain in the autonomic and ventilatory responses induced by intra arterial infusion of HS using arterially-perfused *in situ* rat preparations (male Holtzman rats, 60-100 g). HS infusions (0.17; 0.3; 0.7; 1.5 and 2 mol/L NaCl; 200 μ L during 20 seconds each) were performed in accumulative ascending order while thoracic sympathetic, phrenic and carotid sinus nerve activities were recorded. Intra-arterial infusion of 2 mol/L NaCl, produced a modest increase in phrenic burst frequency (5.8 ± 0.9 bpm, vs. Ringer: 0.4 ± 0.2 bpm, $p < 0.05$) and

markedly enhanced sympathetic ($63.3 \pm 8.4\%$, vs. Ringer: $-0.8 \pm 1.9\%$, $p < 0.05$) and carotid sinus nerve activities ($105.1 \pm 13.2\%$, vs. Ringer: $-0.2 \pm 1.3\%$, $p < 0.05$). Carotid bodies removal attenuated the sympathoexcitation ($26.2 \pm 4.9\%$, $p < 0.05$), but not the tachypnea (3.6 ± 0.5 bpm) induced by 2 mol/L NaCl. The forebrain disconnection at the pre-collicular level, abolished the sympathoexcitation ($8.4 \pm 3.7\%$, $p < 0.05$) and the increase in phrenic burst frequency (1.2 ± 0.4 bpm, $p < 0.05$) in response to 2 mol/L NaCl. The results indicate the participation of forebrain in the sympathetic and ventilatory responses produced by sodium overload. Moreover, they suggest that carotid bodies may act as a sodium peripheral sensor contributing for the autonomic responses to acute hyperosmotic challenges.

Key words: Carotid body; Carotid sinus nerve; Sinoaortic denervation; Hypertonic saline; Sympathetic nerve activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática da preparação <i>in situ</i> coração hipotálamo tronco cerebral isolados (<i>working heart-hypothalamus-brainstem preparation</i>) [adaptado de Moraes <i>et al.</i> , 2015]. Ratos decorticados e seccionados abaixo do diafragma são perfundidos retrogradamente através da aorta descendente. A solução de perfusão é gaseificada (95% de O ₂ e 5% de CO ₂), aquecida (32 °C) e livre de bolhas e detritos. Uma cânula de lúmen duplo permite a perfusão da preparação e o registro simultâneo da pressão de perfusão. O perfusato é drenado e recirculado. As atividades do nervo do seio carotídeo (ANSC), nervo simpático torácico (ANSt) e nervo frênico (ANF) foram registradas simultaneamente. Ampl, amplificador.....	25
Figura 2	Análise do padrão de atividade simpática durante o ciclo respiratório. A atividade nervosa simpática (ANSt) foi dividida em três partes a partir do sinal de atividade do nervo frênico (ANF): expiração final (EF), inspiração (IP) e pós inspiração (PI). A média da ANSt foi adquirida em cada segmento e expressa em valores absolutos (µV).....	29
Figura 3	Protocolo experimental realizado para avaliar o efeito da denervação sinoaórtica (DSA) sobre os ajustes cardiovasculares e simpáticos induzidos por sobrecarga aguda de sódio. CF, cirurgia fictícia.....	30
Figura 4	Protocolo experimental realizado para avaliar o efeito da remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) sobre os ajustes cardiovasculares induzidos por sobrecarga aguda de sódio em ratos acordados. CF, cirurgia fictícia.....	31
Figura 5	Delineamento experimental para avaliar o efeito da remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) sobre a excreção renal de sódio após a infusão de salina hipertônica em ratos acordados.....	31
Figura 6	Protocolos experimentais realizados para avaliar as atividades do nervo do seio carotídeo (ANSC), simpático torácico (ANSt) e frênico (ANF) em resposta à estimulação hiperosmótica aguda por meio da infusão intra arterial de salina hipertônica (NaCl 0,17, 0,3, 0,7, 1,5 e 2 mol/L) ou manitol (0,3, 0,5, 1, 2,7 e 3,8 mol/L) em preparações <i>in situ</i> de ratos controles.....	32

Figura 7	Protocolo experimental realizado para determinar o efeito da remoção do corpúsculo carotídeo (CCX) sobre as alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt) e frênico (ANF) induzidas por sobrecarga aguda de sódio (NaCl 0,17, 0,3, 0,7, 1,5 e 2 mol/L).....	33
Figura 8	Delineamento experimental utilizado para avaliar os efeitos da remoção do prosencéfalo (por transecção pré colicular) sobre as alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt) e frênico (ANF) induzidas por infusão intra arterial de salina hipertônica (NaCl 0,17, 0,3, 0,7, 1,5 e 2 mol/L).....	34
Figura 9	Registros da pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato controle e de um rato submetido à denervação sinoaórtica (DSA) durante a ativação do barorreflexo (A) e quimiorreflexo (B) por infusão intravenosa de fenilefrina (2 µg em 100 µL) e cianeto de potássio (KCN, 40 µg em 100 µL), respectivamente. As setas pretas acima dos registros indicam o momento das infusões. Índice de barorreflexo (IB) (C) calculado pela razão entre as alterações na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) induzidas por infusão intravenosa de fenilefrina (1, 1,5 e 2 µg em 100 µL). Alterações na PAM (D) e FC (E) provocadas por infusão de cianeto de potássio (KCN; 40 µg em 100 µL). Diferenças foram analisadas usando o teste <i>t</i> de Student não pareado. † diferente do controle. <i>p</i> < 0,05. <i>n</i> =6/grupo.....	39
Figura 10	Registros da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), bruto e integrado (Í) da atividade do nervo simpático renal (ANSr) de um rato controle e um rato com denervação sinoaórtica (DSA) anestesiados. Os traçados representativos mostram a PAP, FC e ANSr durante o basal e em resposta à infusão intravenosa de salina hipertônica (SH; 10 e 30 minutos após SH) (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal). O ruído elétrico foi determinado após a infusão de hexametônio (Hex; 30 mg/kg de peso corporal).....	42
Figura 11	Efeitos da infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal) sobre a pressão arterial média (PAM; A), frequência cardíaca (FC; B) e atividade do nervo simpático renal (ANSr; C) em ratos controle (<i>n</i> =6) e submetidos à denervação sinoaórtica (DSA; <i>n</i> =6). As barras pretas indicam o momento da infusão de salina hipertônica. Dados foram analisados utilizando Anova <i>two way</i> para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. *diferente do basal. †diferente do controle. <i>p</i> < 0,05.....	43

- Figura 12** Registros da pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato controle e de um rato submetido à remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) durante o teste de barorreflexo (A) e quimiorreflexo (B) realizados por meio da infusão intravenosa de fenilefrina (2 µg em 100 µL) e cianeto de potássio (KCN, 40 µg em 100 µL), respectivamente. As setas pretas acima dos registros indicam o momento das infusões. Índice de barorreflexo (IB) (C) calculado pela razão entre as alterações na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) induzidas por infusão intravenosa de fenilefrina (1, 1,5 e 2 µg em 100 µL). Alterações na PAM (D) e FC (E) provocadas por infusão de cianeto de potássio (KCN; 40 µg em 100 µL). Diferenças foram analisadas usando o teste *t* de Student não pareado. †diferente do controle. $p < 0,05$. (Controle, n=10) (CCX, n=15)..... 45
- Figura 13** Registros da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de um rato controle e um rato com remoção do corpúsculo carotídeo (CCX) mostrando o basal e as alterações cardiovasculares induzidas por infusão intravenosa de salina hipertônica nos tempos 2, 10 e 20 minutos (SH; NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal). Os parâmetros foram avaliados nos animais não anestesiados..... 48
- Figura 14** Efeitos da infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal) sobre a pressão arterial diastólica (PAD; A), pressão arterial sistólica (PAS; B), pressão arterial média (PAM; C) e frequência cardíaca (FC; D) em ratos controle (n=7) e ratos com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (n=6) não anestesiado. As barras pretas indicam o momento da infusão de salina hipertônica. Dados foram analisados utilizando Anova *two way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. *diferente do basal. †diferente do controle. $p < 0,05$ 49
- Figura 15** Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) antes e após a infusão intravenosa de salina hipertônica em ratos controle (n=4) com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (n=5). Os componentes oscilatórios da PAS foram quantificados em três faixas de frequência: baixa frequência (BF; A) (*low frequency*), alta frequência (AF; B) (*high frequency*) e frequência muito baixa (FMB; C) (*very low frequency*). Dados foram analisados utilizando Anova *two way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ 51

- Figura 16** Concentração plasmática de sódio ($[Na^+]$ Plasmático) e hematócrito antes e após a infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal) em ratos controle (n=6) e ratos com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (n=3). Dados foram analisados utilizando Anova *two way* seguido pelo pós teste de Fisher. *diferente do basal. $p < 0,05$ 52
- Figura 17** Efeitos da infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal) sobre o volume urinário acumulativo (**A**), concentração urinária de sódio ($[Na^+]$ Urinário) (**B**), excreção acumulativa de sódio (**C**) e balanço de sódio (**D**) em ratos controle (n=5) e ratos com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (n=8). Dados foram analisados utilizando Anova *two way* seguido pelo pós teste de Fisher. *diferente do basal. †diferente do controle. $p < 0,05$ 53
- Figura 18** Registros brutos e integrados (\int) mostrando as atividades do nervo simpático torácico (ANSt), nervo do seio carotídeo (ANSC) e nervo frênico (ANF) em resposta à infusão intra arterial de cianeto de potássio (KCN; 25 μ g em 50 μ L), solução de Ringer e NaCl 2 mol/L em ratos controles. À direita está representado o ruído elétrico obtido ao final do experimento. A seta preta acima do registro indica o momento da infusão em bólus de KCN. As linhas pretas acima do registro indicam o período das infusões de solução de Ringer e salina hipertônica 2 mol/L. As alterações na ANSt, ANSC e ANF induzidas por infusão de NaCl 2 mol/L estão destacadas em cinza..... 58
- Figura 19** Alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt; **A**), nervo do seio carotídeo (ANSC; **B**) e na frequência de disparo do nervo frênico (Freq ANF; **C**) induzidas por infusão intra arterial de solução de Ringer ou salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7; 1,5 e 2 mol/L) em ratos controles (n=16). As diferenças foram comparadas utilizando ANOVA *one way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Tukey. $*=p<0,05$ 59
- Figura 20** Alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt; **A**), nervo do seio carotídeo (ANSC; **B**) e na frequência de descargas do nervo frênico (Freq ANF; **C**) produzidas por infusão intra arterial de cianeto de potássio (KCN; 25 μ g em 50 μ L), solução de Ringer ou NaCl 2 mol/L em preparações *in situ* de ratos controles (n=10). Note que as alterações induzidas por NaCl 2 mol/L foram significativamente menores que as produzidas por KCN. Os dados foram analisados usando ANOVA *one way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Tukey. $*=p<0,05$ 60

- Figura 21** Registros integrados (\int) das atividades do nervos simpático torácico (ANSt) e frênico (ANF) mostrando o acoplamento simpático-respiratório durante a infusão de solução de Ringer (esquerda) e NaCl 2 mol/L (direita) em um rato controle. As setas verdes apontam a resposta simpatoexcitatória durante a hiperosmolalidade. EF, expiração final; IP, inspiração; PI, pós inspiração..... 62
- Figura 22** Valores absolutos da atividade do nervo simpático torácico (ANSt) na expiração final (EF; **A**), inspiração (IP; **B**) e pós inspiração (PI; **C**) durante a infusão de solução de Ringer ou NaCl 2 mol/L em ratos controles (n=6). Nos gráficos estão representados a média da ANSt durante cada fase respiratória. As diferenças foram analisadas usando teste *t* de Student pareado. *diferente da solução de Ringer. $p < 0,05$ 63
- Figura 23** Registros brutos e integrados (\int) mostrando as atividades do nervo simpático torácico (ANSt), nervo do seio carotídeo (ANSC) e nervo frênico (ANF) em resposta à infusão intra arterial de solução de Ringer (esquerda) e manitol 3,8 mol/L (direita) em ratos controles. À direita está representado o ruído elétrico obtido ao final do experimento. As linhas pretas acima do registro indicam o período das infusões de solução de Ringer e manitol 3,8 mol/L..... 65
- Figura 24** Alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt; **A**), nervo do seio carotídeo (ANSC; **B**) e na frequência de disparo do nervo frênico (Freq ANF; **C**) induzidas por infusão intra arterial de solução de Ringer ou manitol (0,3; 0,5; 1; 2,7 e 3,8 mol/L) em ratos controles (n=6). Os valores foram comparados utilizando ANOVA *one way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Tukey. $*=p<0,05$ 66
- Figura 25** Registros representativos dos grupos mostrando as alterações na pressão de perfusão (PP) e atividade do nervo simpático torácico (ANSt) induzidas por ativação do barorreflexo em um rato controle e um rato com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (**A**). As setas pretas acima dos registros indicam o momento da infusão intra arterial de fenilefrina (agonista adrenérgico α_1 ; 10 μg em 100 mL). Alterações na pressão de perfusão (PP) (**B**) e ANS torácica (ANSt) (**C**) promovidas por infusão intra arterial de fenilefrina. As diferenças foram comparadas usando teste *t* de Student não pareado. † diferente do controle. $p < 0,05$. (Controle, n=6) (CCX, n=5)..... 68

- Figura 26** Registros representativos dos grupos mostrando as alterações na pressão de perfusão (PP) e integradas das atividades do nervo simpático torácico (JANSt) e do nervo frênico (JANF) induzidas por ativação do quimiorreflexo em um rato controle e um rato com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) **(A)**. As setas pretas acima dos registros indicam o momento da infusão intra arterial de cianeto de potássio (KCN; 25 µg em 50 µL). Alterações na pressão de perfusão (PP) **(B)**, ANS torácica (ANSt) **(C)** e frequência de descargas do nervo frênico (Freq ANF) **(D)** promovidas por infusão intra arterial de KCN. As diferenças foram comparadas usando teste *t* de Student não pareado. †diferente do controle. $p < 0,05$. (Controle, n=6) (CCX, n=5)..... 68
- Figura 27** Registros brutos e integrados (J) das atividades do nervo simpático torácico (ANSt) e nervo frênico (ANF) durante a infusão intra arterial de salina hipertônica 2 mol/L em um rato controle (esquerda) e um rato com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (direita). As linhas pretas acima do registro indicam o período das infusões. As alterações na ANS torácica e ANF estão destacadas em cinza..... 71
- Figura 28** Alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt; **A**) e na frequência de despolarização do nervo frênico (Freq ANF; **B**) durante a infusão intra arterial de solução de Ringer ou NaCl 2 mol/L em ratos controles (n=16) e com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX (n=5). Os dados foram comparados usando ANOVA *two way* par medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. *= $p < 0,05$ 72
- Figura 29** A transecção pré colicular [rostral ao colículo superior (CS)] desconectou o prosencéfalo das demais estruturas encefálicas. Note que a transecção removeu o terceiro ventrículo (3º V) e áreas próximas, como a lâmina terminal (LT). Estruturas mesencefálicas e pontobulbares permaneceram intactas. 4º V, quarto ventrículo; B, bulbo; C, cerebelo; CC, corpo caloso; CI, colículo inferior; ME, medula espinhal; P, ponte; VL, ventrículo lateral..... 74
- Figura 30** Registros brutos e integrados (J) das atividades do nervo simpático torácico (ANSt) e nervo frênico (ANF) durante a infusão intra arterial de salina hipertônica 2 mol/L em um rato controle (esquerda) e um rato com transecção pré colicular (direita). As linhas pretas acima dos registros indicam o período das infusões. As alterações na ANS torácica e ANF estão destacadas em cinza..... 75

- Figura 31** Alterações na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) e na frequência de ANF (Freq ANF) durante a infusão de solução de Ringer ou NaCl 2 mol/L em ratos controles (n=16) e descerebrados (n=6). As diferenças foram analisadas utilizando ANOVA *two way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. $*=p<0,05$ 76
- Figura 32** Representação esquemática das vias neurais de regulação simpática e hormonal durante a hiperosmolalidade. Para detalhes ver o texto. Adaptado de Toney & Stocker, 2010..... 88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores basais de PAM e FC e o peso corporal de ratos controle e DSA não anestesiados.....	37
Tabela 2	Valores basais de PAM, FC e ANSr em ratos controle e DSA anestesiados.....	40
Tabela 3	Valores basais de PAD, PAS, PAM e FC e o peso corporal dos ratos controle e CCX.....	46
Tabela 4	Alterações na osmolalidade do perfusato induzidas por infusões acumulativas de salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7; 1,5 e 2 mol/L) em ordem ascendente.....	54
Tabela 5	Alterações na osmolalidade do perfusato induzidas por infusões acumulativas de manitol (0,3; 0,5; 1; 2,7 e 3,8 mol/L) em ordem crescente.....	55
Tabela 6	Valores basais de PP, ANSt, ANSC e Freq ANF e o peso corporal dos ratos controle, CCX e descerebrados que receberam infusões intra arteriais de NaCl hipertônico ou manitol.....	56
Tabela 7	Alterações na ANSt e ANF induzidas por infusão de solução de Ringer e salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7 e 1,5 mol/L) em ordem crescente em ratos CCX.....	73
Tabela 8	Alterações na ANSt e ANF induzidas por infusão de solução de Ringer e salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7 e 1,5 mol/L) em ordem crescente em ratos descerebrados.....	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>f</i> ANF	Integrada da atividade do nervo frênico
<i>f</i> ANSC	Integrada da atividade do nervo do seio carotídeo
<i>f</i> ANSr	Integrada da atividade nervosa simpática renal
<i>f</i> ANSt	Integrada da atividade nervosa simpática torácica
μV	Microvolts
[Na ⁺]	Concentração de sódio
3 ^o V	Terceiro ventrículo
4 ^o V	Quarto ventrículo
AF	Alta frequência
aNa ⁺	Sódio administrado
ANF	Atividade do nervo frênico
ANP	Peptídeo natriurético atrial
ANS	Atividade nervosa simpática
ANSa	Atividade nervosa simpática adrenal
ANSC	Atividade do nervo do seio carotídeo
ANSI	Atividade nervosa simpática lombar
ANSr	Atividade nervosa simpática renal
ANSs	Atividade nervosa simpática esplâncnica
ANSt	Atividade nervosa simpática torácica
AVP	Vasopressina
B	Bulbo
BF	Baixa frequência
bNa ⁺	Balanco de sódio
bpm	Batimentos por minuto
C	Cerebelo
Ca ⁺⁺	Cálcio
CC	Corpo caloso
CCX	Remoção do corpúsculo carotídeo
CI	Colículo inferior
CEUA	Comitê de Ética para o Uso de Animais
CF	Cirurgia fictícia
cpm	Ciclos por minuto

CS	Colículo superior
CVLM	Região caudal ventrolateral do bulbo
CVOs	Órgãos circumventriculares
DAS	Denervação sinoaórtica
EF	Expiração final
eNa ⁺	Sódio excretado
ENaC	Canais de sódio epiteliais
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
FMB	Frequência muito baixa
Freq ANF	Frequência de descargas do nervo frênico
GABA	Ácido gama aminobutírico
IB	Índice de barorreflexo
ICV	Intracerebroventricular
IP	Inspiração
K ⁺	Potássio
KCN	Cianeto de potássio
LT	Lâmina terminal
ME	Medula espinhal
MnPO	Núcleo pré óptico mediano
MmHg	Milímetros de mercúrio
Mmol	Milimol
Na ⁺	Sódio
NaCl	Cloreto de sódio
NTS	Núcleo do trato solitário
OT	Ocitocina
OVL	Órgão vasculoso da lâmina terminal
P	Ponte
PAD	Pressão arterial diastólica
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica
p.c.	Peso corporal
PI	Pós inspiração
PP	Pressão de perfusão
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo

RVLM	Região rostral ventrolateral do bulbo
SH	Salina hipertônica
SHR	Ratos espontaneamente hipertensos
SFO	Órgão subfornical
SNC	Sistema nervoso central
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
VL	Ventrículo lateral
VU	Volume urinário
VUA	Volume urinário acumulativo

SUMÁRIO

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	10
2.1 Objetivo Geral.....	11
2.2 Objetivos Específicos.....	11
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1. Procedimentos experimentais <i>in vivo</i>.....	14
3.1.1. Animais.....	14
3.1.2. Denervação sinoaórtica e remoção dos corpúsculos carotídeos.....	14
3.1.3. Canulação para o registro da pressão arterial e frequência cardíaca...	15
3.1.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca.....	15
3.1.5. Testes de barorreflexo e quimiorreflexo em animais não anestesiados	15
3.1.6. Sobrecarga aguda de sódio.....	16
3.1.7. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares e renais em ratos não anestesiados.....	17
3.1.7.1. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca em animais não anestesiados.....	17
3.1.7.2. Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica.....	17

3.1.7.3. Avaliação da excreção renal de sódio.....	18
3.1.7.4. Determinação da concentração plasmática de sódio e hematócrito...	19
3.1.8. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares e simpáticos em resposta à sobrecarga aguda de sódio em ratos anestesiados.....	20
3.2. Procedimentos experimentais <i>in situ</i> – preparação coração hipotálamo tronco cerebral isolados.....	21
3.2.1. Animais.....	21
3.2.2. Solução de perfusão.....	22
3.2.3. Procedimentos cirúrgicos e perfusão da preparação.....	22
3.2.4. Registros das atividades eferentes dos nervos simpático torácico e frênico e da atividade aferente do nervo do seio carotídeo.....	24
3.2.5. Remoção dos corpúsculos carotídeos.....	25
3.2.6. Ativação do barorreflexo e quimiorreflexo na preparação <i>in situ</i>	26
3.2.7. Transecção encefálica.....	26
3.2.8. Estimulação hiperosmótica aguda e mensuração da osmolalidade do perfusato.....	26
3.2.9. Histologia	27
3.2.10. Análises dos resultados.....	27
3.2.10.1. Análises das alterações na ANSC, ANSt, ANF e PP.....	27
3.2.10.2. Respostas evocadas por ativação do quimiorreflexo e barorreflexo ou hiperosmolalidade.....	28
3.2.10.3. Análise do acoplamento entre as atividades respiratória e simpática.....	28
3.3. Protocolos experimentais.....	29
3.3.1. Avaliação da denervação sinoaórtica sobre as respostas cardiovasculares e simpáticas evocadas por sobrecarga aguda de sódio	30

3.3.2. Avaliação da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre os ajustes cardiovasculares à hipernatremia aguda.....	30
3.3.3. Avaliação da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre a excreção renal de sódio após a infusão de salina hipertônica.....	31
3.3.4. Avaliação das atividades dos nervos do seio carotídeo, simpático torácico e frênico em resposta a soluções hiperosmóticas.....	32
3.3.5. Efeitos da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre as atividades dos nervos simpático torácico e frênico em resposta à sobrecarga de sódio.....	33
3.3.6. Efeitos da descerebração sobre as atividades dos nervos simpático torácico e frênico em resposta à hiperosmolalidade.....	33
3.4. Análise Estatística.....	34
4. RESULTADOS.....	36
4.1. Resultados obtidos nos experimentos <i>in vivo</i>.....	37
4.1.1. Ajustes cardiovasculares e simpáticos induzidos por infusão de salina hipertônica em ratos controle e DSA.....	37
4.1.1.1. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca induzidas por ativação do quimiorreflexo e barorreflexo em ratos controle e DSA não anestesiados.....	37
4.1.1.2. Efeito da denervação sinoaórtica sobre as respostas cardiovasculares e simpáticas induzidas por sobrecarga de sódio em ratos anestesiados.....	40
4.1.2. Efeitos da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre os ajustes cardiovasculares e renais induzidos por sobrecarga de sódio em ratos não anestesiados.....	44
4.1.2.1. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca em resposta à ativação do barorreflexo e quimiorreflexo.....	44
4.1.2.2. Ajustes cardiovasculares induzidos por infusão de salina hipertônica em ratos controle e CCX não anestesiados.....	46

4.1.2.3. Avaliação da variabilidade da PAS.....	50
4.1.2.4. Concentração plasmática de sódio e hematócrito	52
4.1.2.5. Avaliação da excreção renal de sódio em ratos controle e CCX.....	52
4.2. Resultados obtidos nos experimentos <i>in situ</i>.....	54
4.2.1. Alterações na osmolalidade do perfusato induzidas por infusão intra arterial de soluções hiperosmóticas	54
4.2.2. Valores basais de PP, ANSt, ANSC e ANF e peso corporal dos ratos controle, CCX e descerebrados infundidos intra arterialmente com NaCl hipertônico ou manitol.....	55
4.2.3. Alterações na ANSt, ANSC e ANF induzidas por sobrecarga aguda de sódio em preparações <i>in situ</i> decorticadas de ratos controles.....	56
4.2.4. Acoplamento simpático-respiratório em ratos controle durante a sobrecarga de sódio.....	61
4.2.5. Alterações na ANSt, ANSC e ANF induzidas por infusão aguda de manitol em preparações <i>in situ</i> de ratos controle.....	64
4.2.6. Efeito da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre as alterações simpáticas e ventilatórias induzidas por sobrecarga aguda de sódio.....	67
4.2.6.1. Respostas pressoras, simpáticas e respiratórias à ativação do quimiorreflexo e barorreflexo em ratos controles e com remoção dos corpúsculos carotídeos.....	67
4.2.6.2. Contribuição dos corpúsculos carotídeos nas respostas simpática e ventilatória induzidas por hiperosmolalidade.....	70
4.2.7. Efeito da remoção do prosencéfalo sobre as alterações simpáticas e ventilatórias induzidas por sobrecarga aguda de sódio.....	73
4.2.7.1. Avaliação histológica da transecção pré colicular.....	73
4.2.7.2. Contribuição do prosencéfalo nas respostas simpáticas e ventilatórias induzidas por hiperosmolalidade.....	74
5. DISCUSSÃO.....	78

Participação dos aferentes sinoaórticos na simpatoinibição renal induzida por sobrecarga aguda de sódio.....	79
Envolvimento dos corpúsculos carotídeos nos ajustes cardiovasculares e renais induzidos por hipernatremia.....	81
Contribuição dos corpúsculos carotídeos nas respostas simpáticas e ventilatórias induzidas por hiperosmolalidade aguda.....	85
6. CONCLUSÃO.....	91
7. REFERÊNCIAS.....	93

ANEXOS

- 1. Artigo publicado relacionado à tese**
- 2. Artigos publicados não relacionados à tese**

1. INTRODUÇÃO

A manutenção da composição do meio interno é imprescindível para a homeostasia. Embora seja essencial a manutenção da concentração adequada dos diversos elementos orgânicos que constituem o organismo, é de fundamental importância a regulação da tonicidade dos compartimentos intra e extracelulares. As biomoléculas orgânicas – por exemplo, proteínas e hormônios – pouco contribuem para a osmolalidade dos fluidos corporais. Entretanto, os íons presentes em concentrações relativamente elevadas constituem as principais substâncias osmoativas.

O cátion sódio (Na^+) é o íon mais abundante no compartimento extracelular e o principal determinante de sua osmolalidade. Alterações na concentração deste íon têm impacto sobre a homeostase dos fluidos corporais. Devido à elevada concentração de Na^+ e relativa impermeabilidade através da membrana plasmática das células, alterações na concentração deste íon promove gradiente osmótico entre os compartimentos intra e extracelular, o que permite o movimento de água entre estes compartimentos, alterando, assim, a concentração do demais componentes. Como consequência, o volume, metabolismo e funções celular podem ser comprometidos (Strange, 1993). Em decorrência destas alterações celulares, perturbações agudas na osmolalidade podem induzir convulsões, coma, traumas e a morte (Arieff & Guisado, 1976; Cserr *et al.*, 1987; Andrew, 1991; Gullans & Verbalis, 1993). Neste sentido, é imprescindível para a sobrevivência, a manutenção da osmolalidade dos fluidos corporais dentro de limites estreitos de variações.

A fim de contrapor as flutuações diárias de água e sódio corporal devido à perda e ao ganho muitas vezes assíncronicos, numerosos ajustes comportamentais, neuro-hormonais e autonômicos são desencadeados pelo organismo buscando reestabelecer a homeostasia. No contexto destas respostas, o sistema nervoso central (SNC) desempenha papel crucial.

A busca por água e sódio, motivados pela sensação de sede e apetite ao sódio, compreendem os ajustes comportamentais para a correção de alterações na tonicidade dos fluidos corporais. Pequenos aumentos na osmolalidade plasmática ou perda de volume circulante são suficientes para induzir respostas

comportamentais associadas à sensação de sede. Estudos mostraram que elevações de 1 a 2% na osmolalidade plasmática ou redução de 8 a 10% no volume do compartimento extracelular são estímulos potentes para promover o consumo de água (Fitzsimons, 1998; Antunes-Rodrigues *et al.*, 2004). Além disso, a regulação da ingestão de sódio contribui para a manutenção da osmolalidade. Em humanos, a redução na concentração plasmática de sódio e volume plasmático induz o apetite ao sódio, indicando maior palatabilidade a soluções de cloreto de sódio (NaCl) hipertônico (Takamata *et al.*, 1994).

Os mecanismos para correção de aumento na osmolalidade plasmática são mediados por respostas neuroendócrinas, tais como a liberação de vasopressina (AVP) (Morris & Alexander, 1989; Yao *et al.*, 2011; Blanch *et al.*, 2013; Tucker & Stocker, 2016). A vasopressina reduz a excreção urinária de água. Além disso, a liberação de ocitocina (OT) e peptídeo natriurético atrial (ANP) aumentam a excreção renal de sódio (Morris & Alexander, 1988; Huang *et al.*, 1995; Antunes-Rodrigues *et al.* 1997).

Em adição aos ajustes hormonais e comportamentais induzidos por hiperosmolalidade, respostas autonômicas contribuem para a restauração da homeostasia. Os nervos renais integram os sistemas de ajustes neurovegetativos relacionados com o controle hidroeletrolítico. A estimulação elétrica dos nervos simpáticos renais causa redução no fluxo sanguíneo renal – por aumento na resistência vascular renal – e na taxa de filtração glomerular (Johns *et al.*, 2011), sugerindo a participação dos nervos renais no controle da hemodinâmica e função renal. Estudos mostraram que o aumento na concentração plasmática de sódio causa redução na atividade nervosa simpática renal (ANSr) (Weiss *et al.*, 1996; Pedrino *et al.*, 2008; Pedrino *et al.*, 2012). Esta resposta simpatoinibitória pode estar diretamente relacionada com o mecanismo de vasodilatação renal para aumentar a excreção de sódio, visto que a denervação renal reduz a vasodilatação renal induzida por hipernatremia (Pedrino *et al.*, 2008).

Embora esteja descrito na literatura que a hipernatremia promove simpatoinibição renal, a resposta em outros nervos relacionados com o controle vasomotor é caracterizada por acentuada simpatoexcitação, sugerindo que a

sobrecarga aguda de sódio induz ajustes simpáticos específicos por região. A administração intra vascular de solução salina hipertônica aumenta a atividade do nervo simpático lombar (ANSI) em preparações *in situ* decorticadas de ratos jovens e em experimentos *in vivo* (Brooks *et al.*, 2004; Antunes *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007; Stocker *et al.*, 2008). Ademais, estudos mostraram simpatoexcitação do nervo simpático esplâncnico em resposta à infusão intra carotídea de NaCl hipertônico (Holbein & Toney, 2015). É proposto que a elevação na atividade simpática para regiões específicas do organismo atue para promover aumento generalizado na pressão arterial e na pressão de perfusão renal, elevando, conseqüentemente, a taxa de filtração glomerular e a excreção renal de sódio (Toney *et al.*, 2003).

A estimulação hiperosmótica promovida por sobrecarga de sal ou privação hídrica aumenta a atividade nervosa simpática (ANS) para vários leitos vasculares (Antunes *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007; Colombari *et al.*, 2010; Colombari *et al.*, 2011; Holbein & Toney, 2013; Holbein & Toney 2015). Estudos utilizando preparações *in situ* de ratos demonstraram que a privação hídrica de 72 horas aumenta a ANS torácica (ANSt) marcadamente durante a inspiração, sugerindo um controle respiratório no aumento da ANS durante a hiperosmolalidade (Colombari *et al.*, 2011). Em contrapartida, Holbein & Toney (2015) demonstraram que a estimulação hiperosmótica aguda promovida por infusão intra carotídea de salina hipertônica aumenta a amplitude dos *bursts* do nervo frênico e a ANS esplâncnica (ANSs) em ratos adultos anestesiados, contudo sem alterar a sincronização inspiratória ou expiratória da ANSs (Holbein & Toney, 2015). Portanto, permanece dúvida se a resposta simpatoexcitatória à hiperosmolalidade está, de fato, associada a alterações na atividade respiratória.

Os ajustes autonômicos, assim como as respostas comportamentais e neuroendócrinas, induzidos por estímulos hiperosmóticos são mediados por neurônios osmossensíveis presentes no SNC (Thrasher *et al.*, 1982; McKinley *et al.*, 1999; McKinley *et al.*, 2004; Antunes *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007). Os osmossensores são células nervosas especializadas na detecção de alterações na pressão osmótica do fluido extracelular e transdução em sinais elétricos que recrutam outras áreas do SNC envolvidas na osmorregulação. O órgão vascular

da lâmina terminal (OVLT) e o órgão subfornical (SFO) contêm neurônios que atuam como osmorreceptores centrais. Estes órgãos estão localizados na lâmina terminal, uma região do prosencéfalo constituída por um conjunto de estruturas interconectadas ao longo da parede rostral do terceiro ventrículo. Conhecidos como órgãos circunventriculares (CVOs) – caracterizados por serem isentos de barreira hematoencefálica – os osmorreceptores centrais são densamente supridos por uma rede de capilares fenestrados (McKinley & Johnson, 2004). Portanto, os solutos circulantes têm acesso ao fluido extracelular que circunda os neurônios do OVLT e SFO.

Os osmorreceptores centrais são ativados por hiperosmolalidade. Estudos eletrofisiológicos *in vitro* e *in vivo* mostraram que o OVLT e o SFO contêm neurônios intrínsecamente osmossensíveis, os quais são excitados em resposta ao NaCl hipertônico ou manitol (Gutman *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 2000; Ciura & Bourque, 2006; Ciura *et al.*, 2011; Kinsman *et al.*, 2017). Ademais, a elevação na concentração de sódio no plasma ou no fluido cerebrospinal aumenta a expressão de cFos, um marcador de ativação neuronal, no OVLT e no SFO (Shi *et al.*, 2008; Taylor *et al.*, 2008). Funcionalmente, estes órgãos contribuem para a emissão da sensação de sede (Thrasher *et al.*, 1982; Starbuck & Fitts, 1998), liberação de vasopressina (Verney, 1947 apud Bourque *et al.*, 1994; Thrasher *et al.*, 1982; McKinley *et al.*, 2004) e ocitocina (Negoro *et al.*, 1988) e simpatoexcitação (Antunes *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2008) induzidas por hiperosmolalidade.

Buscando avaliar o envolvimento dos osmorreceptores centrais na simpatoexcitação induzida por sobrecarga de sódio, Antunes *et al.* (2006) mostraram que a secção das conexões neuronais entre os CVOs e o hipotálamo atenua a resposta simpatoexcitatória lombar induzida por hiperosmolalidade aguda em preparações *in situ*. Em ratos adultos anestesiados, a inibição dos neurônios do OVLT com muscimol (agonista dos receptores GABAa) reduz significativamente a simpatoexcitação lombar promovida por infusões intra carotídeas de salina hipertônica (Shi *et al.*, 2007). Ademais, Kinsman *et al.* (2017) mostraram recentemente que microinjeções de salina hipertônica no OVLT aumenta a ANSI, ANS adrenal (ANSa) e a pressão arterial. No mesmo trabalho os

autores mostraram que a inibição dos neurônios do OVLT com muscimol atenua a resposta simpatoexcitatória e pressórica à microinjeção intracerebroventricular de NaCl hipertônico. Estes resultados indicam que os osmorreceptores centrais são requeridos para o processamento das respostas simpáticas desencadeadas por estimulação hiperosmótica aguda.

Os neurônios osmossensíveis da lâmina terminal não regulam a ANS durante a hiperosmolalidade induzida por sobrecarga de sódio ou desidratação (privação hídrica) por meio de projeções diretas para os neurônios pré-ganglionares simpáticos. Estes neurônios têm como principal alvo eferente o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Sawchenko & Swanson, 1983; Shi *et al.*, 2008). Os neurônios do PVN, por sua vez, influenciam a ANS e a pressão arterial por meio de projeções para neurônios pré simpáticos localizados na região rostral ventrolateral do bulbo (RVLM) (Brooks *et al.*, 2004) ou diretamente para neurônios pré ganglionares simpáticos na medula espinhal (Antunes *et al.*, 2006). Assim, é postulado que as alterações na ANS decorrentes de estímulos hiperosmóticos sejam mediadas por uma via vasopressinérgica direta do PVN para a medula espinhal (Antunes *et al.*, 2006) ou por uma via glutamatérgica do PVN para a medula espinhal via RVLM (Brooks *et al.*, 2004; Stocker *et al.*, 2008).

Além dos mecanismos centrais de detecção de alterações na tonicidade e composição dos fluidos corporais, a literatura descreve o envolvimento de sensores periféricos na osmorregulação (Robertshaw, 1989; Bourque *et al.*, 1994; Morita *et al.*, 1995; Callahan *et al.* 1997; Pedrino *et al.*, 2016). Osmorreceptores periféricos são encontrados adjacentes às terminações nervosas aferentes nos vasos hepáticos, rins e intestino. Os osmorreceptores localizados nos vasos mesentéricos e no sistema hepático portal estão envolvidos com a liberação de AVP pela neuro-hipófise mediante ativação hipertônica (Baertschi & Vallet, 1981; Choi-Kwon & Baertschi, 1991). Estudos mostraram que a aplicação de xilocaína, um anestésico local, na veia porta aboliu a liberação de AVP induzida por infusão de salina hipertônica na veia portal hepática em ratos (Baertschi & Vallet, 1981). As informações osmossensitivas periféricas ascendem ao SNC via aferência vagal e alcançam neurônios bulbares do núcleo do trato solitário (NTS) (Kobashi & Adachi, 1985). Os neurônios do NTS, por sua vez, enviam projeções diretas

para o PVN (Ciriello & Calaresu; 1980), núcleo central em que são encontradas as células magnocelulares neuro-secretoras de AVP.

Os mecanorreceptores e quimiorreceptores aórticos e carotídeos são conhecidos por seu envolvimento na regulação da pressão sanguínea e da pressão parcial dos gases sanguíneos e pH (Cowley *et al.*, 1973; Guyton *et al.*, 1972; Prabhakar & Peng, 2004). Ademais, estudos mostraram que estes receptores periféricos são sensíveis a alterações na osmolalidade dos fluidos circundantes (Trzebski *et al.*, 1978; Gallego *et al.*, 1979). Estudos documentaram a participação de aferentes aórticos e carotídeos nas respostas hemodinâmicas, hormonais e autonômicas induzidas por sobrecarga de sódio (Morris & Alexander, 1988; Morris & Alexander, 1989; Pedrino *et al.*, 2011; Pedrino *et al.*, 2016). Nosso grupo de pesquisa tem se dedicado ao estudo do papel destes aferentes nos ajustes homeostáticos durante a hiperosmolalidade aguda (Pedrino *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015; Pedrino *et al.*, 2016). Pedrino *et al.* (2011) mostraram que os quimiorreceptores dos corpúsculos carotídeos são fundamentais para a recuperação cardiovascular induzida por infusão de salina hipertônica em animais hipovolêmicos. Uma vez que a ação dos quimiorreceptores foi bloqueada, não foi observada a recuperação da pressão arterial induzida por salina hipertônica em ratos hemorrágicos.

Os corpúsculos carotídeos são estruturas de origem embrionária neural (Kameda, 2005; Izal-Azcarate *et al.*, 2008) localizados bilateralmente na bifurcação da artéria carótida comum, ancorados à artéria carótida interna. São constituídos por células glomus do tipo I (células quimiossensíveis) e tipo II (células de suporte). As células tipo I, conhecidas como quimiorreceptores periféricos, respondem rapidamente a alterações na pressão parcial de O₂, CO₂ e pH (Prabhakar & Peng, 2004; Peng *et al.*, 2010; Kumar & Prabhakar, 2012). Sua função como um sensor de hipóxia arterial, foi descrita inicialmente por Heymans, em 1930, a cerca de 90 anos atrás (apud Peers *et al.*, 2010). Estudos posteriores mostraram que os corpúsculos carotídeos são mais sensíveis à hipóxia do que à hipercapnia (Eyzaguirre & Koyano, 1965; Peng *et al.*, 2010).

Atualmente, sabe-se que as células quimiossensíveis dos corpúsculos carotídeos contêm numerosas moléculas de neurotransmissores e neuromoduladores (Iturriaga & Alcayaga, 2004; Nurse, 2005; Iturriaga & Varas, 2007; Pijacka *et al.*, 2016a). Dentre elas, a acetilcolina e a adenosina são consideradas os principais transmissores excitatórios entre as células glomus tipo I e as terminações nervosas do gânglio petroso (Iturriaga & Alcayaga, 2004; Iturriaga & Varas, 2007; Pijacka *et al.*, 2016a). Estudos recentes sugerem que os mecanismos de transdução sensorial à hipóxia nas células quimiossensíveis seja mediada pelo fechamento dos canais para potássio (K^+) independente de voltagem (canais TASK) e dependente de voltagem, levando à despolarização das células glomus, influxo de íons cálcio (Ca^{++}) e liberação de transmissores excitatórios (Buckler *et al.*, 2000; Williams & Buckler, 2004; Gomez-Nino *et al.*, 2009).

A natureza aferente dos corpúsculos carotídeos decorre da inervação pelo nervo do seio carotídeo, um ramo do nervo glossofaríngeo (IX par de nervos cranianos), com os corpos celulares localizados no gânglio petroso (Smith & Mills, 1976; Fidone *et al.*, 1977). As terminações centrais destes aferentes culminam nas regiões comissural e intermediária do NTS (Panneton & Loewy, 1980; Spyer, 1981; Finley & Katz, 1992), a porta de entrada das informações produzidas pelos corpúsculos carotídeos no SNC. Essas informações são transmitidas e integradas em outras áreas centrais desencadeando respostas comportamentais, respiratórias, autonômicas e cardiovasculares à ativação dos quimiorreceptores periféricos (Moraes *et al.*, 2011; Accorsi-Mendonça *et al.*, 2015; Granjeiro *et al.*, 2016). Os ajustes cardiorrespiratórios são caracterizados por hiperventilação, aumento das descargas nervosas simpáticas para os leitos vasculares, elevação da pressão arterial e redução na frequência cardíaca (Accorsi-Mendonça *et al.*, 2015). Estudos indicam que os corpúsculos carotídeos também são sensíveis a hormônios circulantes, citocinas pro-inflamatórias, redução nos níveis de glicose e alterações na temperatura (Fung *et al.*, 2001; Pardal & Lopez-Barneo, 2002; Zhang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Kumar & Prabhakar, 2012), caracterizando a natureza polissensorial deste receptor periférico.

Dessa forma, baseado nas evidências de que aferentes sinoaórticos poderiam atuar na regulação da tonicidade dos fluidos corporais, nós hipotetizamos se os ajustes cardiorrespiratórios, renais e autonômicos durante a hiperosmolalidade aguda dependem de informações enviadas por aferentes aórticos e carotídeos. Para isso, protocolos experimentais foram realizados *in vivo* e em preparações *in situ* de ratos arterialmente perfundidos. Em relação à preparação *in situ*, a utilização desta técnica experimental permite vantagens como: ausência dos efeitos depressores da anestesia; evidente sincronização entre as atividades simpática e respiratória; avaliação simultânea de vários parâmetros eletrofisiológicos; preservação do padrão de atividades simpática e respiratória em coerência com os observados em experimentais *in vivo*, exceto pela redução na frequência respiratória; preservação dos reflexos cardiovasculares.

Em experimentos *in vivo*, as respostas na pressão arterial, ANSr e a excreção renal de sódio induzidas por infusão intravenosa de salina hipertônica foram avaliadas em ratos com denervação sinoaórtica (DSA) ou remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX). Preparações *in situ* foram utilizadas para determinar se a sobrecarga aguda de NaCl hipertônico promove aumento imediato na atividade simpática e respiratória que dependem de informações periféricas enviadas pelos corpúsculos carotídeos. Para testar esta possibilidade, infusões intra arteriais de salina hipertônica foram realizadas durante o registro das atividades do nervo simpático torácico (ANSt), nervo frênico (ANF) e nervo do seio carotídeo (ANSC). As respostas simpáticas e respiratórias aos estímulos hiperosmóticos agudos também foram avaliadas em ratos com remoção seletiva dos corpúsculos carotídeos. Além disso, a possível relação hierárquica entre mecanismos centrais e periféricos à estimulação hiperosmótica aguda foi investigada em preparações *in situ* de ratos com desconexão encefálica ao nível pré-colicular.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

No presente estudo procuramos investigar a participação dos aferentes aórtico e carotídeos nos ajustes renais, cardiovasculares, simpáticos e ventilatórios induzidos por hiperosmolalidade aguda. Para isso foram realizados protocolos experimentais *in vivo* e *in situ*. Dessa forma, nossos objetivos foram:

2.2. Objetivos Específicos:

- Determinar a contribuição dos aferentes sinoaórticos nas respostas cardiovasculares e autonômicas induzidas por infusão de salina hipertônica em ratos anestesiados.
- Determinar a contribuição dos corpúsculos carotídeos nos ajustes cardiovasculares à sobrecarga aguda de sódio em ratos não anestesiados.
- Avaliar a variabilidade da pressão arterial sistólica durante a hipernatremia aguda em ratos não anestesiados.
- Avaliar a contribuição dos corpúsculos carotídeos na excreção renal de sódio durante a hipernatremia aguda em ratos não anestesiados.
- Determinar as alterações na atividade do nervo do seio carotídeo (ANSC), ANS torácica (ANSt) e atividade do nervo frênico (ANF) induzidas por infusão de salina hipertônica em ratos jovens submetidos à preparação *in situ* coração hipotálamo tronco cerebral isolados.
- Avaliar o padrão da sincronização entre as atividades respiratória e simpática durante a sobrecarga aguda de NaCl.
- Determinar os efeitos de outro agente osmótico (manitol) sobre a ANSC, ANSt e ANF em preparação *in situ*.

- Determinar a participação dos corpúsculos carotídeos nas respostas ventilatória e simpática induzidas por infusão de salina hipertônica em preparações *in situ*.
- Determinar a contribuição do prosencéfalo nas respostas ventilatória e simpática promovidas por administração aguda de salina hipertônica em preparações *in situ*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Procedimentos experimentais *in vivo*

3.1.1. Animais

Os protocolos experimentais *in vivo* foram realizados no Centro de Pesquisa em Neurociência e Fisiologia Cardiovascular do Departamento de Ciências Fisiológicas, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás. Para os experimentos *in vivo* foram utilizados ratos Wistar pesando ente 280 a 350 g. Os animais foram mantidos em salas climatizadas (22–24 °C) com ciclo de claro escuro de 12:12 h (luzes acesas às 07:00 h) e tiveram livre acesso à comida e água de torneira. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás (número do processo: 34/12).

3.1.2. Denervação sinoaórtica e remoção dos corpúsculos carotídeos

A denervação sinoaórtica (DSA) foi realizada como descrito previamente por Krieger (1964) e a remoção seletiva dos corpúsculos carotídeos (CCX) foi feita por meio da modificação da técnica utilizada por Abdala *et al.* (2012). Inicialmente, os ratos foram anestesiados com halotano (2% em O₂; Cristália Ltda, Itapira, SP, Brasil) e fixados em decúbito dorsal. Uma incisão longitudinal (3 cm) foi feita na linha média do pescoço, para expor os músculos que recobrem a região da bifurcação da artéria carótida. Após a dissecação do músculo esternocleidomastóide, o nervo vago e o nervo laríngeo superior, assim como o gânglio simpático cervical foram identificados. Para a realização da DSA, o nervo laríngeo superior foi isolado e seccionado na junção com o nervo vago e o gânglio simpático cervical foi removido (aproximadamente 1 cm). Em seguida, as fibras e tecidos conectivos da bifurcação da carótida foram removidos. Para eliminar apenas os corpúsculos carotídeos, a bifurcação da carótida foi exposta e a artéria occipital foi retraída. O corpúsculo carotídeo foi visualizado, cuidadosamente isolado e removido. Ambos os procedimentos foram realizados bilateralmente. Os ratos controles (não denervados) foram submetidos a uma incisão longitudinal na

linha média do pescoço (3 cm) e dissecação do músculo esternocleidomastóide (isto é, cirurgia fictícia). No dia seguinte aos procedimentos cirúrgicos, os animais foram utilizados para os testes hiperosmóticos *in vivo* anestesiados ou não anestesiados.

3.1.3. Canulação para o registro da pressão arterial e frequência cardíaca

Imediatamente após a DSA ou CCX, foi realizada a canulação crônica da artéria e veia femorais para o registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e administração de substâncias, respectivamente. Para isso, os ratos foram anestesiados com halotano (2% em O₂), um cateter (PE-10 conectado a um PE-50, CPL Medicals, São Paulo, SP, Brasil) foi implantado na veia femoral direita e outro na aorta abdominal através da artéria femoral direita. As cânulas foram exteriorizadas entre as escápulas e a incisão suturada.

3.1.4. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca

Para a obtenção do registro de PAP, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT 0380, ADInstruments, Colorado Springs, EUA), o qual, por sua vez, estava acoplado a um amplificador (Bridge Amplifier ETH-200; CB Sciences, Dover, NH, EUA). Os sinais de PAP foram adquiridos por meio de um sistema de aquisição de dados (PowerLab System 8/25, ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA) em uma taxa de 2.000 amostras por segundo e registrados em computador utilizando um software apropriado (Chart Pro, versão 7.3.1., ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA). Os valores de pressão arterial média (PAM), pressão arterial diastólica (PAD), pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foram determinados a partir do sinal de PAP.

3.1.5. Testes de barorreflexo e quimiorreflexo em animais não anestesiados

Para a validação da denervação sinoaórtica ou remoção dos corpúsculos carotídeos foram realizadas infusões intravenosas de fenilefrina (agonista adrenérgico α_1 ; 1, 1,5 e 2 μg em 100 μL ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e cianeto de potássio (KCN; 40 μg em 100 μL ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), respectivamente, durante o registro da pressão arterial e frequência cardíaca nos animais acordados. Todas as injeções foram realizadas em um intervalo de cinco minutos ou até os parâmetros cardiovasculares retornarem aos níveis basais. Os ratos foram considerados baro-denervados quando apresentaram bradicardia reflexa ≤ 20 bpm em resposta a um aumento de 25–40 mmHg na PAM. A remoção dos corpúsculos carotídeos foi considerada efetiva quando a bradicardia e o aumento na PAM induzidas por ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN foram abolidos.

Para a análise do quimiorreflexo e barorreflexo foram consideradas as variações máximas de PAM e FC atingidas logo após a infusão intravenosa de KCN ou fenilefrina, respectivamente. A partir das variações máximas obtidas, a sensibilidade barorreflexa foi determinada pelo índice do barorreflexo (IB) calculado pela razão:

$$\text{IB} = \frac{\Delta\text{FC}}{\Delta\text{PAM}}$$

3.1.6. Sobrecarga aguda de sódio

No dia seguinte à DSA ou CCX, os ratos foram submetidos à sobrecarga aguda de sódio realizada por meio da infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L) através da cânula implantada na veia femoral direita. A administração foi feita durante 60 segundos em uma dose única de 1,8 mL/kg de peso corporal.

3.1.7. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares e renais em ratos não anestesiados

3.1.7.1. Registro da pressão arterial e frequência cardíaca em animais não anestesiados

O registro da PAP foi realizado através da conexão da cânula inserida na aorta abdominal através da artéria femoral direita ao sistema de registro descrito anteriormente (3.1.4.). Os sinais de PAD, PAS, PAM e FC, obtidos a partir do sinal de PAP, foram registradas por 20 a 30 minutos. Em seguida, foi realizada a infusão intravenosa de salina hipertônica e esses parâmetros foram registrados por mais 30 minutos. As alterações na pressão arterial e frequência cardíaca em resposta à infusão de salina hipertônica foram analisadas a cada dois minutos.

3.1.7.2. Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica

A análise da variabilidade da pressão arterial sistólica foi realizada com o objetivo de obter a avaliação indireta da modulação simpática sobre os vasos sanguíneos antes e após a infusão de salina hipertônica. Para isso, ratos não anestesiados tiveram a pressão arterial pulsátil registrada por um período de 30 minutos antes e após a infusão de salina hipertônica a uma aquisição de 2.000 amostras por segundo. Posteriormente, as séries temporais da PAS (batimento a batimento) foram extraídas do registro basal considerando um trecho de 10 minutos. Outros valores foram extraídos entre o trecho de 6 e 20 minutos após a infusão de salina hipertônica. A variabilidade foi avaliada no domínio da frequência usando o software CardioSeries versão 2.4 (disponível no site: www.sites.google.com/site/cardioseries/home). Para a análise, cada segmento foi constituído por 512 pontos e os componentes oscilatórios da PAS foram quantificadas em três faixas de frequência: frequência muito baixa (FMB) (*very low frequency*, de 0,0 a 0,2 Hz), baixa frequência (BF) (*low frequency*, 0,2 a 0,75 Hz) e alta frequência (AF) (*high frequency*, 0,75 a 3 Hz). As oscilações na PAS na

faixa de baixa frequência são representativas dos efeitos modulatórios simpáticos sobre a vasculatura periférica (Malliani *et al.*, 1991). As oscilações de alta frequência estão associadas aos efeitos da mecânica respiratória sobre os vasos sanguíneos e as oscilações de frequência muito baixa correspondem principalmente ao tônus vascular miogênico e fatores hormonais (Malliani *et al.*, 1991; Julien *et al.*, 2008).

3.1.7.3. Avaliação da excreção renal de sódio

Para a avaliação da excreção renal de sódio, os ratos foram colocados em gaiolas metabólicas e tiveram livre acesso à água de torneira e ração triturada por 72 horas antes de iniciar o teste hiperosmótico. No dia do teste de excreção renal, foi realizada a infusão intravenosa de salina hipertônica e a urina foi coletada aos 30, 60 e 90 minutos. As amostras coletadas foram centrifugadas a 6.600 rpm (BSC1006-R; Benchmark; Edison, NJ, EUA) e diluídas na proporção 1:1000. A concentração de sódio ($[Na^+]$) na urina foi determinada utilizando um espectrofotômetro de chama (400 Flame Photometer; Corning; comercializado atualmente por Sherwood Scientific, Cambridge, Inglaterra) e expressa em mmol/L.

O volume urinário (VU) foi calculado pelo somatório temporal das amostras coletadas e expresso como volume urinário acumulativo (VUA) em mL, de acordo com a fórmula:

$$VUA = VU' + VU'' + VU'''$$

Onde, VU', VU'' e VU''' foram os volumes urinários coletados 30, 60 e 90 minutos após a administração de salina hipertônica, respectivamente.

A quantidade de sódio excretada (eNa^+) na urina foi determinada a partir do produto entre a concentração de sódio e o volume urinário, expressa em mmol:

$$eNa^+ = [Na^+] \times VUA$$

Onde: $[Na^+]$ é a concentração urinária de sódio.

Por fim, o balanço de sódio (bNa^+) foi calculado pela diferença entre a quantidade de sódio administrada (aNa^+) pela infusão de salina hipertônica e a quantidade de sódio excretada (eNa^+), de acordo com a fórmula matemática:

$$bNa^+ = aNa^+ - eNa^+$$

Após a obtenção dos valores, o balanço de sódio foi expresso em valores percentuais (%) em relação ao sódio administrado.

Durante o teste hiperosmótico, os animais não tiveram acesso à água ou ração.

3.1.7.4. Determinação da concentração plasmática de sódio e hematócrito

A concentração plasmática de sódio e o hematócrito foram determinados antes e 10 minutos após a infusão de salina hipertônica. Para as coletas de sangue os ratos foram anestesiados com halotano (2% em O_2) e tiveram a cauda

seccionada. As amostras foram centrifugadas a 6.600 rpm (BSC1006-R; Benchmark; Edison, NJ, EUA) e diluídas na proporção de 1:1000. A concentração plasmática de sódio foi mensurada usando um espectofotômetro de chama (400 Flame Photometer; Corning; comercializado atualmente por Sherwood Scientific, Cambridge, Inglaterra). Para a determinação do hematócrito, o sangue foi coletado em capilares de vidro heparinizados (Perfecta, São Paulo, SP, Brasil) e centrifugados a 12.000 rpm (Spin 1000; Micro Spin, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para separar as células sanguíneas do plasma.

3.1.8. Avaliação dos parâmetros cardiovasculares e simpáticos em resposta à sobrecarga aguda de sódio em ratos anestesiados

Para avaliar as alterações cardiovasculares e autonômicas induzidas por infusão de salina hipertônica, os animais foram preparados cirurgicamente para obter o registro da atividade do nervo simpático renal (ANSr). Os ratos foram anestesiados com uretana (1,2 g/kg peso corporal, i.v.; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) infundida intra venosamente através da cânula inserida na veia femoral direita. A traqueostomia foi realizada a fim de reduzir a resistência das vias aéreas. Em seguida, os animais foram fixados em decúbito ventral em um aparelho estereotáxico (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA). Por meio de uma incisão retro peritoneal, o nervo renal esquerdo foi visualizado e cuidadosamente isolado. Durante todo o experimento a temperatura retal foi mantida em cerca de 37 °C com auxílio de uma cama térmica (TP700, Stryker Medical, Portage, Michigan, EUA).

A atividade simpática renal foi obtida a partir do registro do nervo renal esquerdo. O nervo renal foi posicionado em um eletrodo de prata bipolar e recoberto com óleo mineral (Nujol, Mantecorp, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) aquecido (32 °C) para evitar o ressecamento do nervo e estruturas retro peritoneais e atuar como um isolante elétrico. O sinal de ANSr foi amplificado 20.000 vezes e filtrado (30–1.000 Hz) (P511; Grass Instruments CO., Quinc, Mass, EUA). O sinal de ANSr foi digitalizado e adquirido a 2.000 amostras por

segundos utilizando um conversor analógico digital (PowerLab System, ADInstruments, Colorado Springs, CO, EUA) e registrados em computador usando o software Chart (version 7.3.1.; ADInstruments, Inc., Colorado Springs, CO, EUA). Os sinais foram retificados e integrados em intervalos de 1 segundo. Ao fim de cada experimento, o bloqueador da transmissão ganglionar hexametônio (30 mg/kg peso corporal; antagonista nicotínico; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) foi administrado intra venosamente para determinar o ruído elétrico.

Nestes experimentos, o registro da PAP foi obtido a partir do cateter inserido na aorta abdominal através da artéria femoral direita (item 3.1.4.). O registro basal da PAM, FC e ANSr foi realizado por 20 a 30 minutos. Após, salina hipertônica foi infundida intra venosamente e os parâmetros registrados por mais 60 minutos. Os valores de pressão arterial, frequência cardíaca e atividade do nervo simpático renal foram calculados como diferença em relação ao basal adquirido imediatamente anterior aos estímulos e expressos em unidades absolutas (mmHg para pressão arterial, e bpm para frequência cardíaca) ou percentual (% para atividade simpática renal) obtidos a cada 10 minutos após a sobrecarga de sódio.

3.2. Procedimentos experimentais *in situ* – preparação coração hipotálamo tronco cerebral isolados

3.2.1. Animais

Todos os protocolos experimentais *in situ* foram realizados no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual de São Paulo. Para os experimentos *in situ* foram utilizados ratos Holtzman pesando entre 60 a 100 g (28-38 dias de idade). Os animais foram mantidos em salas climatizadas (22–24 °C) com ciclo de claro escuro de 12:12 h (luzes acesas às 07:00 h) e tiveram

contínuo acesso à comida e água de torneira. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para o Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual de São Paulo (CEUA número 7/2015).

3.2.2. Solução de perfusão

O perfusato consistia em uma solução isosmótica de Ringer contendo (em mmol/L): NaCl, 120; NaHCO₃, 24; KCl, 3; CaCl₂, 2,5; MgSO₄, 1,25; KH₂PO₄, 1,25; e glicose, 10 diluída em água deionizada. Outras substâncias como um agente oncolítico (Polietileno glicol, 1,25%; Sigma Chemical Co, St Louis, MO, EUA), um bloqueador da transmissão neuromuscular (Brometo de vecurônio, 40 mg.mL⁻¹; Cristália, São Paulo, Brazil) e vasopressina (0,6–1,0 nM; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) foram adicionados à solução de perfusão. A osmolalidade do perfusato foi de 305 ± 0.6 mOsmol/kg/água.

3.2.3. Procedimentos cirúrgicos e perfusão da preparação

Preparações *in situ* foram usadas para registrar a atividade da cadeia simpática torácica, do nervo frênico e do nervo do seio carotídeo como descrito previamente (Paton, 1996; Zoccal *et al.*, 2008; Pijacka *et al.*, 2016a). Inicialmente, os ratos foram heparinizados (4.000 UI i.p.) e profundamente anestesiados com halotano (5%). O nível de anestesia foi avaliado pela ausência de resposta ao pinçamento nocivo de uma das patas ou da cauda. Em seguida, os animais foram transeccionados subdiafragmaticamente, e a cabeça e o tórax foram submergidos em solução de Ringer resfriada (2–4 °C). O córtex cerebral, hipocampo e áreas talâmicas foram removidas por cuidadosa aspiração. A área pré óptica, o núcleo septal adjacente e áreas hipotalâmicas permaneceram intactas. A pele da preparação foi completamente removida para evitar a contaminação da solução de perfusão e a obstrução do sistema de perfusão com os pêlos. A aorta descendente foi isolada, os pulmões removidos e o nervo frênico seccionado

próximo à junção com o músculo diafragma. A costela direita foi removida para facilitar o acesso à cadeia simpática paravertebral.

Após esses procedimentos cirúrgicos a preparação foi transferida para a cuba de registro. A aorta descendente foi cateterizada para a perfusão retrógrada com a solução descrita no item 3.2.2. A perfusão foi mantida por uma bomba peristáltica (modelo 502Du; Watson Marlon, Falmouth, UK) a um fluxo de 23–25 ml.min⁻¹. Adições de vasopressina (0,6–1,0 nM; Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) foram realizadas ao perfusato para aumentar a resistência vascular e, conseqüentemente, manter a pressão de perfusão (PP) entre 60–80 mmHg como previamente descrito (Zoccal *et al.*, 2008). A solução de perfusão foi constantemente gaseificada com carbogênio (95% de O₂ e 5% de CO₂) para o fornecimento de oxigênio e dióxido de carbono à preparação e manutenção do pH em torno de 7,4. Após iniciar os movimentos respiratórios, brometo de vecurônio (bloqueador da transmissão neuromuscular, 40 mg.mL⁻¹; Cristália, São Paulo, Brazil) foi adicionado ao perfusato para manter a preparação paralisada.

Antes de entrar em contato com a preparação, o perfusato foi aquecido por um trocador de calor com temperatura aproximada de 32 °C. Passou por um aparato de “armadilha para bolhas”, utilizado para evitar a passagem de bolhas para a preparação e amortecer as pulsações geradas pela bomba peristáltica. Posteriormente, a solução de perfusão foi filtrada usando um filtro nylon (tamanho do poro: 25 µm). A porção final dos tubos do sistema de perfusão consistia em um cateter com lúmen duplo (DLR-4; Braintree Scientific, Braintree, MA, USA). Um lúmen foi usado para a perfusão da preparação e o outro para o registro da pressão de perfusão. Este estava acoplado a um transdutor de pressão (MLT 0380, ADInstruments, Colorado Springs, EUA), o qual conectava com um amplificador (Projetos AVS, São Carlos, Brasil). O sinal de pressão foi digitalizado utilizando o conversor A/D (1401, CED, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Inglaterra) e registrado em um computador por meio do software Spike 2 (versão 7, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Inglaterra). A representação esquemática da preparação coração hipotálamo tronco cerebral isolados está apresentada na figura 1.

3.2.4. Registros das atividades eferentes dos nervos simpático torácico e frênico e da atividade aferente do nervo do seio carotídeo

Os experimentos foram realizados em combinações de dois ou três nervos registrados simultaneamente. Todos os registros foram obtidos utilizando eletrodos bipolares de sucção de vidro (micropipeta de vidro com diâmetro: 0,2 - 0,4 mm) acoplados a micromanipuladores 3D. O registro da atividade eferente do nervo frênico foi realizado a partir de sua extremidade distal. O padrão de despolarização crescente (em rampa) deste nervo foi considerado como indicador fisiológico da viabilidade da preparação (Paton, 1996) (Figura 1). A atividade nervosa simpática foi registrada a partir da cadeia simpática torácica, ao nível de T10-T12. O nervo do seio carotídeo foi cuidadosamente isolado na bifurcação da artéria carótida comum direita, seccionado rostralmente – próximo à inserção no nervo glossofaríngeo – e a atividade aferente foi registrada. Os sinais foram amplificados (Grass Technologies Warwick, modelo P511, RI, EUA) e filtrados (10 Hz–3 kHz para o nervo simpático torácico e nervo frênico; 1 Hz–0.3 kHz para o nervo do seio carotídeo). Os dados foram digitalizados utilizando o conversor A/D (CED, modelo 1401, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Inglaterra) e registrados por meio do software Spike2 (versão 7, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Inglaterra). Ao final de cada experimento, 2% de lidocaína foi aplicado sobre a cadeia simpática e a bifurcação da carótida comum para determinar o ruído elétrico.

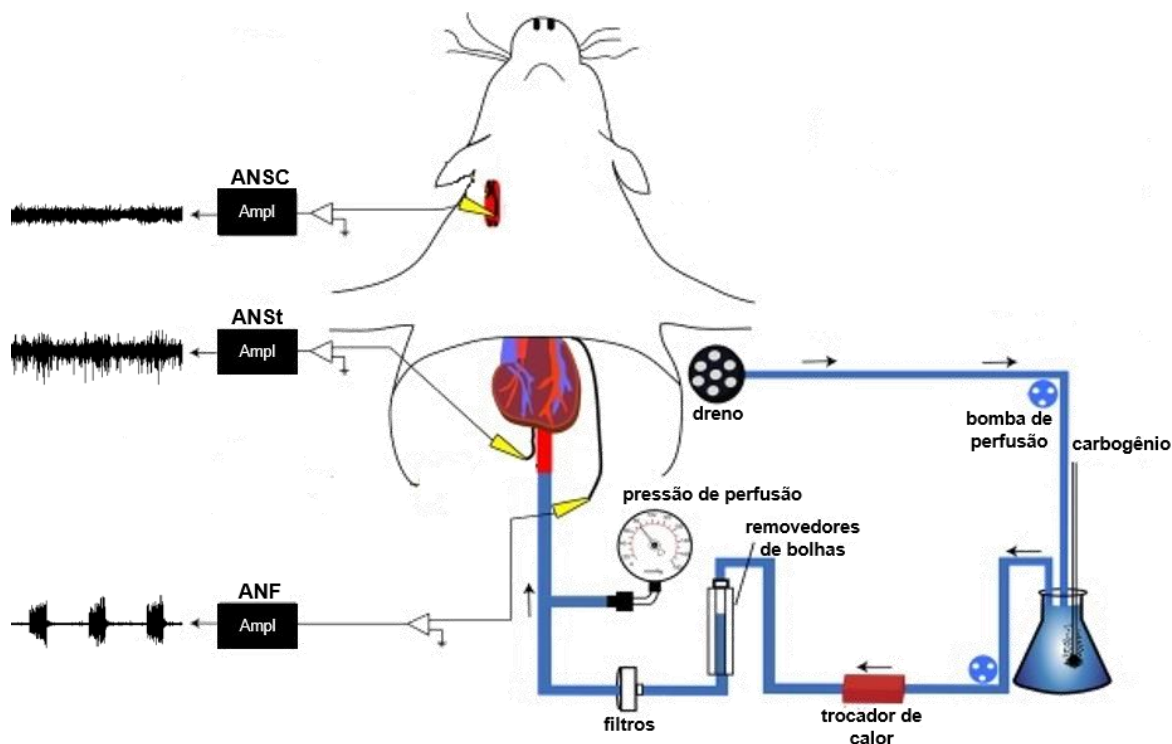


Figura 1. Representação esquemática da preparação *in situ* coração hipotálamo tronco cerebral isolados (*working heart-hypothalamus-brainstem preparation*) [adaptado de Moraes *et al.*, 2015]. Ratos decorticados e seccionados abaixo do diafragma são perfundidos retrogradamente através da aorta descendente. A solução de perfusão é gaseificada (95% de O₂ e 5% de CO₂), aquecida (32 °C) e livre de bolhas e detritos. Uma cânula de lúmen duplo permite a perfusão da preparação e o registro simultâneo da pressão de perfusão. O perfusato é drenado e recirculado. As atividades do nervo do seio carotídeo (ANSC), nervo simpático torácico (ANSt) e nervo frênico (ANF) foram registradas simultaneamente. Ampl, amplificador.

3.2.5. Remoção dos corpúsculos carotídeos

Ratos foram submetidos à remoção dos corpúsculos carotídeos ou cirurgia fictícia como descrito detalhadamente no item 3.1.2. No dia seguinte (aproximadamente 24 horas), os animais foram preparados para a técnica da preparação *in situ* coração hipotálamo tronco cerebral isolados.

3.2.6. Ativação do barorreflexo e quimiorreflexo na preparação *in situ*

A efetividade da remoção dos corpúsculos carotídeos foi avaliada nas preparações *in situ* por meio da administração intra arterial de fenilefrina (agonista adrenérgico α_1 ; 10 μg em 100 μL ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) e cianeto de potássio (KCN; 25 μg em 50 μL ; Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA), respectivamente. Para isso, duas seringas foram acopladas ao sistema de perfusão da preparação *in situ*, próximo à entrada da aorta. Uma seringa foi utilizada para a injeção intra arterial de fenilefrina e outra para KCN. Os animais foram considerados com efetiva remoção dos corpúsculos carotídeos quando a taquipneia, simpatoexcitação e aumento na PP induzidas por ativação dos quimiorreceptores periféricos foram totalmente abolidos.

3.2.7. Transecção encefálica

Preparações *in situ* decorticadas de ratos não denervados foram submetidos à transecção pré colicular para a remoção do prosencéfalo. Para tanto, uma lâmina de bisturi cirúrgico foi posicionada rostral ao colículo superior e utilizada para a transecção encefálica. O nível da transecção foi avaliado por análise histológica.

3.2.8. Estimulação hiperosmótica aguda e mensuração da osmolalidade do perfusato

As preparações *in situ* foram constantemente perfundidas com a solução de perfusão. As estimulações hiperosmóticas agudas foram realizados por meio de infusões adicionais de salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7; 1,5 e 2 mol/L) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA) ou manitol (0,3; 0,5; 1; 2,7 e 3,8 mol/L) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). A solução de Ringer foi usada como controle e infundida previamente aos estímulos hiperosmóticos. As infusões foram realizadas intra arterialmente através de seringas acopladas ao sistema de

perfusão, próximo à entrada na aorta. As infusões das diferentes concentrações de soluções hiperosmóticas foram feitas em ordem ascendente acumulativas. O volume administrado foi de 200 μ L durante aproximadamente 20 segundos, com intervalo de 10 minutos entre cada infusão. Assim, 200 μ L de solução salina hipertônica ou manitol foram adicionados ao perfusato a cada 10 minutos por meio de injeções intra arteriais. Amostras do perfusato (1.000 μ L) foram coletadas antes de iniciar as infusões hiperosmóticas e após cada infusão de salina hipertônica ou manitol para mensurar a osmolalidade do perfusato usando um osmômetro baseado em ponto de congelamento (Camlab, Roebing Micro-osmometer, Cambridge, Inglaterra).

3.2.9. Histologia

Ao final dos experimentos utilizando preparações *in situ* com transecção encefálica, os encéfalos foram removidos para análise histológica e fixados por três dias em solução de formaldeído (10%; LabSynth, Diadema, SP, Brasil). Posteriormente, os cortes foram congelados, cortados sagitalmente em espessura de 100 μ m com auxílio de um criostato (Leica, CM1850 UV; Wetzlar, Hesse, Alemanha) e montados em lâminas de vidro. As lâminas histológicas foram fotografadas e o nível da transecção analisado.

3.2.10. Análises dos resultados

As análises da atividade do nervo do seio carotídeo, simpático torácico e frênico foram realizadas a partir dos sinais retificados e integrados (50 ms) usando o software Spike2 (versão 7, Cambridge Electronic Design, Cambridge, Inglaterra).

3.2.10.1. Análises das alterações na ANSC, ANSt, ANF e PP

As alterações na ANSC, ANSt, ANF e PP em resposta à ativação do quimiorreflexo e barorreflexo ou à infusão intra arterial de soluções hiperosmóticas, foram analisadas por meio da variação absoluta ou percentual em relação aos valores basais adquiridos imediatamente anterior a cada estímulo. Respostas evocadas no nervo simpático torácico e nervo do seio carotídeo foram avaliadas como valores médios e expressas como percentual (%) em relação ao basal após a subtração do ruído. A frequência de descargas do nervo frênico foi determinada pelo intervalo entre consecutivos disparos do frênico e as alterações foram mensuradas como diferença em relação ao basal em valores absolutos (cpm: ciclos por minutos). A amplitude das descargas do nervo frênico foi determinada a partir do pico de amplitude e as alterações foram expressa pela diferença em relação ao basal em unidades absolutas (μ V: microvolts). As alterações na PP foram expressas pela diferença em relação ao basal em valores absolutos (mmHg).

3.2.10.2. Respostas evocadas por ativação do quimiorreflexo e barorreflexo ou hiperosmolalidade

As respostas à ativação dos quimiorreceptores periféricos foram analisadas por três ciclos respiratórios (isto é, três disparos consecutivos do nervo frênico) imediatamente após a infusão de KCN. As análises das alterações induzidas pela ativação dos barorreceptores arteriais foram realizadas no momento em que a pressão de perfusão atingiu valores máximos após a infusão de fenilefrina. As respostas evocadas por solução de Ringer, salina hipertônica ou manitol foram avaliadas durante o período de infusão, especificamente no momento em que as alterações em cada nervo registrado foram mais pronunciadas. Os valores adquiridos nos diferentes parâmetros analisados foram representados em tabelas ou gráficos. Os gráficos foram construídos utilizando o software GraphPad Prism (v6; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA).

3.2.10.3. Análise do acoplamento entre as atividades respiratória e simpática

Os registros das atividades dos nervos frênico e simpático torácico foram utilizados para a análise do padrão da atividade simpática ao longo do ciclo respiratório durante a infusão de solução de Ringer e salina hipertônica 2 mol/L. Os valores de atividade simpática foram calculados a partir de um ciclo respiratório, coincidente com a resposta simpática máxima. Para a análise, o sinal de atividade simpática foi dividido em três segmentos de acordo com o sinal de atividade do nervo frênico, a saber: expiração final (EF; 0,3 segundos antes do disparo do nervo frênico); inspiração (IP; coincidente com o disparo do frênico); e pós inspiração (PI; a partir do silenciamento do frênico até a fase EF) (Figura 2). A atividade simpática em cada fase respiratória foi mensurada como média e expressa em unidades absolutas (μV).

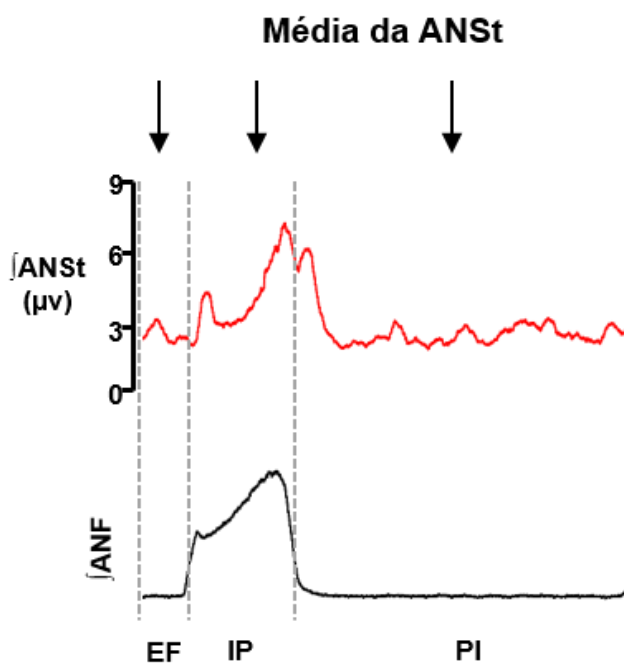


Figura 2. Análise do padrão de atividade simpática durante o ciclo respiratório. A atividade nervosa simpática (ANSt) foi dividida em três partes a partir do sinal de atividade do nervo frênico (ANF): expiração final (EF), inspiração (IP) e pós inspiração (PI). A média da ANSt foi adquirida em cada segmento e expressa em valores absolutos (μV).

3.3. Protocolos experimentais

3.3.1. Avaliação da denervação sinoaórtica sobre as respostas cardiovasculares e simpáticas evocadas por sobrecarga aguda de sódio

Os ratos foram inicialmente submetidos à cirurgia fictícia (CF) (n=6) ou à DSA (n=6). Quatro horas após a recuperação da anestesia, os testes de barorreflexo e quimiorreflexo foram feitos para a validação da denervação. No dia seguinte, aproximadamente 24 horas após à realização da DSA ou cirurgia fictícia, foi realizada a infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal, em 60 segundos) enquanto a PA, FC e ANSr eram registradas nos animais anestesiados (ver Figura 3).

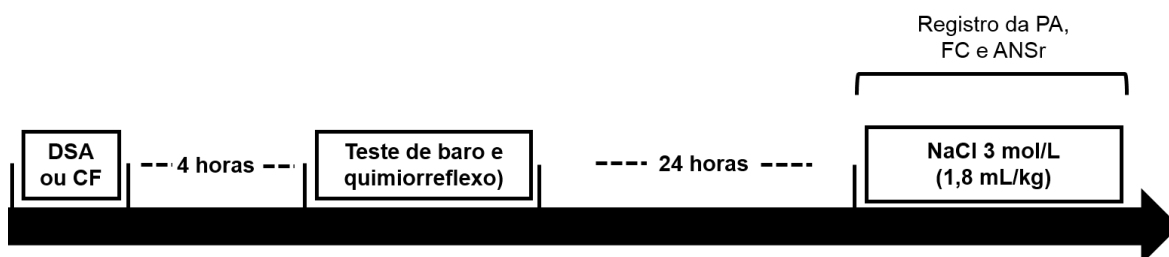


Figura 3. Protocolo experimental realizado para avaliar o efeito da denervação sinoaórtica (DSA) sobre os ajustes cardiovasculares e simpáticos induzidos por sobrecarga aguda de sódio. CF, cirurgia fictícia.

3.3.2. Avaliação da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre os ajustes cardiovasculares à hipernatremia aguda

Os ratos foram previamente submetidos à CF (n=7) ou à CCX (n=6). Quatro horas após recuperarem-se da anestesia, foram realizados os testes de barorreflexo e quimiorreflexo. No dia seguinte, foi realizada a infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal, em 60 segundos) e a PA e FC foram registradas nos animais não anestesiados (Figura 4).

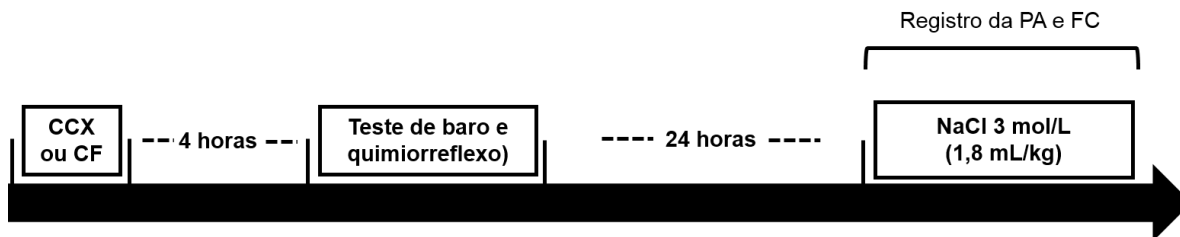


Figura 4. Protocolo experimental realizado para avaliar o efeito da remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) sobre os ajustes cardiovasculares induzidos por sobrecarga aguda de sódio em ratos acordados. CF, cirurgia fictícia.

3.3.3. Avaliação da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre a excreção renal de sódio após a infusão de salina hipertônica

Os ratos foram inicialmente submetidos à CF (n=5) ou à CCX (n=8). Quatro horas após recuperarem-se da anestesia, foram realizados os testes de barorreflexo e quimiorreflexo. Os animais foram colocados em gaiolas metabólicas e mantidos por 24 horas para aclimação. Nas 48 horas seguintes foram realizadas duas coletas de urina, sendo cada coleta em intervalos de 24 horas. Durante este período, os animais tiveram livre acesso à água de torneira e ração triturada. No dia do desafio hiperosmótico, os animais receberam infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal, em 60 segundos) e tiveram a urina coletada após 30, 60 e 90 minutos. (Figura 5).

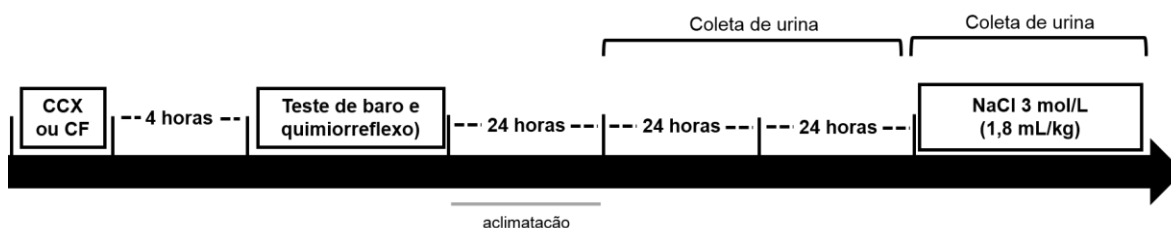


Figura 5. Delineamento experimental para avaliar o efeito da remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) sobre a excreção renal de sódio após a infusão de salina hipertônica em ratos acordados.

3.3.4. Avaliação das atividades dos nervos do seio carotídeo, simpático torácico e frênico em resposta a soluções hiperosmóticas

A ANSC, ANSt e ANF foram registradas em preparações *in situ* decorticadas de ratos controles (não denervados; n=6-16/grupo). Primeiramente, a responsividade das atividades dos nervos registrados à ativação do barorreflexo arterial e quimiorreflexo periférico foi avaliada para comparação com os animais CCX. Esses testes foram realizados por infusão intra arteriais de fenilefrina e KCN, respectivamente, em intervalos de cinco minutos. Após um período de aproximadamente 10 minutos para o retorno dos parâmetros avaliados aos níveis basais, as alterações na ANSC, ANSt e ANF foram avaliadas em resposta à infusão intra arterial de solução de Ringer. Em seguida, foram realizados testes hiperosmóticos por meio de infusões de diferentes concentrações de salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7; 1,5 e 2 mol/L) ou manitol (0,3; 0,5; 1; 2,7 e 3,8 mol/L) em ordem ascendente e acumulativa através do cateter inserido na aorta descendente (Figura 6).

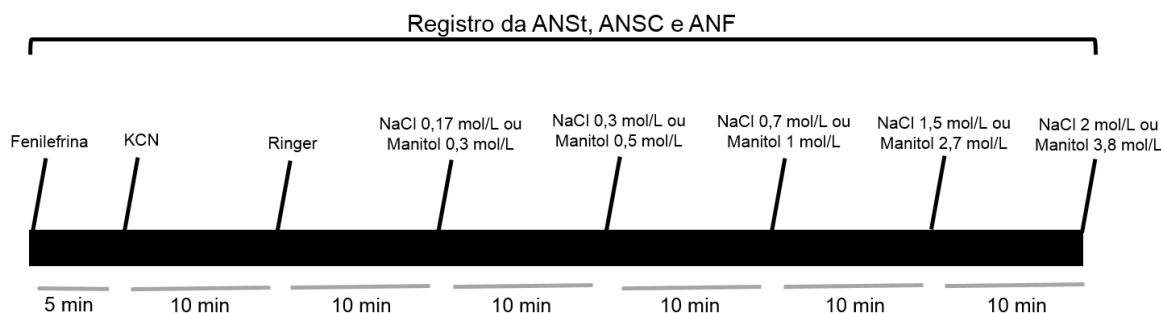


Figura 6. Protocolos experimentais realizados para avaliar as atividades do nervo do seio carotídeo (ANSC), simpático torácico (ANSt) e frênico (ANF) em resposta à estimulação hiperosmótica aguda por meio da infusão intra arterial de salina hipertônica (NaCl 0,17, 0,3, 0,7, 1,5 e 2 mol/L) ou manitol (0,3, 0,5, 1, 2,7 e 3,8 mol/L) em preparações *in situ* de ratos controles.

3.3.5. Efeitos da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre as atividades dos nervos simpático torácico e frênico em resposta à sobrecarga de sódio

Ratos ($n=5$) foram inicialmente submetidos à CCX. No dia seguinte à realização dos procedimentos cirúrgicos (aproximadamente 24 h), os animais foram usados para o registro da ANSt e ANF em preparação *in situ* decorticadas. Infusões intra arteriais de fenilefrina e KCN foram realizadas para avaliar a sensibilidade baroreflexa e confirmar a remoção dos corpúsculos carotídeos, respectivamente. Após os parâmetros avaliados retornarem aos valores basais, foram realizadas infusões de solução de Ringer e salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7; 1,5 e 2 M) (Figura 7).

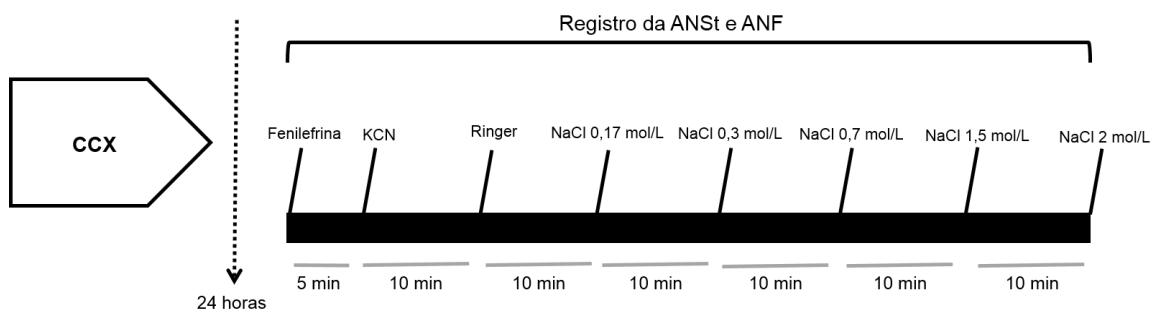


Figura 7. Protocolo experimental realizado para determinar o efeito da remoção do corpúsculo carotídeo (CCX) sobre as alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt) e frênico (ANF) induzidas por sobrecarga aguda de sódio (NaCl 0,17, 0,3, 0,7, 1,5 e 2 mol/L).

3.3.6. Efeitos da descerebração sobre as atividades dos nervos simpático torácico e frênico em resposta à hiperosmolalidade

Inicialmente, ratos ($n=6$) foram usados para obter preparações *in situ* decorticadas e tiveram a ANSt e ANF registradas. Para avaliar os efeitos da descerebração sobre as respostas simpáticas e respiratórias induzidas por hiperosmolalidade, os encéfalos dessas preparações foram transeccionados ao nível pré colicular, rompendo as conexões neuronais entre o prosencéfalo e o

tronco encefálico. Após um período de estabilização dos parâmetros eletrofisiológicos (aproximadamente 20 minutos), solução de Ringer e salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7; 1,5 e 2 M) foram infundidas intra arterialmente (Figura 8).

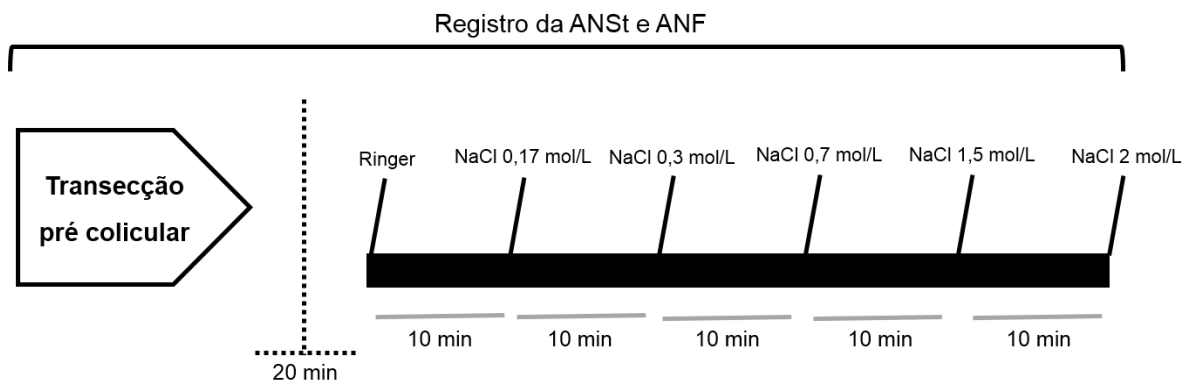


Figura 8. Delineamento experimental utilizado para avaliar os efeitos da remoção do prosencéfalo (por transecção pré colicular) sobre as alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt) e frênico (ANF) induzidas por infusão intra arterial de salina hipertônica (NaCl 0,17, 0,3, 0,7, 1,5 e 2 mol/L).

3.4. Análise Estatística

Resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). As operações gráficas e as análises estatísticas foram realizadas usando o software GraphPad Prism (v6; GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, EUA). O teste *t* de Student não pareado foi utilizado para a comparar uma variável entre dois grupos, como os valores basais de PAM, FC e ANSr, o peso corporal e as respostas evocadas por ativação do barorreflexo e quimiorreflexo entre os grupos controle e CCX ou grupos controle e DSA. O teste *t* de Student pareado foi usado para a comparação de duas amostras pareadas, tal como a comparação das alterações no acoplamento simpático-respiratório durante a infusão de Ringer e salina hipertônica 2 mol/L. Anova *one way*, seguido pelo pós teste de Tukey, foi usada para comparar uma variável em mais de dois grupos diferentes, tais como

os valores basais dos parâmetros analisados na preparação *in situ* entre os grupos controle, CCX e descerebrados. Anova *one way* para medidas repetidas, seguido pelo pós teste de Tukey, foi utilizada para comparar mais de duas amostras dependentes, como as alterações na ANSt, ANF, ANSC induzidas por infusão de solução de Ringer, diferentes concentrações de salina hipertônica ou manitol e KCN, e as alterações na osmolalidade do perfusato promovidas por infusões de salina hipertônica ou manitol. Anova *two way*, seguido pelo pós teste de Bonferroni ou de Fisher, foi usada para comparar mais de uma variável como as respostas evocadas na ANSt e ANF por infusão intra arterial de solução de Ringer e salina hipertônica entre os grupos na preparação *in situ*, o efeito temporal da infusão intravenosa de salina hipertônica sobre a pressão arterial, FC, ANSr, excreção renal e concentração plasmática de sódio nos experimentos *in vivo*. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Resultados obtidos nos experimentos *in vivo*

4.1.1. Ajustes cardiovasculares e simpáticos induzidos por infusão de salina hipertônica em ratos controle e DSA

4.1.1.1. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca induzidas por ativação do quimiorreflexo e barorreflexo em ratos controle e DSA não anestesiados

Os animais DSA não anestesiados apresentaram níveis elevados de PAM e FC basal (ver Tabela 1). Não houve diferença no peso corporal entre ratos controle e DSA.

Tabela 1. Valores basais de PAM e FC e o peso corporal de ratos controle e DSA não anestesiados.

Grupos	PAM (mmHg)	FC (bpm)	p.c. (g)
Controle	109 ± 1	350 ± 8	324 ± 5
DAS	123 ± 4 [†]	412 ± 18 [†]	316 ± 4

Valores estão expressos como média ± EPM. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; p.c., peso corporal; DSA, denervação sinoaórtica. Controle, n=6; DSA, n=6. Diferenças analisadas usando teste t de Student não pareado. [†]diferente do controle. p < 0,05.

O teste de barorreflexo realizado por meio da infusão intravenosa de fenilefrina mostrou significativa redução na sensibilidade barorreflexa em ratos

DSA ($-0,43 \pm 0,05 \Delta \text{ bpm}/\Delta \text{ mmHg}$ vs. ratos controle: $-2,06 \pm 0,09 \Delta \text{ bpm}/\Delta \text{ mmHg}$; $p < 0,05$) (Figuras 9 A e C).

Nos animais controle a ativação do quimiorreflexo periférico por meio da administração de KCN provocou aumento na PAM (Δ : $61 \pm 5 \text{ mmHg}$) e bradicardia (Δ : $-186 \pm 9 \text{ bpm}$). Nos ratos DSA as alterações na PAM e FC foram completamente abolidas ($-9 \pm 5 \text{ mmHg}$ e $-10 \pm 2 \text{ bpm}$, respectivamente; $p < 0,05$) (Figuras 9 B, D e E).

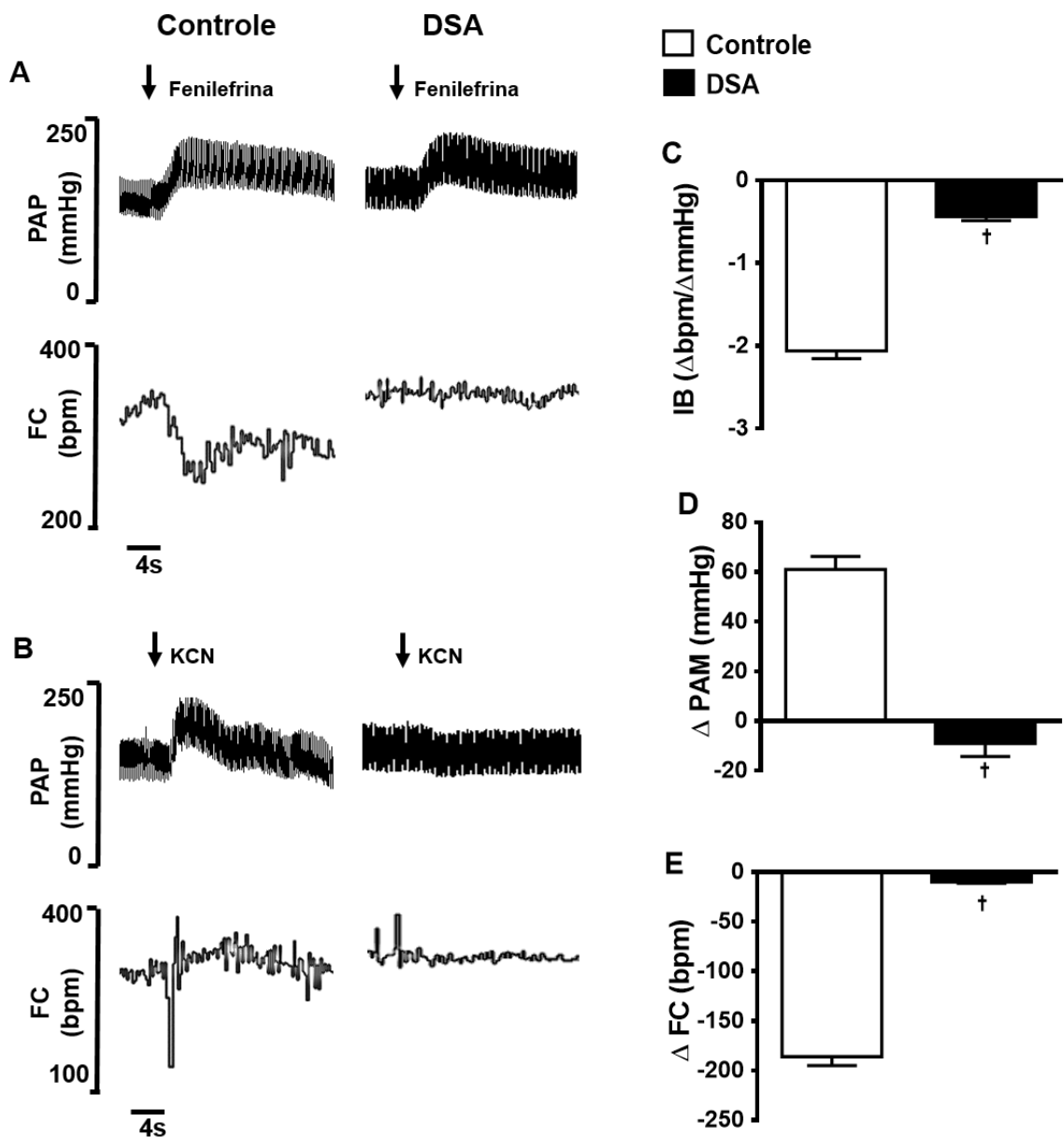


Figura 9. Registros da pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato controle e de um rato submetido à denervação sinoaórtica (DSA) durante a ativação do barorreflexo (A) e quimiorreflexo (B) por infusão intravenosa de fenilefrina (2 μ g em 100 μ L) e cianeto de potássio (KCN, 40 μ g em 100 μ L), respectivamente. As setas pretas acima dos registros indicam o momento das infusões. Índice de barorreflexo (IB) (C) calculado pela razão entre as alterações na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) induzidas por infusão intravenosa de fenilefrina (1, 1,5 e 2 μ g em 100 μ L). Alterações na PAM (D) e FC (E) provocadas por infusão de cianeto de potássio (KCN; 40 μ g em 100 μ L). Diferenças foram analisadas usando o teste *t* de Student não pareado. † diferente do controle. *p* < 0,05. *n*=6/grupo

4.1.1.2. Efeito da denervação sinoaórtica sobre as respostas cardiovasculares e simpáticas induzidas por sobrecarga de sódio em ratos anestesiados

Os valores basais de PAM, FC e ANSr obtidos em ratos anestesiados estão mostrados na tabela 2. Estas variáveis foram similares entre ratos controles e DSA.

Tabela 2. Valores basais de PAM, FC e ANSr em ratos controle e DSA anestesiados.

Grupos	PAM (mmHg)	FC (bpm)	ANSr (a.u.)
Controle	105 ± 5	416 ± 6	0,0689 ± 0,0093
DSA	104 ± 7	388 ± 11	0,0627 ± 0,0110

Valores estão expressos como média ± EPM. PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; ANSr, atividade do nervo simpático renal; DSA, denervação sinoaórtica. Controle, n=6; DSA, n=6. Diferenças analisadas usando teste t de Student não pareado.

No grupo controle, a infusão de salina hipertônica (SH) não causou alterações significativas na PAM (Δ : 11,8 ± 4,3 mmHg, 10 minutos após a SH) (Figuras 10 e 11 A). Nos ratos DSA, a infusão de salina hipertônica causou transiente resposta pressora (13,6 ± 3,1 mmHg do basal, 10 minutos após a SH; p < 0,05), retornando ao basal 20 minutos após a salina hipertônica (6,8 ± 4,2 mmHg do basal) (Figuras 10 e 11 A). Nos ratos controle, houve redução na FC 10 minutos após a infusão de SH (20,1 ± 7,2 bpm do basal; p < 0,05), enquanto nos ratos DSA não foi observada bradicardia transiente após a sobrecarga de NaCl (-3,3 ± 4,9 bpm do basal, 10 minutos após a SH) (Figuras 10 e 11 B).

Nos ratos controle, a ANSr diminui 10 minutos após a infusão de salina hipertônica (-34,4 ± 10,3 % do basal; p < 0,05) e permaneceu reduzida durante todo o período experimental (-28,7 ± 4,8 % do basal, 60 minutos após a SH; p <

0,05) (Figuras 10 e 11 C). Nos ratos DSA, a redução na ANSr induzida por salina hipertônica foi abolida ($-3,7 \pm 2,7$ % e $-10,7 \pm 5,5$ % do basal, 10 e 60 minutos após a SH, respectivamente) (Figuras 10 e 11 C).

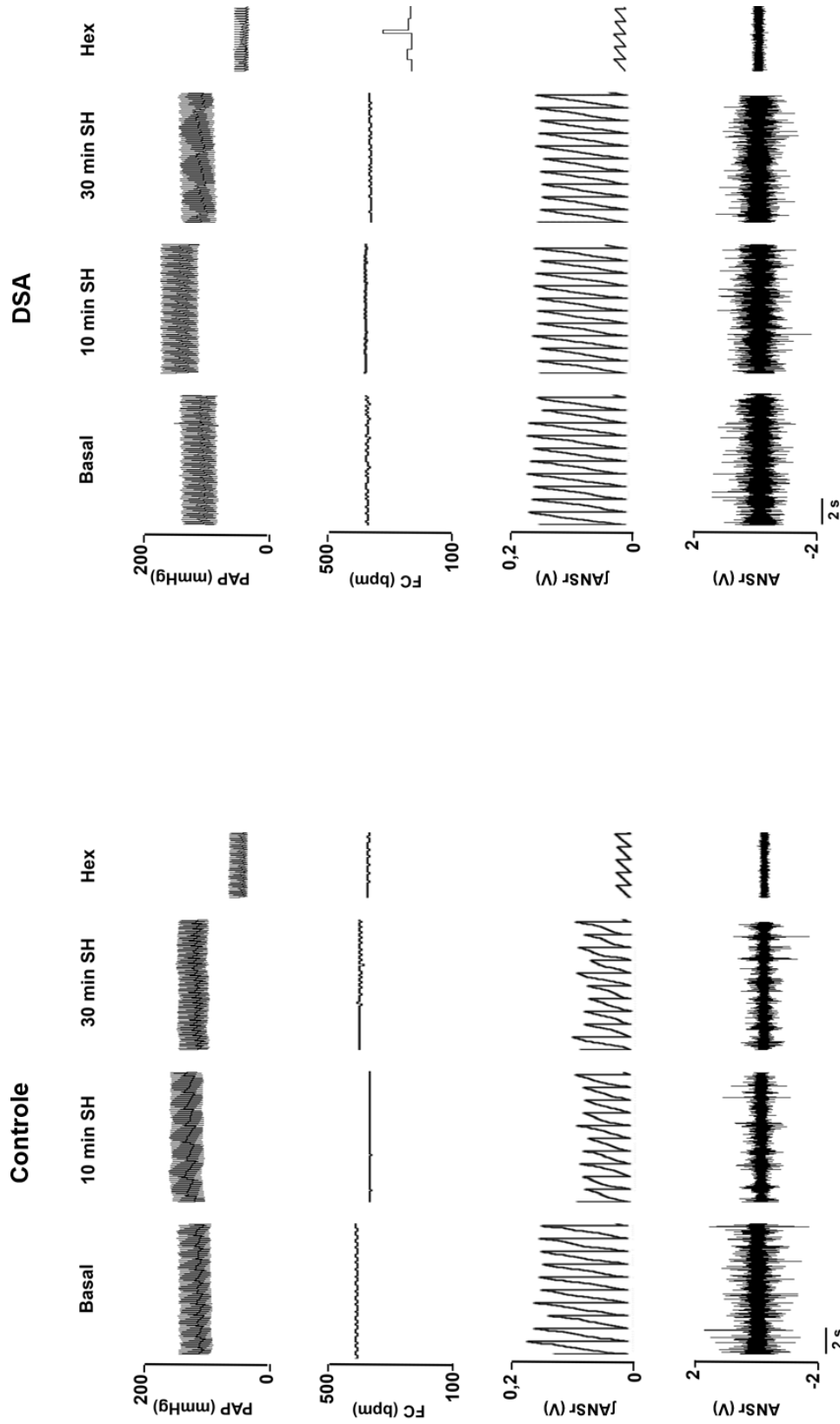


Figura 10. Registros da pressão arterial pulsátil (PAP), frequência cardíaca (FC), bruto e integrado (J) da atividade do nervo simpático renal (ANSr) de um rato controle e um rato com denervação sinoaórtica (DSA) anestesiados. Os traçados representativos mostram a PAP, FC e ANSr durante o basal e em resposta à infusão intravenosa de salina hipertônica (SH; 10 e 30 minutos após SH) (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal). O ruído elétrico foi determinado após a infusão de hexametônio (Hex; 30 mg/kg de peso corporal).

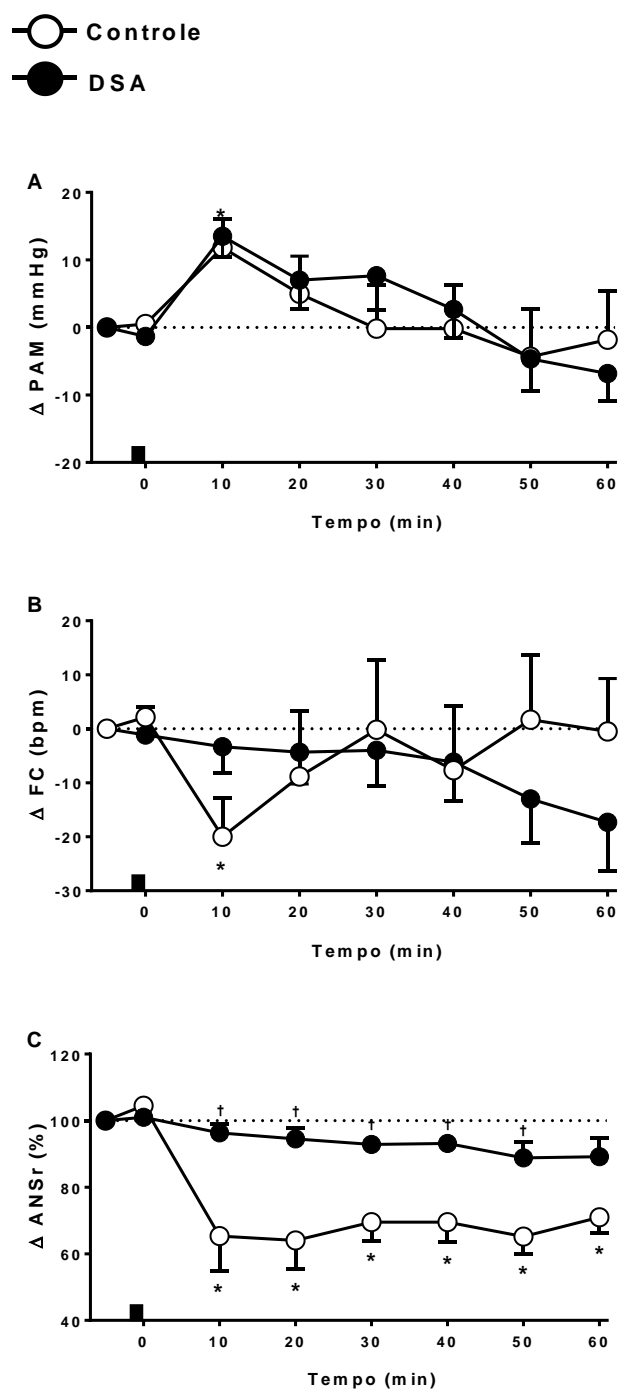


Figura 11. Efeitos da infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal) sobre a pressão arterial média (PAM; **A**), frequência cardíaca (FC; **B**) e atividade do nervo simpático renal (ANSr; **C**) em ratos controle (n=6) e submetidos à denervação sinoaórtica (DSA; n=6). As barras pretas indicam o momento da infusão de salina hipertônica. Dados foram analisados utilizando Anova *two way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. *diferente do basal. †diferente do controle. $p < 0,05$.

4.1.2. Efeitos da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre os ajustes cardiovasculares e renais induzidos por sobrecarga de sódio em ratos não anestesiados

4.1.2.1. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca em resposta à ativação do barorreflexo e quimiorreflexo

A ativação do barorreflexo por meio da infusão de fenilefrina mostrou discreta redução na sensibilidade barorreflexa em ratos submetidos à remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX: $-1,65 \pm 0,06 \Delta \text{ bpm}/\Delta \text{ mmHg}$ vs. controle: $-1,98 \pm 0,08 \Delta \text{ bpm}/\Delta \text{ mmHg}$; $p < 0,05$) (Figura 12 A e C).

Nos ratos controle, a ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN aumentou a PAM (Δ : $38 \pm 5 \text{ mmHg}$) e reduziu a FC (Δ : $-131 \pm 15 \text{ bpm}$). No grupo CCX, as alterações na PAM e FC foram abolidas ($-9 \pm 2 \text{ mmHg}$ e 15 ± 2 ; $p < 0,05$) (Figura 12 B, D e E).

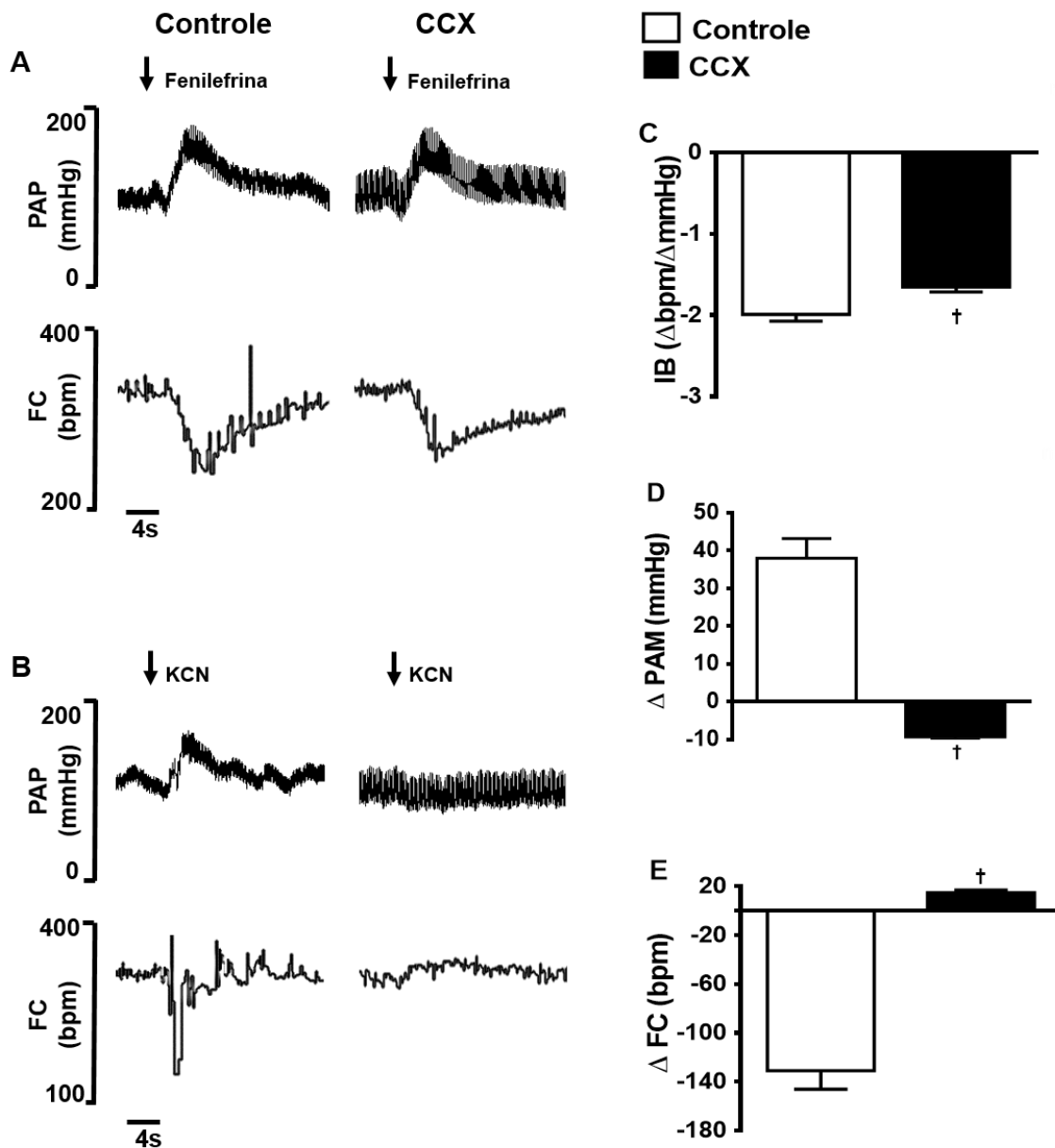


Figura 12. Registros da pressão arterial pulsátil (PAP) e frequência cardíaca (FC) de um rato controle e de um rato submetido à remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) durante o teste de barorreflexo (A) e quimiorreflexo (B) realizados por meio da infusão intravenosa de fenilefrina (2 μg em 100 μL) e cianeto de potássio (KCN, 40 μg em 100 μL), respectivamente. As setas pretas acima dos registros indicam o momento das infusões. Índice de barorreflexo (IB) (C) calculado pela razão entre as alterações na frequência cardíaca (FC) e pressão arterial média (PAM) induzidas por infusão intravenosa de fenilefrina (1, 1,5 e 2 μg em 100 μL). Alterações na PAM (D) e FC (E) provocadas por infusão de cianeto de potássio (KCN; 40 μg em 100 μL). Diferenças foram analisadas usando o teste *t* de Student não pareado. [†]diferente do controle. $p < 0,05$. (Controle, $n=10$) (CCX, $n=15$).

4.1.2.2. Ajustes cardiovasculares induzidos por infusão de salina hipertônica em ratos controle e CCX não anestesiados

Os valores basais de PAD, PAS, PAM e FC e o peso corporal dos ratos controle e CCX estão apresentados na tabela 3. Não foram encontradas diferenças estatísticas nestes parâmetros entre ratos controle e CCX.

Tabela 3. Valores basais de PAD, PAS, PAM e FC e o peso corporal dos ratos controle e CCX.

Grupos	PAD (mmHg)	PAS (mmHg)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	p.c. (g)
Controle	98,8 ± 3,1	124,1 ± 5,8	107,8 ± 3,7	333,1 ± 10,3	308 ± 8
CCX	91,3 ± 3,2	112,9 ± 6,8	98,3 ± 5,2	330,6 ± 8,9	293 ± 9

Valores estão expressos como média ± EPM. PAD, pressão arterial diastólica; PAS, pressão arterial sistólica; PAM, pressão arterial média; FC, frequência cardíaca; p.c., peso corporal; CCX, remoção dos corpúsculos carotídeos. Controle, n=7; CCX, n=6. Diferenças analisadas usando teste t de Student não pareado.

Nos ratos controle, a infusão intravenosa de salina hipertônica promoveu aumento sustentado na PAD (Δ : 18,1 ± 4 e 8,1 ± 2,4 mmHg, 2 e 28 minutos após SH, respectivamente; $p < 0,05$), PAS (Δ : 25,3 ± 4,5 e 10 ± 1 mmHg, 2 e 20 minutos após SH, respectivamente; $p < 0,05$) e PAM (Δ : 20,5 ± 4,2 e 7,1 ± 2,1 mmHg, 2 e 28 minutos após SH, respectivamente; $p < 0,05$) (Figuras 13 e 14 A-C). Ratos CCX, apresentaram similar pico de resposta pressora (Δ PAD: 16,8 ± 2,8, mmHg, PAS: 20,9 ± 3,4 mmHg e PAM: 18,2 ± 3 mmHg, 2 minutos após SH; $p < 0,05$), porém, com breve retorno aos valores basais (Δ PAD: 4,5 ± 2,2 mmHg, PAS: 5,5 ± 2,6 mmHg e PAM: 4,8 ± 2,1 mmHg, 16 minutos após SH) (Figuras 13 e 14 A-C).

Em ambos os grupos controle e CCX houve redução na FC após a infusão de salina hipertônica ($-32,9 \pm 4,5$ e $-31,8 \pm 5$ bpm, respectivamente, 12 minutos após a SH; $p < 0,05$) (Figuras 13 e 14 D).

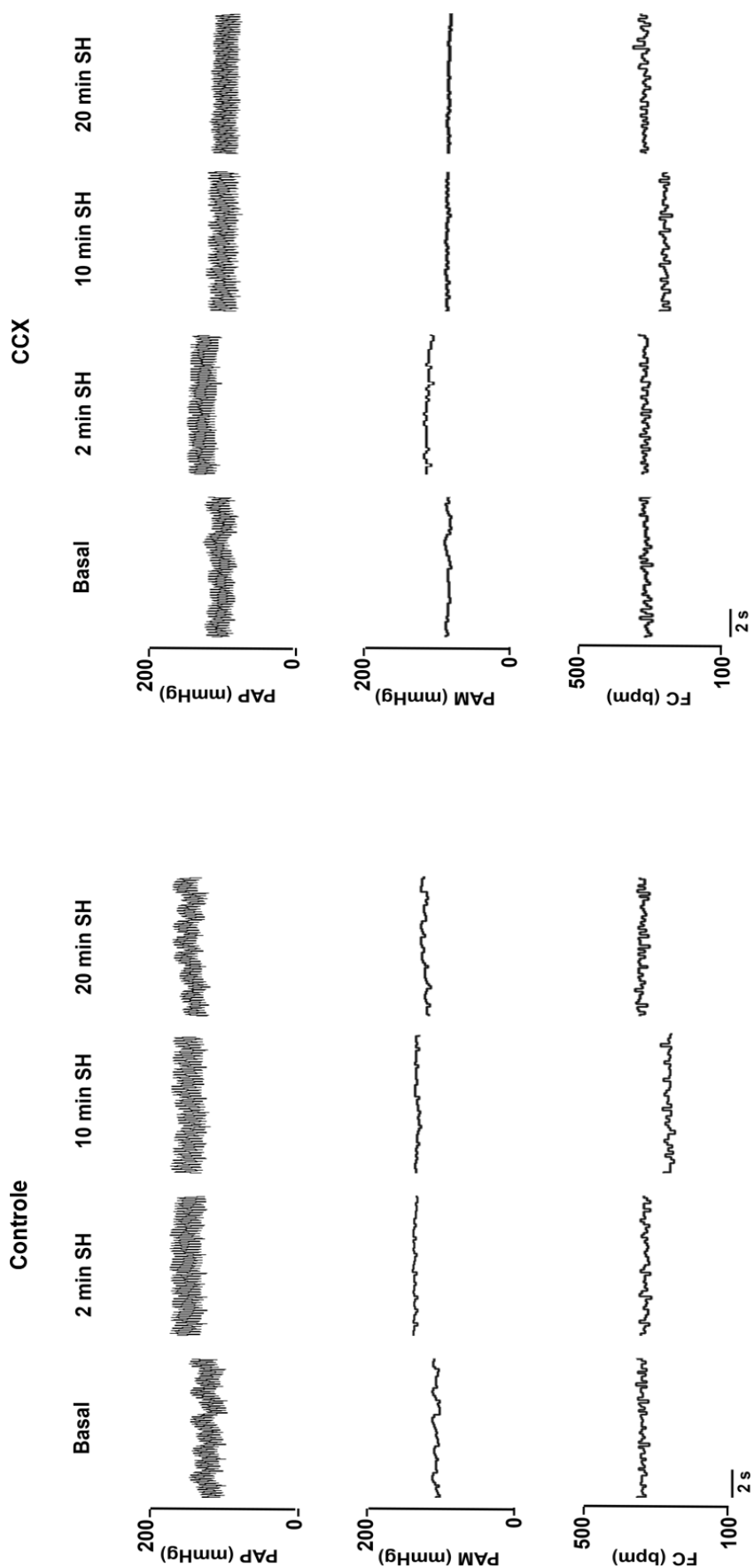


Figura 13. Registros da pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de um rato controle e um rato com remoção do corpúsculo carotídeo (CCX) mostrando o basal e as alterações cardiovasculares induzidas por infusão intravenosa de salina hipertônica nos tempos 2, 10 e 20 minutos (SH; NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal). Os parâmetros foram avaliados nos animais não anestesiados.

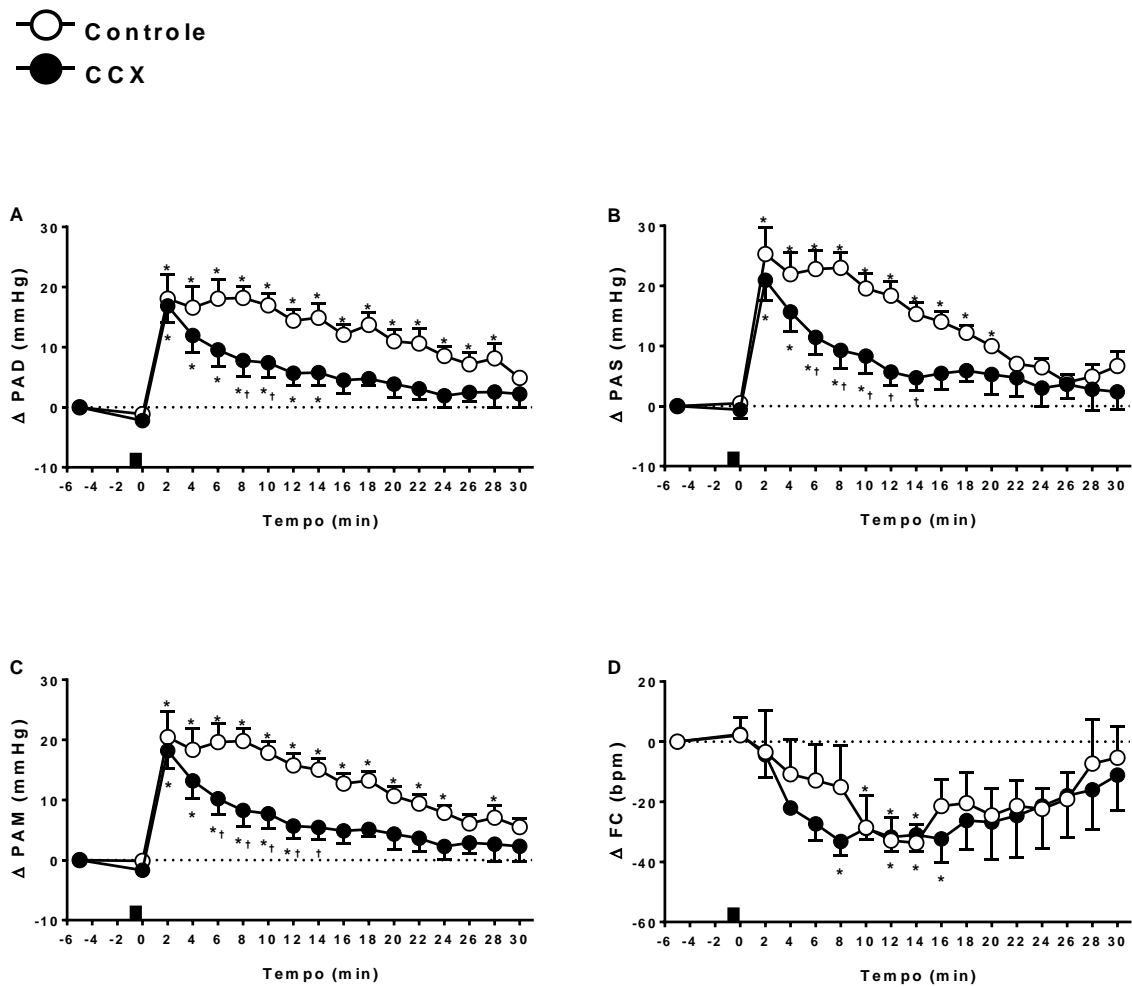


Figura 14. Efeitos da infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal) sobre a pressão arterial diastólica (PAD; **A**), pressão arterial sistólica (PAS; **B**), pressão arterial média (PAM; **C**) e frequência cardíaca (FC; **D**) em ratos controle (n=7) e ratos com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (n=6) não anestesiado. As barras pretas indicam o momento da infusão de salina hipertônica. Dados foram analisados utilizando Anova *two way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. *diferente do basal. †diferente do controle. $p < 0,05$.

4.1.2.3. Avaliação da variabilidade da PAS

A análise da variabilidade da PAS realizada no domínio da frequência mostrou que as oscilações nas faixas de BF, FMB e AF extraídas durante o registro basal foram similares entre ratos controle ($41 \pm 6 \%$, $43 \pm 7 \%$ e $15 \pm 2 \%$, respectivamente) e CCX ($38 \pm 3 \%$, $49 \pm 3 \%$ e $13 \pm 2 \%$, respectivamente) (Figura 15). Após a infusão de salina hipertônica, os ratos controles apresentaram redução na faixa de BF ($18 \pm 5 \%$; $p < 0,05$) e aumento na faixa de FMB ($59 \pm 9 \%$; $p < 0,05$), o que não foi observado em ratos CCX ($27 \pm 4 \%$ e $57 \pm 5 \%$, respectivamente) (Figura 15). Não foram encontradas alterações significativas na faixa de AF após a administração de salina hipertônica (CCX: $14 \pm 2 \%$, vs. Controle: $22 \pm 4\%$). Estes dados indicam redução no componente simpático da variabilidade da PAS após a infusão de salina hipertônica em ratos controle, efeito abolido nos animais submetidos à CCX.

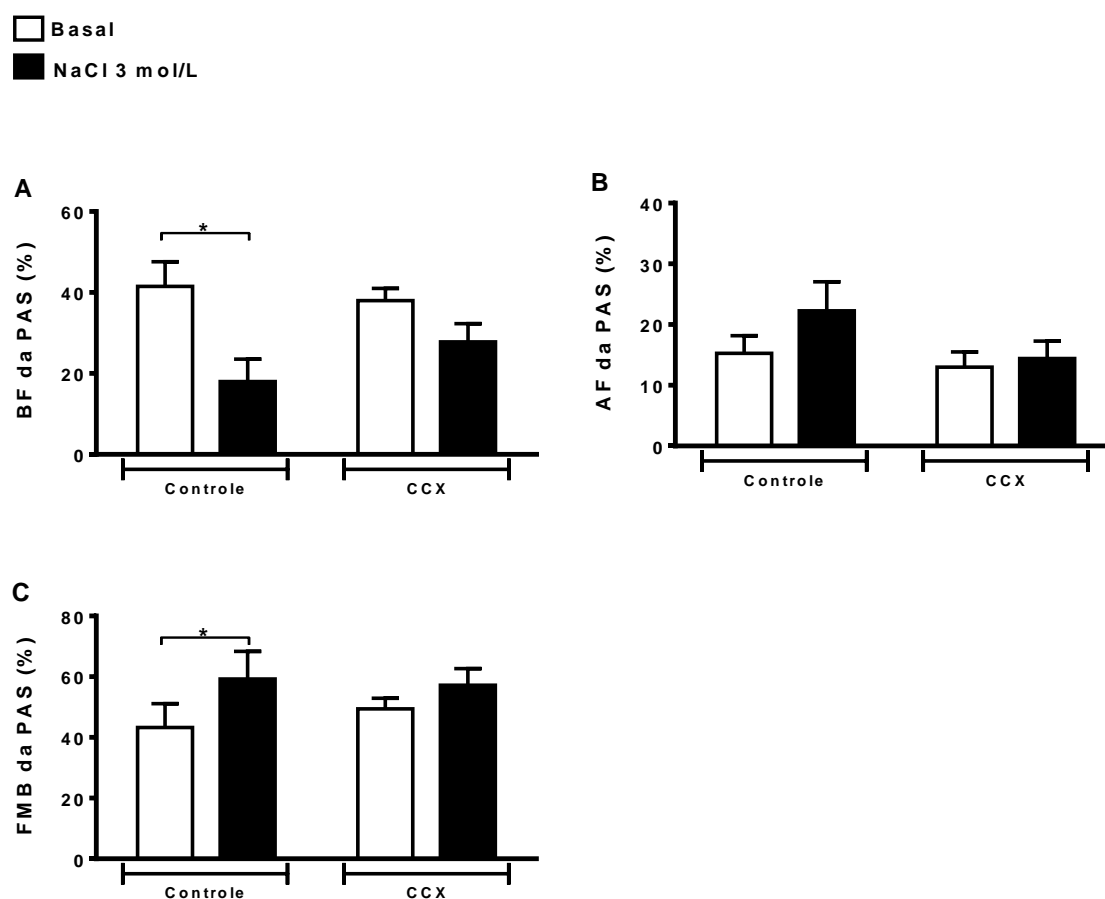


Figure 15. Análise da variabilidade da pressão arterial sistólica (PAS) antes e após a infusão intravenosa de salina hipertônica em ratos controle (n=4) e com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (n=5). Os componentes oscilatórios da PAS foram quantificados em três faixas de frequência: baixa frequência (BF; **A**) (*low frequency*), alta frequência (AF; **B**) (*high frequency*) e frequência muito baixa (FMB; **C**) (*very low frequency*). Dados foram analisados utilizando Anova *two way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. *p < 0,05.

4.1.2.4. Concentração plasmática de sódio e hematócrito

A concentração plasmática de sódio basal foi similar entre ratos controle ($140 \pm 0,5$ mmol/L) e CCX ($141 \pm 1,8$ mmol/L). Após a infusão de salina hipertônica, o sódio plasmático aumentou similarmente entre os grupos (Controle: $146 \pm 0,9$ mmol/L e CCX: $147 \pm 2,9$ mmol/L, 10 minutos após SH; $p < 0,05$) (Figura 16 A). O hematócrito basal foi similar entre ratos controle ($41 \pm 0,6$ %) e CCX ($40 \pm 0,3$ %) e não alterou após a infusão de salina hipertônica (Controle: $40 \pm 1,5$ % e CCX: $40 \pm 0,3$ %, 10 minutos após SH) (Figura 16 B).

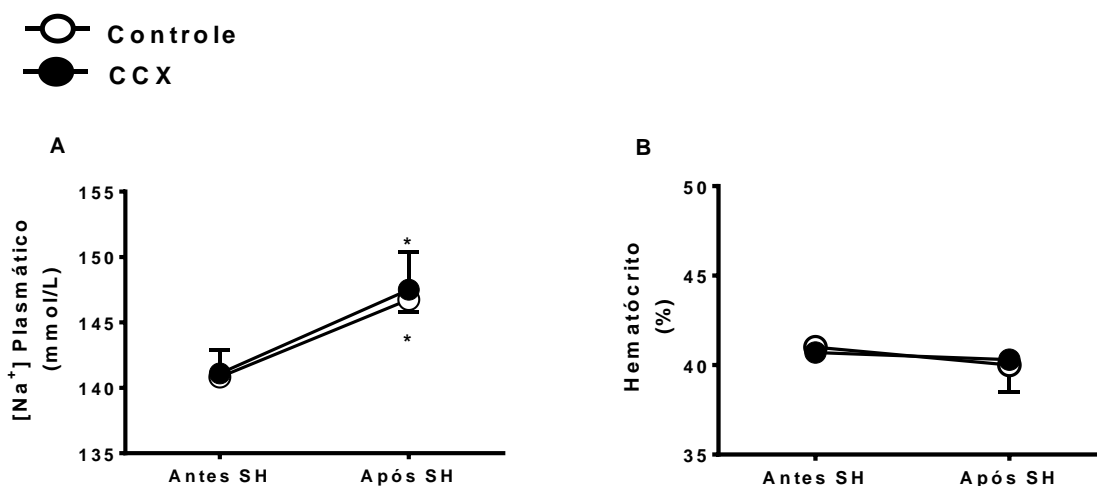


Figura 16. Concentração plasmática de sódio ([Na⁺] Plasmático) e hematócrito antes e após a infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal) em ratos controle (n=6) e ratos com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (n=3). Dados foram analisados utilizando Anova *two way* seguido pelo pós teste de Fisher. *diferente do basal. $p < 0,05$.

4.1.2.5. Avaliação da excreção renal de sódio em ratos controle e CCX

A análise da excreção renal de sódio mostrou redução no volume urinário (CCX: $3,8 \pm 0,4$ mL, vs. ratos controle: $5,4 \pm 0,7$ mL, 60 minutos após SH; $p < 0,05$), concentração urinária de sódio (CCX: 326 ± 13 mmol/L, vs. ratos controle: 408 ± 41 mmol/L, 90 minutos após SH; $p < 0,05$), quantidade de sódio excretado

(CCX: $1,27 \pm 0,15$ mmol, vs. ratos controle: $1,91 \pm 0,07$ mmol, 90 minutos após a SH; $p < 0,05$) e balanço de sódio (CCX: $74,9 \pm 7,3$ %, vs. ratos controle: $99,7 \pm 6,7$ %, 90 minutos após a SH; $p < 0,05$) induzido por salina hipertônica em ratos CCX em comparação com o grupo controle (Figura 17).

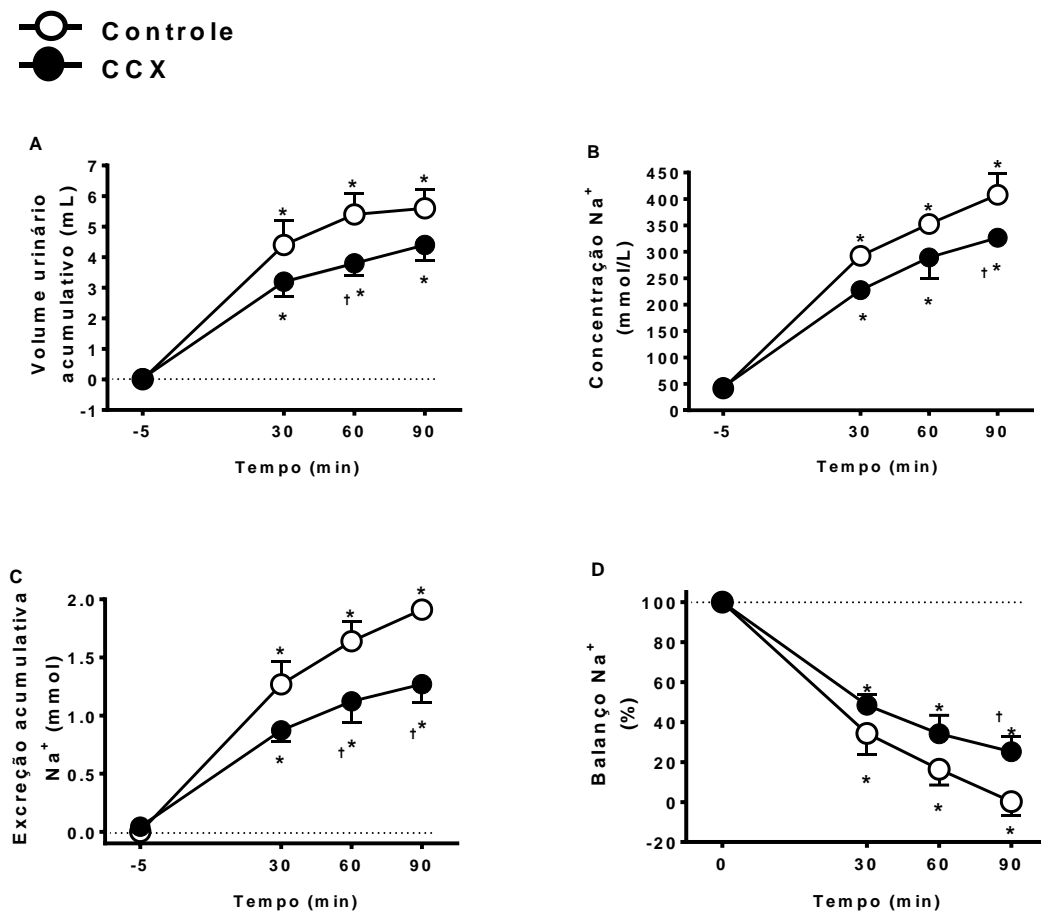


Figura 17. Efeitos da infusão intravenosa de salina hipertônica (NaCl 3 mol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal) sobre o volume urinário acumulativo (A), concentração urinária de sódio ([Na⁺] Urinário) (B), excreção acumulativa de sódio (C) e balanço de sódio (D) em ratos controle (n=5) e ratos com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (n=8). Dados foram analisados utilizando Anova two way seguido pelo pós teste de Fisher. *diferente do basal. †diferente do controle. $p < 0,05$.

4.2. Resultados obtidos nos experimentos *in situ*

4.2.1. Alterações na osmolalidade do perfusato induzidas por infusão intra arterial de soluções hiperosmóticas

Como mostrado na tabela 4, as infusões intra arteriais acumulativas de salina hipertônica aumentaram gradualmente a osmolalidade do perfusato. Ao final de todas as infusões a osmolalidade do perfusato aumentou aproximadamente 2%.

Tabela 4. Alterações na osmolalidade do perfusato induzidas por infusões acumulativas de salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7; 1,5 e 2 mol/L) em ordem ascendente.

NaCl	0,17 mol/L	0,3 mol/L	0,7 mol/L	1,5 mol/L	2 mol/L
Δ osmolalidade (mOsmol/kg/água)	0,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,4	2,5 \pm 0,5*	3,3 \pm 0,4*	6,8 \pm 0,3*

Valores estão expressos como média \pm EPM. Os dados foram comparados utilizando Anova *one-way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Tukey. *diferente do basal. $p < 0,05$. $n = 10$.

Similarmente, as infusões acumulativas de manitol também aumentaram a osmolalidade do perfusato, resultando em um aumento de aproximadamente 2% ao final dos testes hiperosmóticos (Tabela 5).

Tabela 5. Alterações na osmolalidade do perfusato induzidas por infusões acumulativas de manitol (0,3; 0,5; 1; 2,7 e 3,8 mol/L) em ordem crescente.

Manitol	0,3 mol/L	0,5 mol/L	1 mol/L	2,7 mol/L	3,8 mol/L
Δ osmolalidade (mOsmol/kg/água)	1,2 ± 0,3	2,0 ± 0,2	2,6 ± 0,2*	4,0 ± 0,0*	6,2 ± 0,1*

Valores estão expressos como média ± EPM. Diferenças foram analisadas utilizando Anova *one-way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Tukey. *diferente do basal. $p < 0,05$. $n = 6$.

4.2.2. Valores basais de PP, ANSt, ANSC e ANF e peso corporal dos ratos controle, CCX e descerebrados infundidos intra arterialmente com NaCl hipertônico ou manitol

Os valores basais de PP, ANSt, ANSC, frequência de despolarização do nervo frênico e peso corporal dos ratos controle, CCX e descerebrados estão mostrados na tabela 6. Não foram encontradas diferenças estatísticas entre os grupos.

Tabela 6. Valores basais de PP, ANSt, ANSC e Freq ANF e o peso corporal dos ratos controle, CCX e descerebrados que receberam infusões intra arteriais de NaCl hipertônico ou manitol.

Grupos	PP (mmHg)	ANSt (μ V)	ANSC (μ V)	Freq ANF (cpm)	p.c. (g)
Controle (NaCl)	71 \pm 1	9,566 \pm 2,512	0,447 \pm 0,093	21 \pm 1	79 \pm 3
Controle (Manitol)	66 \pm 4	9,073 \pm 4,970	0,361 \pm 0,134	18 \pm 1	83 \pm 2
CCX (NaCl)	80 \pm 4	6,783 \pm 1,465	–	18 \pm 3	76 \pm 4
Descerebrado (NaCl)	71 \pm 3	3,168 \pm 1,013	–	18 \pm 3	80 \pm 1

Valores estão expressos como média \pm EPM. PP, pressão de perfusão; ANSt, atividade do nervo simpático torácico; ANSC, atividade do nervo do seio carotídeo; Freq ANF, frequência de despolarização do nervo frênico; p.c., peso corporal; CCX, remoção dos corpúsculos carotídeos. Controle NaCl, n=16; Controle manitol, n=6; CCX, n=5; Descerebrado, n=6. Os valores de PP, ANSt, Freq ANF e peso corporal foram analisados usando ANOVA *one-way* seguido pelo pós teste de Tukey. A ANSC foi analisada utilizando teste *t* de Student não pareado.

4.2.3. Alterações na ANSt, ANSC e ANF induzidas por sobrecarga aguda de sódio em preparações *in situ* decorticadas de ratos controles

No grupo controle, as infusões intra arteriais de salina hipertônica 0,17, 0,3, e 0,7 mol/L não modificaram a ANSt (0,5 \pm 2,5, 2,6 \pm 1,9, 0,5 \pm 2,1%, respectivamente, vs. Ringer: -0.8 \pm 1.9%). Infusão de salina hipertônica 1,5 mol/L aumentou modestamente a ANSt (9,6 \pm 3,6%), enquanto a infusão de NaCl 2 mol/L produziu marcada resposta simpatoexcitatória (63,3 \pm 8,4%) (Figuras 18 e 19 A).

Infusões intra arteriais de salina hipertônica 0,17, 0,3, 0,7 e 1,5 mol/L não alteraram a ANSC ($-1,3 \pm 0,4$, $1,4 \pm 0,8$, $0,0 \pm 0,8$ e $27,7 \pm 11,0\%$, respectivamente, vs. Ringer: $-0,2 \pm 1,3\%$). Apenas NaCl 2 mol/L aumentou significativamente a ANSC ($105,1 \pm 13,2\%$) (Figuras 18 e 19 B).

Infusões de salina hipertônica 0,17 mol/L não alterou a frequência de despolarização do nervo frênico ($0,9 \pm 0,4$ cpm, vs. Ringer: $0,4 \pm 0,2$ cpm) (Figura 19 C). Infusões adicionais de salina hipertônica 0,3, 0,7, 1,5 e 2 mol/L aumentaram a frequência de descargas do nervo frênico ($2,1 \pm 0,4$, $2,8 \pm 0,6$, $3,8 \pm 0,5$ e $5,8 \pm 0,9$ cpm, respectivamente; $p < 0,05$) (Figuras 18 e 19 C). Infusões de salina hipertônica 0,17, 0,3, 0,7, 1,5 e 2 mol/L não induziram significativas alterações da amplitude de atividade do nervo frênico, ($-2,3 \pm 1,6$, $-3,0 \pm 1,5$, $-1,3 \pm 2,0$, $-2,1 \pm 1,8$ e $1,7 \pm 2,9$ μV , respectivamente, vs. Ringer: $-0,1 \pm 1,4$ μV) (Figura 18). Salina hipertônica 0,17, 0,3, 0,7 e 1,5 mol/L não modificaram a frequência cardíaca dos animais ($-1,4 \pm 0,3$, $-1,0 \pm 0,4$, $0,0 \pm 0,8$ e $-5,8 \pm 1,9$ bpm, respectivamente, vs. Ringer: $-0,6 \pm 0,3$ bpm). Apenas infusões de NaCl 2 mol/L provocaram discreta bradicardia ($-6,9 \pm 1,3$ bpm; $p < 0,05$).

As alterações na ANSt, ANSC e ANF induzidas por infusão de salina hipertônica 2 mol/L ($63,3 \pm 8,4\%$, $105,1 \pm 13,2\%$ e $5,8 \pm 0,9$ cpm, respectivamente, $p < 0,05$) foram menores em comparação às respostas evocadas por ativação dos quimiorreceptores periféricos com KCN ($180,8 \pm 18,4\%$, $214,9 \pm 16,5\%$ e $13,0 \pm 1,0$ cpm, respectivamente) (Figuras 18 e 20).

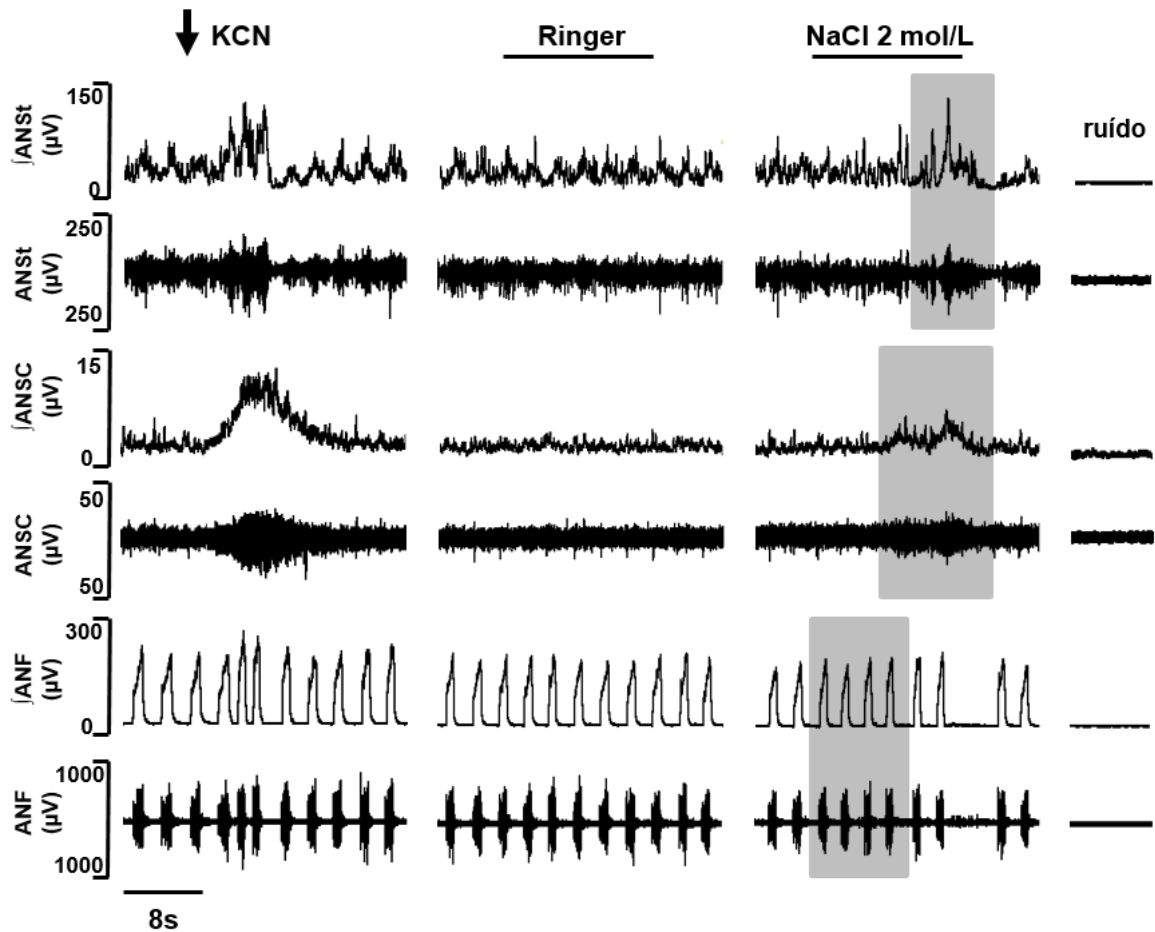


Figura 18. Registros brutos e integrados (I) mostrando as atividades do nervo simpático torácico (ANSt), nervo do seio carotídeo (ANSC) e nervo frênico (ANF) em resposta à infusão intra arterial de cianeto de potássio (KCN; 25 μ g em 50 μ L), solução de Ringer e NaCl 2 mol/L em ratos controles. À direita está representado o ruído elétrico obtido ao final do experimento. A seta preta acima do registro indica o momento da infusão em bólus de KCN. As linhas pretas acima do registro indicam o período das infusões de solução de Ringer e salina hipertônica 2 mol/L. As alterações na ANSt, ANSC e ANF induzidas por infusão de NaCl 2 mol/L estão destacadas em cinza.

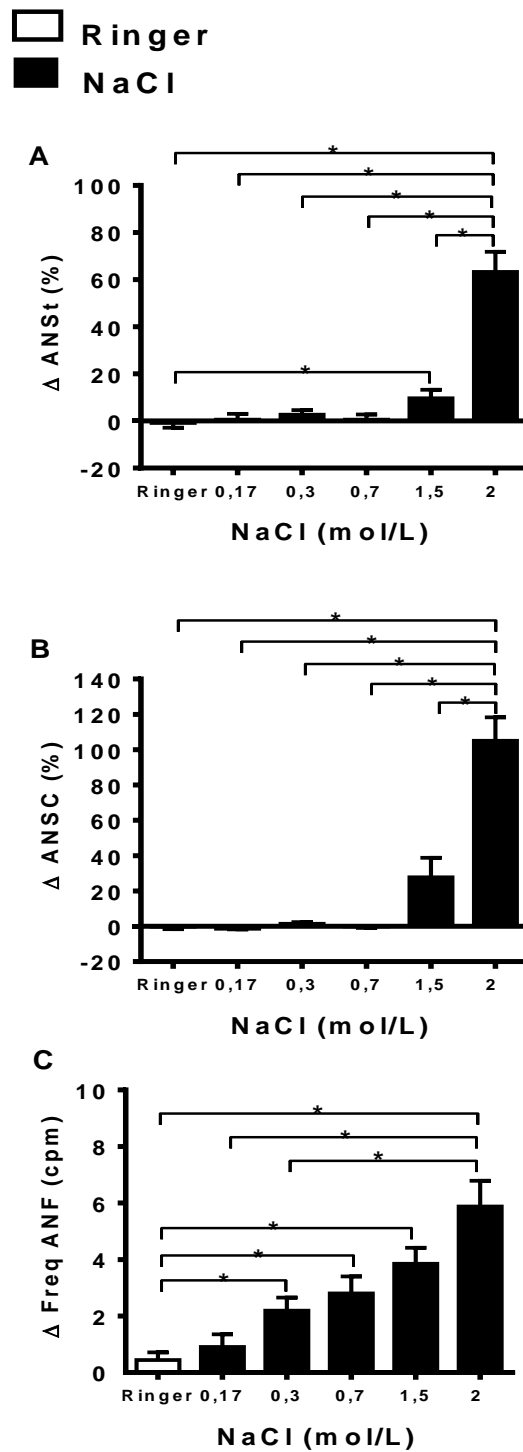


Figura 19. Alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt; **A**), nervo do seio carotídeo (ANSC; **B**) e na frequência de disparo do nervo frênico (Freq ANF; **C**) induzidas por infusão intra arterial de solução de Ringer ou salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7; 1,5 e 2 mol/L) em ratos controles (n=16). As diferenças foram comparadas utilizando ANOVA *one way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Tukey. *= $p < 0,05$.

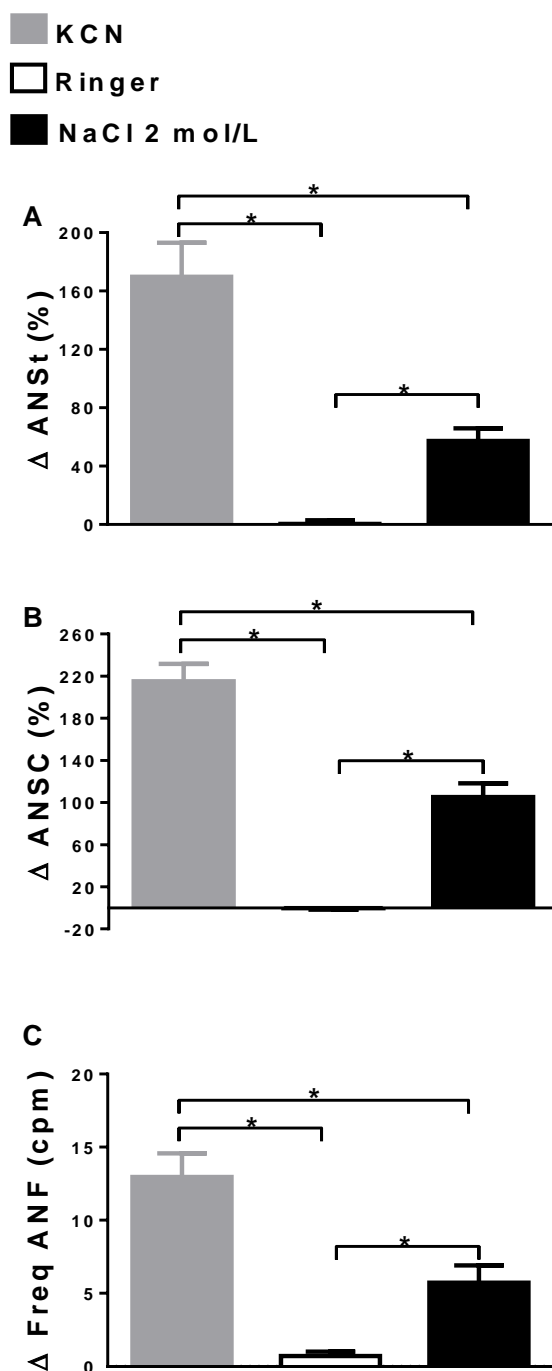


Figure 20. Alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt; **A**), nervo do seio carotídeo (ANSC; **B**) e na frequência de descargas do nervo frênico (Freq ANF; **C**) produzidas por infusão intra arterial de cianeto de potássio (KCN; 25 μ g em 50 μ L), solução de Ringer ou NaCl 2 mol/L em preparações *in situ* de ratos controles (n=10). Note que as alterações induzidas por NaCl 2 mol/L foram significativamente menores que as produzidas por KCN. Os dados foram analisados usando ANOVA *one way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Tukey. *= $p < 0,05$.

4.2.4. Acoplamento simpático-respiratório em ratos controle durante a sobrecarga de sódio

Em condições basais, a ANSt exibiu marcante modulação respiratória com pico durante o início da fase pós inspiratória (Figura 21). A hiperosmolalidade produziu *bursts* adicionais e aumentou a ANSt durante a pós inspiração ($5,0 \pm 1,2 \mu\text{V}$ vs. solução de Ringer: $2,4 \pm 0,5 \mu\text{V}$; $p < 0,05$) e expiração final ($4,4 \pm 0,9 \mu\text{V}$ vs. solução de Ringer: $1,8 \pm 0,3 \mu\text{V}$; $p < 0,05$), mas não alterou a ANSt durante a fase inspiratória ($3,1 \pm 0,3 \mu\text{V}$ vs. solução de Ringer: $2,6 \pm 0,5$) (Figuras 21 e 22).

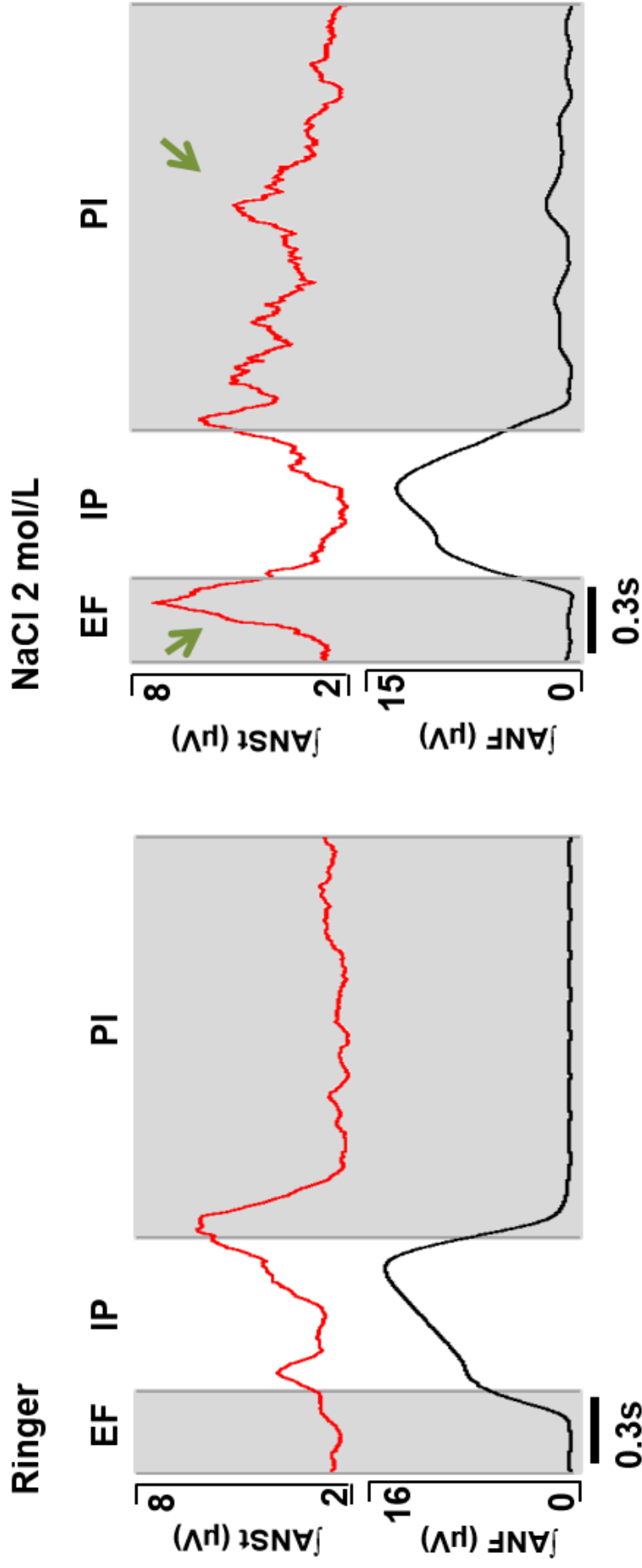


Figura 21. Registros integrados (j) das atividades do nervo simpático torácico (ANSt) e frênico (ANF) mostrando o acoplamento simpático-respiratório durante a infusão de solução de Ringer (esquerda) e NaCl 2 mol/L (direita) em um rato controle. As setas verdes apontam a resposta simpatoexcitatória durante a hiperosmolaridade. EF, expiração final; IP, inspiração; PI, pós inspiração.

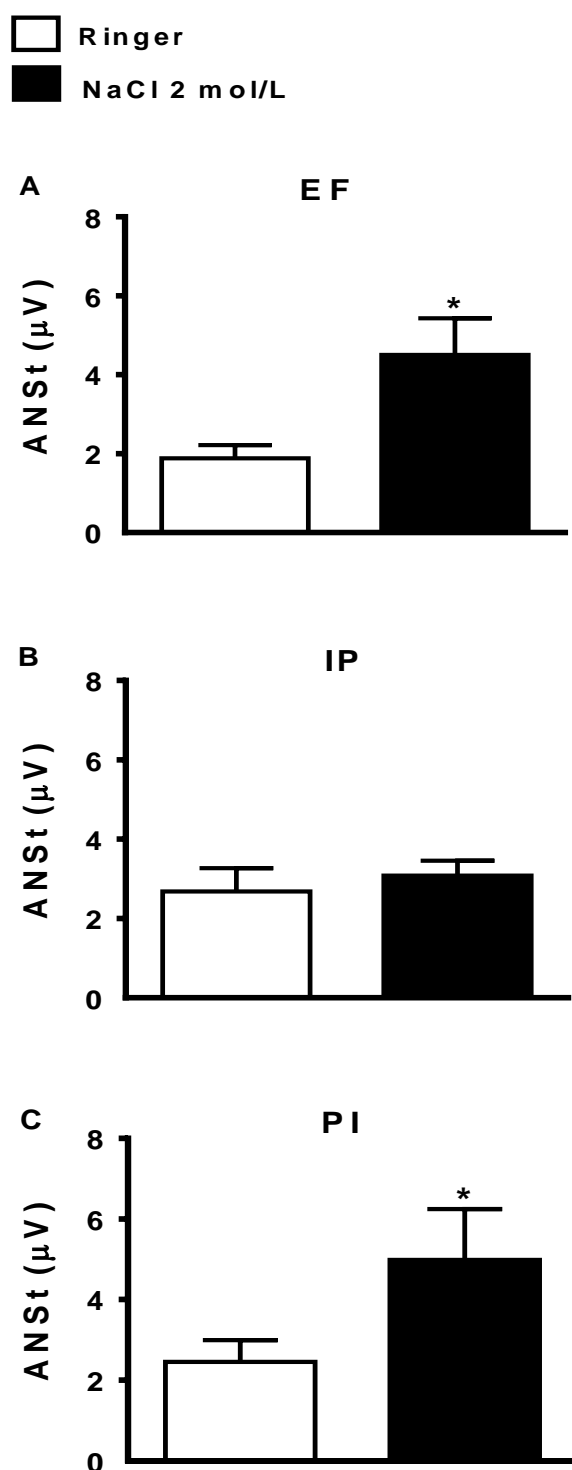


Figura 22. Valores absolutos da atividade do nervo simpático torácico (ANSt) na expiração final (EF; **A**), inspiração (IP; **B**) e pós inspiração (PI; **C**) durante a infusão de solução de Ringer ou NaCl 2 mol/L em ratos controles (n=6). Nos gráficos estão representados a média da ANSt durante cada fase respiratória. As diferenças foram analisadas usando teste *t* de Student pareado. *diferente da solução de Ringer. $p < 0,05$.

4.2.5. Alterações na ANSt, ANSC e ANF induzidas por infusão aguda de manitol em preparações *in situ* de ratos controle

Infusões intra arterial de manitol 0,3, 0,5, 1, 2,7 e 3,8 mol/L não promoveram alterações significativas na ANSt ($-2,7 \pm 1,4$, $-1,0 \pm 1,9$, $2,5 \pm 2,8$, $3,1 \pm 3,1$ e $10,3 \pm 5,6$ %, respectivamente vs. solução de Ringer: $0,4 \pm 2,3$ %), ANSC ($1,1 \pm 1,6$, $3,4 \pm 2,4$, $2,1 \pm 1,6$, $12,7 \pm 8,8$ e $23,5 \pm 11,0$ %, respectivamente, vs. solução de Ringer: $1,2 \pm 0,2$ %), frequência de descargas do nervo frênico ($-0,8 \pm 0,4$, $-0,6 \pm 1,2$, $0,5 \pm 1,2$, $1,0 \pm 0,4$ e $3,7 \pm 1,5$ cpm, respectivamente, vs. solução de Ringer: $-0,4 \pm 0,3$ cpm) e na amplitude da ANF ($-8,6 \pm 1,9$, $-2,3 \pm 2,8$, $-4,7 \pm 3,6$, $-4,8 \pm 2,0$ e $-2,6 \pm 4,4$ μ V, respectivamente, vs. solução de Ringer: $-5,4 \pm 1,7$ μ V) em ratos controle (Figuras 23 e 24).

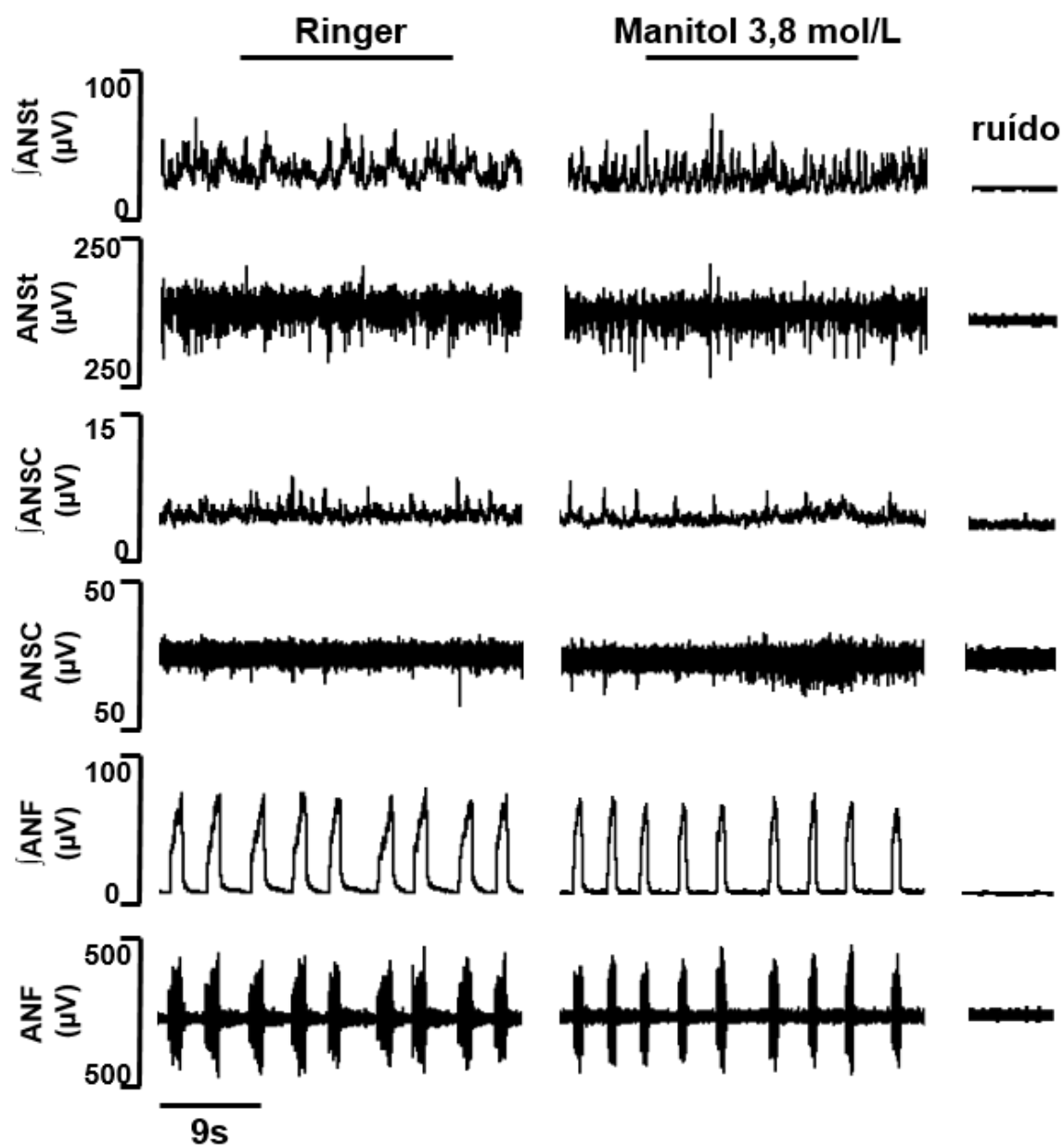


Figura 23. Registros brutos e integrados (I) mostrando as atividades do nervo simpático torácico (ANSt), nervo do seio carotídeo (ANSC) e nervo frênico (ANF) em resposta à infusão intra arterial de solução de Ringer (esquerda) e manitol 3,8 mol/L (direita) em ratos controles. À direita está representado o ruído elétrico obtido ao final do experimento. As linhas pretas acima do registro indicam o período das infusões de solução de Ringer e manitol 3,8 mol/L.

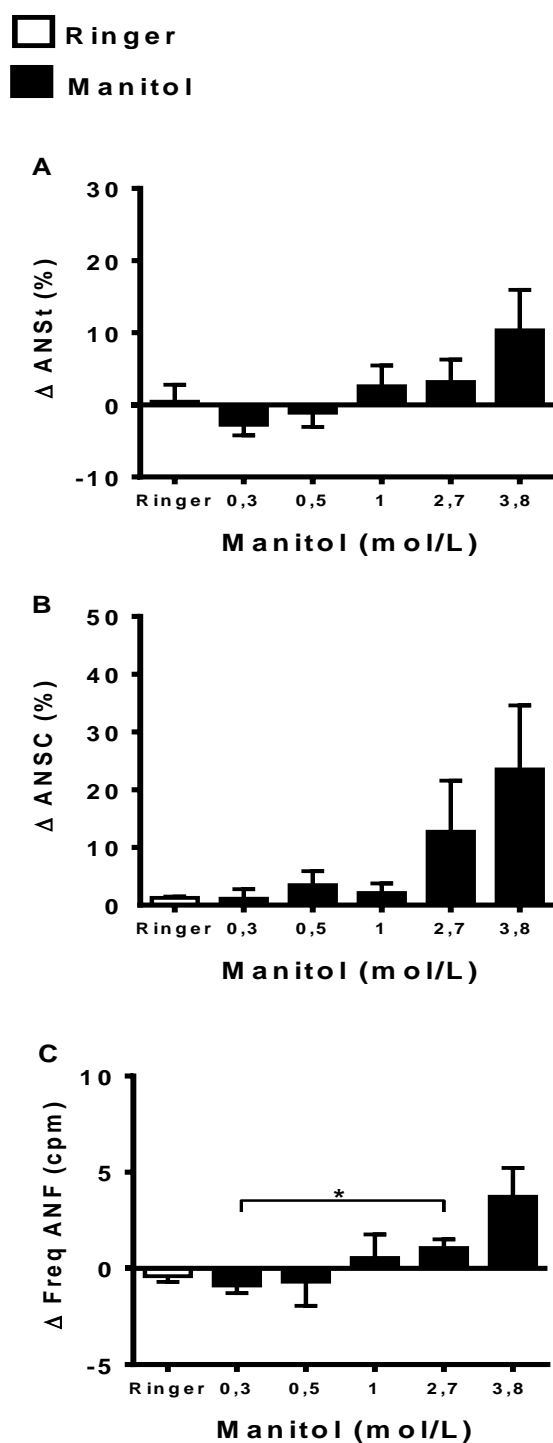


Figura 24. Alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt; **A**), nervo do seio carotídeo (ANSC; **B**) e na frequência de disparo do nervo frênico (Freq ANF; **C**) induzidas por infusão intra arterial de solução de Ringer ou manitol (0,3; 0,5; 1; 2,7 e 3,8 mol/L) em ratos controles (n=6). Os valores foram comparados utilizando ANOVA *one way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Tukey.*=p<0,05.

4.2.6. Efeito da remoção dos corpúsculos carotídeos sobre as alterações simpáticas e ventilatórias induzidas por sobrecarga aguda de sódio

4.2.6.1. Respostas pressoras, simpáticas e respiratórias à ativação do quimiorreflexo e barorreflexo em ratos controles e com remoção dos corpúsculos carotídeos

A infusão intra arterial de fenilefrina aumentou similarmente a pressão de perfusão em ratos controles (Δ : 33 ± 2 mmHg) e ratos submetidos à remoção dos corpúsculos carotídeos (Δ : 29 ± 5 mmHg). A simpatoinibição induzida por ativação do baroreflexo foi discretamente reduzida em ratos CCX ($-65,8 \pm 3,8$ %; $p < 0,05$) comparada com os ratos controle ($-93,4 \pm 2,2$ %) (Figura 25). A ativação do quimiorreflexo periférico por infusão de KCN aumentou a frequência de ANF ($13,1 \pm 1,2$ cpm), a ANSt ($199,1 \pm 31,4$ %) e a PP (19 ± 3 mmHg) em ratos controles. Em ratos CCX, a taquipneia ($0,9 \pm 0,3$ cpm; $p < 0,05$), simpatoexcitação ($2,0 \pm 4,8$ %; $p < 0,05$) e resposta pressora (-4 ± 1 mmHg) induzidas por KCN foram abolidas (Figura 26). Estes resultados confirmam que a CCX foi efetiva.

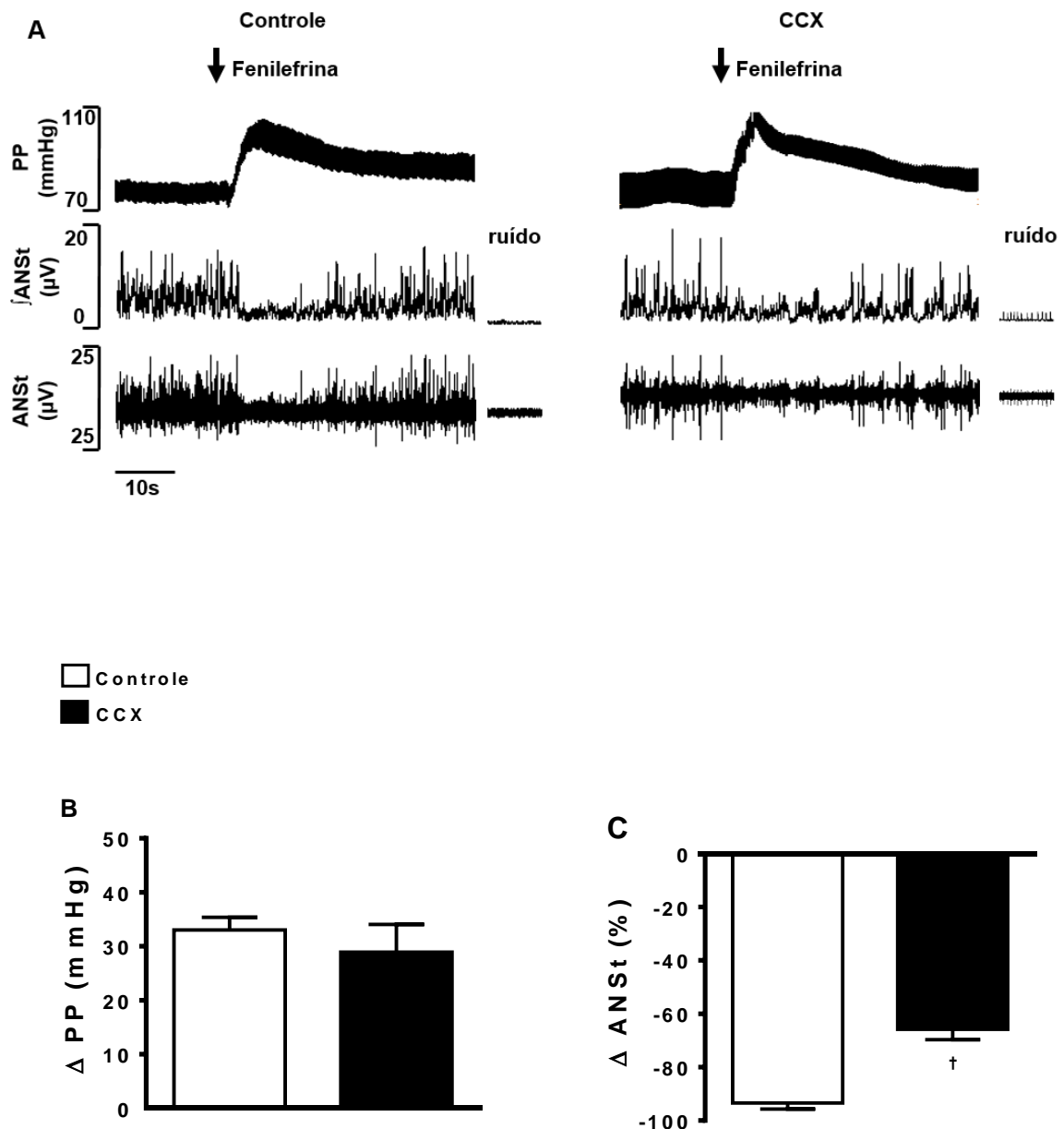


Figura 25. Registros representativos dos grupos mostrando as alterações na pressão de perfusão (PP) e atividade do nervo simpático torácico (ANSt) induzidas por ativação do barorreflexo em um rato controle e um rato com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (A). As setas pretas acima dos registros indicam o momento da infusão intra arterial de fenilefrina (agonista adrenérgico α_1 ; 10 μ g em 100 mL). Alterações na pressão de perfusão (PP) (B) e ANS torácica (ANSt) (C) promovidas por infusão intra arterial de fenilefrina. As diferenças foram comparadas usando teste *t* de Student não pareado. †diferente do controle. $p < 0,05$. (Controle, $n=6$) (CCX, $n=5$).

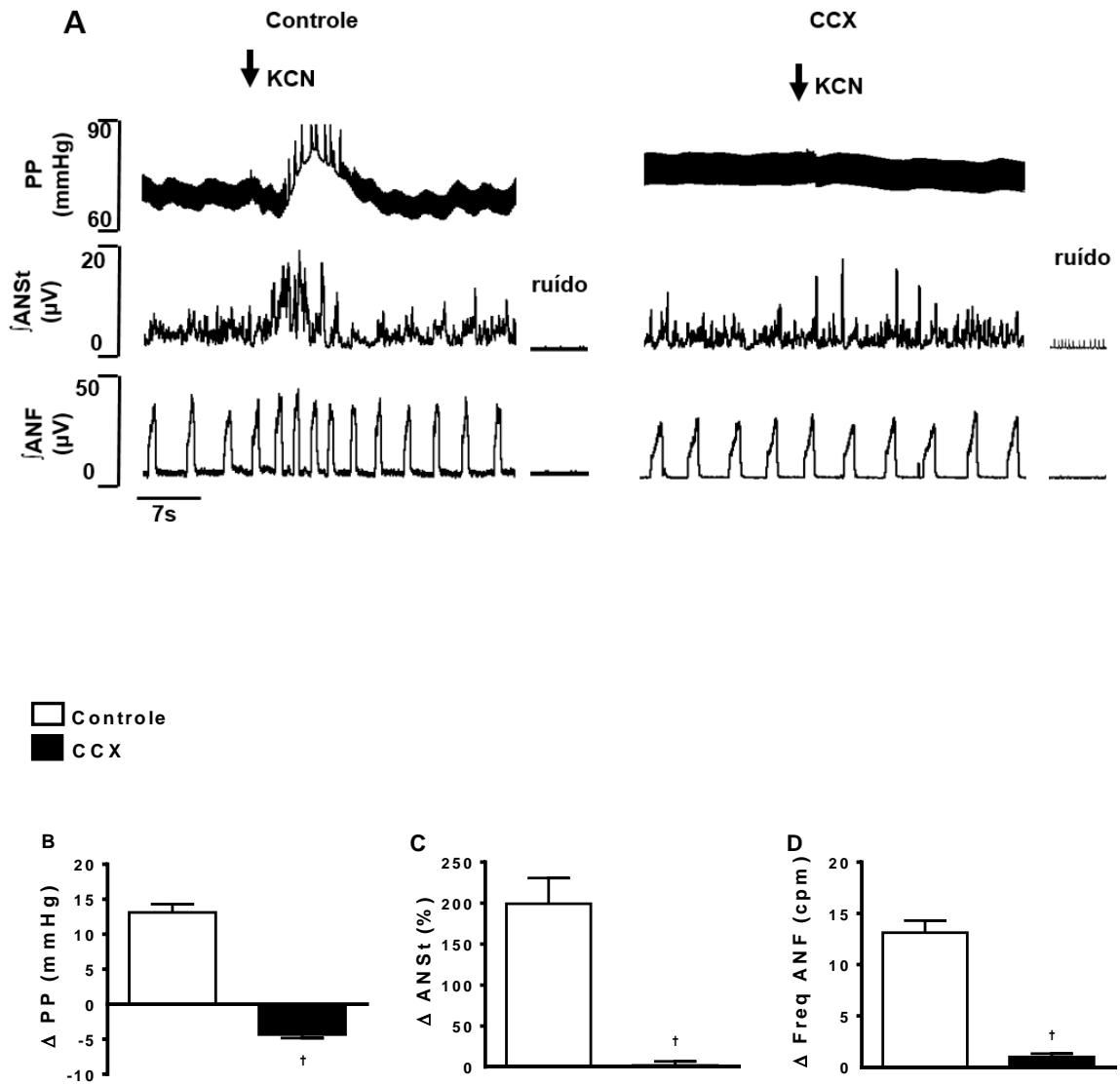


Figura 26. Registros representativos dos grupos mostrando as alterações na pressão de perfusão (PP) e integradas das atividades do nervo simpático torácico (\int ANSt) e do nervo frênico (\int ANF) induzidas por ativação do quimiorreflexo em um rato controle e um rato com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (A). As setas pretas acima dos registros indicam o momento da infusão intra arterial de cianeto de potássio (KCN; 25 μg em 50 μL). Alterações na pressão de perfusão (PP) (B), ANS torácica (ANSt) (C) e frequência de descargas do nervo frênico (Freq ANF) (D) promovidas por infusão intra arterial de KCN. As diferenças foram comparadas usando teste *t* de Student não pareado. †diferente do controle. $p < 0,05$. (Controle, $n=6$) (CCX, $n=5$).

4.2.6.2. Contribuição dos corpúsculos carotídeos nas respostas simpática e ventilatória induzidas por hiperosmolalidade

A remoção dos corpúsculos carotídeos atenuou marcadamente o aumento na ANSt induzido por infusão de NaCl 2 mol/L (CCX: $26,2 \pm 4,9\%$, vs. ratos controles: $63,3 \pm 8,4\%$; $p < 0,05$) (Figuras 27 e 28 A). Contudo, a remoção dos corpúsculos carotídeos não modificou a resposta taquineica promovida por hiperosmolalidade ($3,6 \pm 0,5$ cpm, vs. ratos controles: $5,8 \pm 0,9$ cpm; $p > 0,05$) (Figuras 27 e 28 B). A ANSt e a frequência de ANF não foram alteradas por infusão de salina hipertônica 0,17, 0,3, 0,7 e 1,5 mol/L em ratos CCX (Tabela 7).

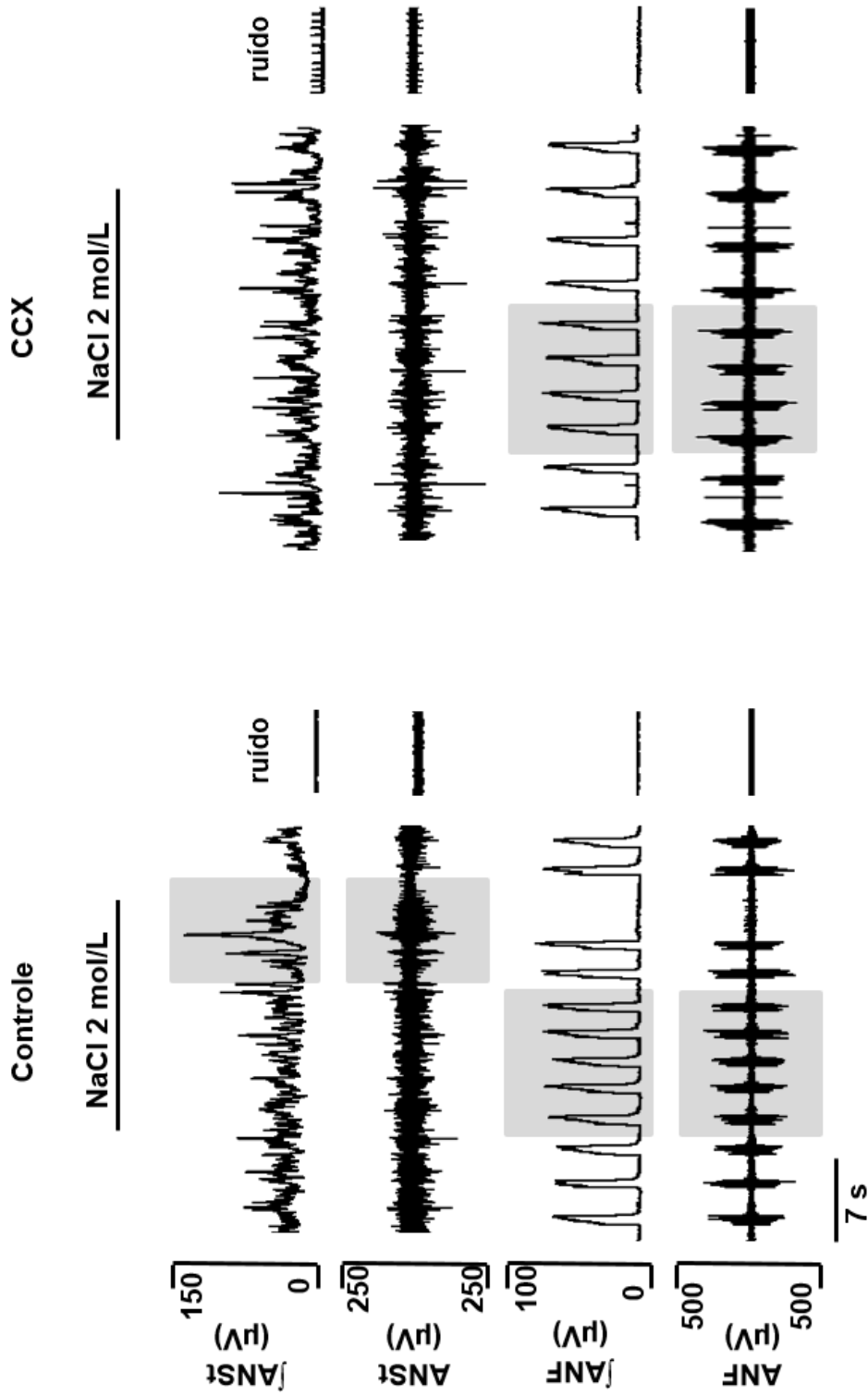


Figura 27. Registros brutos e integrados (I) das atividades do nervo simpático torácico (ANSt) e nervo frênico (ANF) durante a infusão intra arterial de salina hipertônica 2 mol/L em um rato controle (esquerda) e um rato com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (direita). As linhas pretas acima do registro indicam o período das infusões. As alterações na ANS torácica e ANF estão destacadas em cinza.

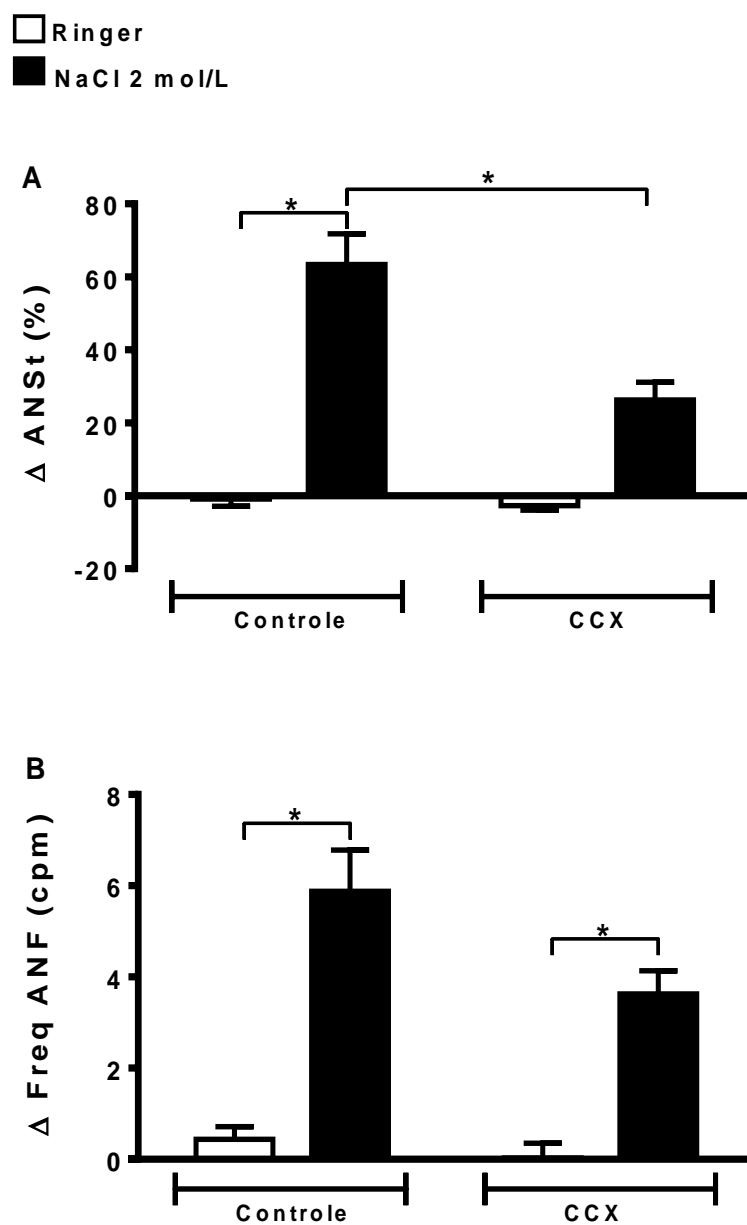


Figura 28. Alterações nas atividades do nervo simpático torácico (ANSt; **A**) e na frequência de despolarização do nervo frênico (Freq ANF; **B**) durante a infusão intra arterial de solução de Ringer ou NaCl 2 mol/L em ratos controles (n=16) e com remoção dos corpúsculos carotídeos (CCX) (n=5). Os dados foram comparados usando ANOVA *two way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. * $p < 0,05$.

Tabela 7. Alterações na ANSt e ANF induzidas por infusão de solução de Ringer e salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7 e 1,5 mol/L) em ordem crescente em ratos CCX.

Parâmetro	Ringer (%)	0,17 mol/L (%)	0,3 mol/L (%)	0,7 mol/L (%)	1,5 mol/L (%)
ANSt	-2,7 ± 1,2	2,2 ± 3,9	0,2 ± 2,3	6,8 ± 3,5	4,0 ± 2,2
ANF	0,7 ± 0,5	1,6 ± 0,6	1,7 ± 0,9	1,6 ± 0,9	1,9 ± 0,7

Valores estão expressos como média ± EPM. ANSt, atividade do nervo simpático torácico; ANF, atividade do nervo frênico; CCX, remoção dos corpúsculos carotídeos. CCX, n=5.

4.2.7. Efeito da remoção do prosencéfalo sobre as alterações simpáticas e ventilatórias induzidas por sobrecarga aguda de sódio

4.2.7.1. Avaliação histológica da transecção pré colicular

A figura 29 apresenta a imagem da secção sagital do encéfalo de uma preparação *in situ* de um rato descerebrado representativo do grupo. Podemos notar que a transecção pré colicular promoveu a desconexão do prosencéfalo, rompendo as interações neuronais entre o prosencéfalo e as estruturas encefálicas remanescentes.

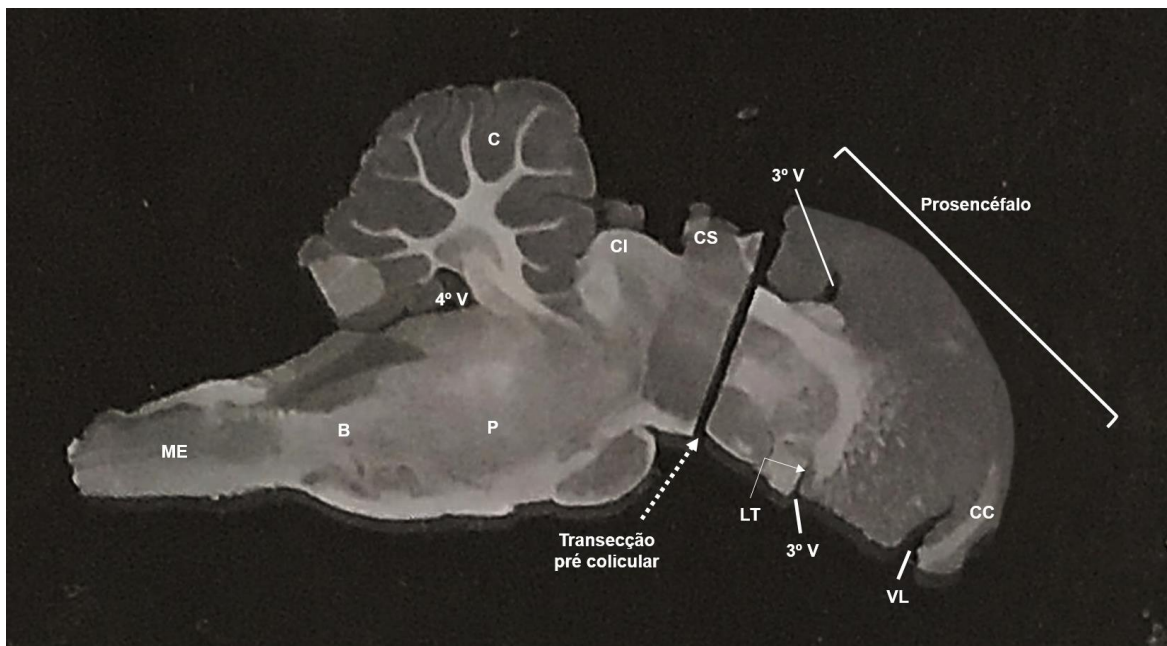


Figura 29. A transecção pré colícular [rostral ao colículo superior (CS)] desconectou o prosencéfalo das demais estruturas encefálicas. Note que a transecção removeu o terceiro ventrículo (3º V) e áreas próximas, como a lâmina terminal (LT). Estruturas mesencefálicas e ponto-bulbares permaneceram intactas. 4º V, quarto ventrículo; B, bulbo; C, cerebelo; CC, corpo caloso; CI, colículo inferior; ME, medula espinhal; P, ponte; VL, ventrículo lateral.

4.2.7.2. Contribuição do prosencéfalo nas respostas simpáticas e ventilatórias induzidas por hiperosmolalidade

A descerebração aboliu o aumento na ANSt ($8,4 \pm 3,7\%$, vs. ratos controles: $63,3 \pm 8,4\%$; $p < 0,05$) e na frequência de ANF ($1,2 \pm 0,4$ cpm, vs. ratos controles: $5,8 \pm 0,9$ cpm; $p < 0,05$) induzido por infusão de NaCl 2 mol/L (Figuras 30 e 31). A ANSt e a frequência de ANF não foram alteradas pelas infusões de NaCl 0,17, 0,3, 0,7 e 1,5 M em ratos descerebrados (Tabela 8).

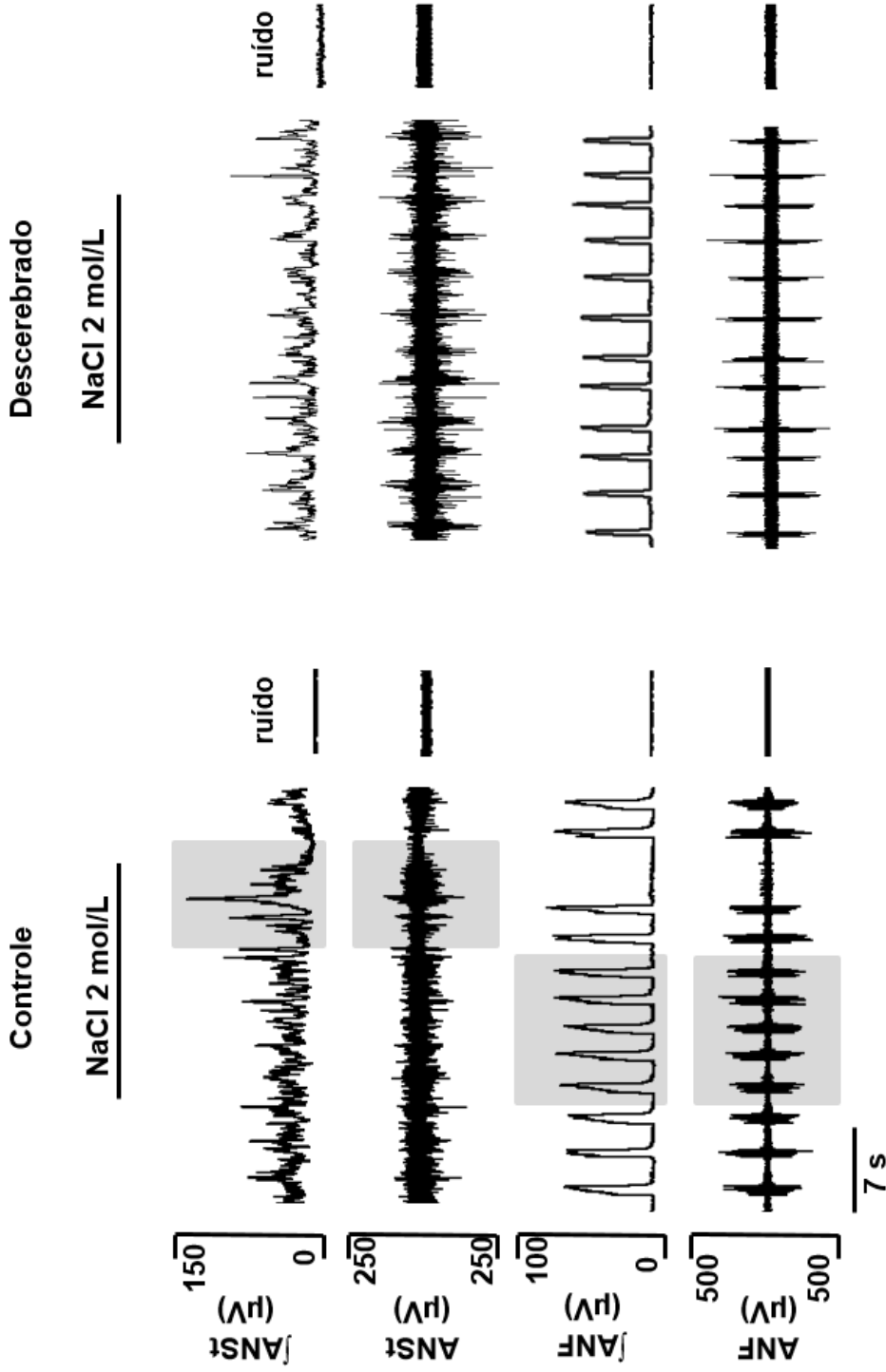


Figura 30. Registros brutos e integrados (\int) das atividades do nervo simpático torácico (ANSt) e nervo frênico (ANF) durante a infusão intra arterial de salina hipertônica 2 mol/L em um rato controle (esquerda) e um rato com transecção pré colicular (direita). As linhas pretas acima dos registros indicam o período das infusões. As alterações na ANS torácica e ANF estão destacadas em cinza

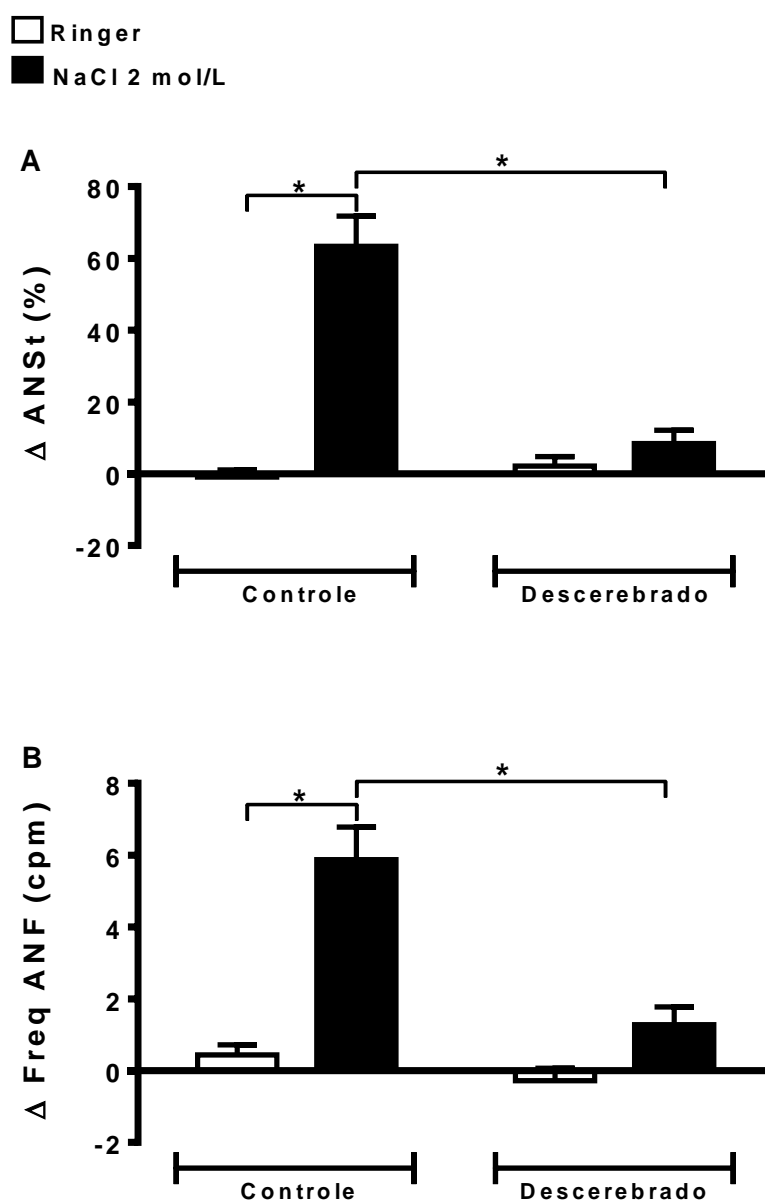


Figura 31. Alterações na atividade do nervo simpático torácico (ANSt) e na frequência de ANF (Freq ANF) durante a infusão de solução de Ringer ou NaCl 2 mol/L em ratos controles (n=16) e descerebrados (n=6). As diferenças foram analisadas utilizando ANOVA *two way* para medidas repetidas seguido pelo pós teste de Bonferroni. *=p<0,05.

Tabela 8. Alterações na ANSt e ANF induzidas por infusão de solução de Ringer e salina hipertônica (NaCl 0,17; 0,3; 0,7 e 1,5 mol/L) em ordem crescente em ratos descerebrados.

Parâmetro	Ringer (%)	0,17 mol/L (%)	0,3 mol/L (%)	0,7 mol/L (%)	1,5 mol/L (%)
ANSt	2,1 ± 2,6	-0,5 ± 4,4	-0,8 ± 2,0	1,3 ± 2,5	4,7 ± 3,4
ANF	-0,2 ± 0,3	0,5 ± 0,3	-0,3 ± 0,4	0,5 ± 0,6	1,0 ± 0,7

Valores estão expressos como média ± EPM. ANSt, atividade do nervo simpático torácico; ANF, atividade do nervo frênico. n=6.

5. DISCUSSÃO

Participação dos aferentes sinoaórticos na simpatoinibição renal induzida por sobrecarga aguda de sódio

A primeira parte de nosso estudo avaliou o envolvimento dos aferentes aórticos e carotídeos na simpatoinibição renal induzida por infusão intravenosa de salina hipertônica. É bem descrito na literatura que os barorreceptores arteriais e quimiorreceptores periféricos atuam na regulação a curto prazo da pressão sanguínea e na detecção de alterações na pressão parcial dos gases sanguíneos (Cowley *et al.*, 1973; Guyton *et al.*, 1972; Kumar & Prabhakar, 2012; Prabhakar & Peng, 2004). Entretanto, a participação destes aferentes na regulação da atividade simpática durante alterações na osmolalidade dos fluidos corporais não haviam sido completamente elucidados. Em nosso estudo, observamos que a DSA previne a simpatoinibição renal induzida por sobrecarga intravenosa de sódio em ratos anestesiados. Estes resultados sugerem o envolvimento dos aferentes sinoaórticos nos ajustes autonômicos induzidos por aumento agudo na concentração plasmática de sódio.

O reflexo barorreceptor arterial é a via primária pela qual o SNC detecta alterações na pressão arterial. Este reflexo atua como um sistema de *feedback* negativo minimizando as flutuações na pressão arterial (Cowley *et al.*, 1973). Por esta razão, a DSA aguda foi associada com o aumento na variabilidade da pressão arterial e transiente hipertensão e taquicardia (Cowley *et al.*, 1973; Barres *et al.*, 1992). Consistentes com estes resultados, observamos aumento na PAM e FC basal em ratos não anestesiados um dia após a denervação sinoaórtica. Métodos recentes para o tratamento da hipertensão têm implicações sobre os barorreceptores arteriais. Heusser *et al.* (2010) mostraram que a estimulação constante dos barorreceptores reduz os elevados níveis de pressão arterial e a atividade nervosa simpática em humanos hipertensos. Em consonância com nossos dados, estes achados reforçam a importância dos aferentes sinoaórticos no controle tônico da pressão arterial.

Estudos sugerem que as fibras associadas com as aferências sinoaórticas estejam envolvidas na detecção de variações no volume e composição do compartimento extracelular (Morris & Alexander, 1988; Antunes-

Rodrigues *et al.*, 1992; Colombari *et al.*, 2000). Colombari *et al.*, (2000), mostraram que a DSA abole a vasodilatação renal induzida por expansão de volume. Ademais, estudos documentaram redução na secreção de ANP induzida por expansão de volume ou sobrecarga de sódio (Morris & Alexander, 1988; Antunes-Rodrigues *et al.*, 1992). Em conformidade com esses achados, nossos dados indicam que os aferentes sinoaórticos têm proeminente papel nos ajustes induzidos por alterações na tonicidade dos fluidos corporais. Vimos que o bloqueio da função destes aferentes pela denervação, aboliu a simpatoinibição renal induzida por hipernatremia aguda. Uma vez que a simpatoinibição renal é um importante ajuste que contribui para a vasodilatação renal e excreção de sódio, nós hipotetizamos que a retenção de sódio observada em ratos DSA (Chen *et al.*, 1998), poderia estar relacionada com a incapacidade destes animais em desencadear esta resposta complexa.

Estudos prévios mostraram aumento na resposta pressora induzida por sobrecarga de sódio em animais DSA (Weiss *et al.*, 1996; Silva *et al.*, 2015). Em nosso estudo, a infusão intravenosa de salina hipertônica promoveu transiente resposta pressora em ratos DSA não anestesiados, sem alterar a ANSr. A bradicardia provocada por salina hipertônica foi abolida pela DSA, indicando o envolvimento do barorreflexo nesta resposta. Em contrapartida, se a simpatoinibição renal fosse consequência do aumento na PAM, esta resposta não ocorreria ou seria menos evidente nos ratos controle, grupo em que o aumento na PAM não foi significativo estatisticamente. Portanto, é lícito supor que as alterações na ANSr ocorrem para excretar o sódio.

Em relação ao sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), sabe-se que a concentração plasmática de sódio está inversamente relacionada com a síntese e liberação de renina: o aumento na concentração plasmática de sódio suprime a renina plasmática (Schweda, 2015). Além disso, alterações na atividade simpática renal afeta o SRAA. A redução na ANSr inibe a secreção de renina (Vandongen *et al.*, 1973; Schweda, 2015). Assim, em ratos controle, a simpatoinibição renal induzida por NaCl hipertônico inibe o SRAA. Esta inibição reduz a angiotensina II e aldosterona circulante, resultando em diminuição na reabsorção tubular de sódio, e consequentemente, aumento na excreção renal de

sódio. Em ratos DSA, uma vez que não há redução da ANSr, presume-se que os níveis de renina circulante estejam maiores comparados com os ratos controle, promovendo redução na excreção de sódio.

O NTS é a porta de entrada das informações produzidas pelos aferentes sinoaórticos no SNC (Spyer, 1981). Neurônios do NTS, por sua vez, projetam-se para o núcleo pré óptico mediano (MnPO) e a região caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) (Tucker *et al.*, 1987; Bailey *et al.*, 2006), envolvidas na regulação da composição dos fluidos corporais (Pedrino *et al.*, 2009; Silva *et al.*, 2013; McKinley *et al.*, 2015). Como a DSA, a lesão dos neurônios noradrenérgicos A1 localizados na região CVLM ou o bloqueio da neurotransmissão adrenérgica no MnPO, também previnem a vasodilatação ou simpatoinibição renal induzidas por infusão intravenosa de salina hipertônica em ratos anestesiados (Pedrino *et al.*, 2006; Pedrino *et al.*, 2008; Pedrino *et al.* 2009). Portanto, informações acerca da concentração plasmática de sódio poderiam ser detectadas pelos receptores sinoaórticos e transmitidas para áreas centrais envolvidas na regulação dos fluidos circulantes. Estes dados sugerem a participação dos aferentes sinoaórticos nas vias neurais envolvidas nas respostas simpáticas à hipernatremia.

Em conclusão, os resultados obtidos nessa parte de nosso estudo sugerem que a integridade dos aferentes aórtico e carotídeos é essencial para os ajustes autonômicos induzidos por sobrecarga aguda de sódio. Estes aferentes integram as vias envolvidas nos ajustes à hipernatremia, visto que a ausência destes ocasiona ineficiente resposta homeostática. Assim, disfunções neste sistema poderiam contribuir para a gênese e agravamento de patologias relacionadas com a retenção de sódio, por exemplo, a hipertensão sal sensível.

Envolvimento dos corpúsculos carotídeos nos ajustes cardiovasculares e renais induzidos por hipernatremia

Após mostrarmos que os aferentes sinoaórticos são essenciais para a manutenção da homeostasia do compartimento extracelular por desempenharem

importante papel nas respostas simpáticas à hipernatremia, nós procuramos investigar o envolvimento dos corpúsculos carotídeos nos ajustes cardiovasculares e renais induzidos por sobrecarga aguda de sódio. Os dados obtidos em nosso estudo mostraram que a remoção dos corpúsculos carotídeos atenua a resposta hipertensiva provocada por infusão intravenosa de salina hipertônica. Além disso, reduz a capacidade de perda de sódio por excreção renal. Estes dados indicam que os corpúsculos carotídeos estão envolvidos nos ajustes homeostáticos induzidos por sobrecarga aguda de sódio.

Em nosso estudo, observamos que a remoção seletiva dos corpúsculos carotídeos não alterou significativamente os níveis basais de pressão arterial, frequência cardíaca e o componente simpático (baixa frequência) da variabilidade da PAS. Estudos recentes mostraram que a denervação dos corpúsculos carotídeos atenua os níveis pressóricos e a modulação simpática vascular em modelos experimentais de hipertensão neurogênica, sem alterar a pressão arterial em animais normotensos (Abdala *et al.*, 2012; Pijacka *et al.*, 2016b). Juntos com nossos achados, estes estudos sugerem a que a hiperatividade dos corpúsculos carotídeos está associada com a ativação simpática e a gênese da hipertensão neurogênica, mas não com a manutenção da pressão arterial em condições adequadas de oferta de gases sanguíneos.

Infusões intravenosas de solução salina hipertônica são comumente usadas para induzir aumento na concentração plasmática de sódio (Alexander *et al.*, 1979; Morris & Alexander, 1988; Silva *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014). Similarmente, em nosso estudo, a infusão de salina hipertônica aumentou o sódio plasmático. Como usado em diferentes estudos, a mensuração do hematócrito é uma medida adotada como indicar de alterações no volume circulante (Amaral *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Estudos mostraram que a infusão de salina hipertônica na mesma concentração e dose utilizadas em nosso estudo (NaCl 3 mmol/L, 1,8 mL/kg de peso corporal) promove aumento agudo na concentração plasmática de sódio e não altera significativamente o volume circulante, evidenciado por ausência de alterações no hematócrito (Silva *et al.*, 2013; Amaral *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2015). Assim, é concebível que os ajustes cardiovasculares e renais induzidos por infusão de salina hipertônica sejam

desencadeados por aumento na concentração plasmática de sódio e não secundários à expansão de volume.

Muitos estudos buscaram compreender os mecanismos envolvidos nas respostas cardiovasculares à infusão de salina hipertônica (Weiss *et al.*, 1996; Pedrino *et al.*, 2005; Pedrino *et al.*, 2006; Silva *et al.*, 2013). Similarmente aos resultados obtidos em outros estudos, verificamos que a infusão de salina hipertônica promoveu transiente aumento na pressão arterial (Hatzinikolaou *et al.*, 1981; Pedrino *et al.*, 2012; Silva *et al.*, 2013). É possível que a resposta pressora à infusão intravenosa de salina hipertônica esteja relacionada com aumento na ANS lombar e liberação de vasopressina (Hatzinikolaou *et al.*, 1981; Weiss *et al.*, 1996). Nosso estudo mostrou que a remoção dos corpúsculos carotídeos atenua o aumento na pressão sanguínea causado por salina hipertônica.

Aqui observamos redução no componente simpático da PAS após a sobrecarga de sódio em ratos controle. Por ser uma avaliação indireta, a análise da variabilidade da PAS indica redução generalizada da atividade simpática após a sobrecarga de sódio. Hipotetizamos que a redução na modulação simpática vasomotora seja reflexa à ativação dos barorreceptores arterial atuando no tamponamento da resposta hipertensiva. Em contrapartida, o efeito hipertensor da salina hipertônica pode ser decorrente de elevada liberação de vasopressina. De fato, aumentos de 1-2% na osmolalidade plasmática são suficientes para desencadear a liberação de vasopressina (Antunes-Rodrigues *et al.*, 2014), a qual desempenha potente efeito vasoconstritor.

Em nosso estudo mostramos que a remoção dos corpúsculos carotídeos reduz a excreção urinária de sódio em resposta ao NaCl hipertônico, indicando que os corpúsculos carotídeos estão envolvidos nos mecanismos determinantes da perda de sódio em condições de alterações na osmolalidade plasmática. Dibona & Sawin (2002) mostraram que a capacidade em estabelecer o balanço de sódio é prejudicada em animais com denervação sinoaórtica tratados com dieta rica em sódio, sugerindo que os aferentes carotídeos estão envolvidos na adequada excreção renal de sódio. Vários fatores poderiam determinar a atenuação da excreção renal de sódio durante desafios hiperosmóticos em ratos

CCX. Morris & Alexander (1988) mostraram que a DSA reduz a concentração plasmática de ANP em resposta à sobrecarga aguda de sódio, indicando que os aferentes aórtico e carotídeos são importantes nos mecanismos de regulação hormonal do equilíbrio hidroeletrolítico. Recentemente, nosso grupo de pesquisa mostrou que a inativação seletiva dos quimiorreceptores dos corpúsculos carotídeos abole a simpatoinibição e vasodilatação renal induzidas por infusão de salina hipertônica (Pedrino *et al.*, 2016). Em conjunto, esses achados sugerem que os corpúsculos carotídeos estão envolvidos nos mecanismos hormonais, autonômicos e hemodinâmicos de regulação da osmolalidade durante estímulos hiperosmóticos.

Em estudos anteriores, nosso grupo de pesquisa mostrou que os ajustes homeostáticos induzidos por sobrecarga aguda de sódio dependem de uma via neuronal envolvendo a ativação de aferentes carotídeos (Pedrino *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2015; Pedrino *et al.*, 2016). Os sinais neurais transmitidos pelos neurônios do NTS – núcleo onde ocorre a primeira sinapse entre aferentes carotídeos e o SNC – alcançam neurônios localizados no bulbo caudal ventrolateral (Bailey *et al.*, 2006). Em estudos anteriores, mostramos que a lesão dos neurônios noradrenérgicos A1 da região CVLM atenua a hipertensão provocada por infusão de salina hipertônica e reduz a capacidade de restauração da osmolalidade fisiológica por excreção renal de sódio (Silva *et al.*, 2013). Assim, é possível que sinais provenientes dos corpúsculos carotídeos integrem as vias neurais de regulação cardiovascular e controle hidroeletrolítico durante alterações agudas na osmolalidade plasmática.

Nessa parte de nosso estudo mostramos que a remoção dos corpúsculos carotídeos reduz a resposta pressora e a excreção renal de sódio induzidas por infusão de salina hipertônica, sugerindo o envolvimento dos corpúsculos carotídeos nos mecanismos cardiovasculares e renais envolvidos no reestabelecimento do equilíbrio hidroeletrolítico.

Contribuição dos corpúsculos carotídeos nas respostas simpáticas e ventilatórias induzidas por hiperosmolalidade aguda

Após determinarmos a participação dos corpúsculos carotídeos nos ajustes cardiovasculares e renais induzidos por hipernatremia aguda *in vivo*, procuramos investigar a importância dos corpúsculos carotídeos nas respostas simpática e ventilatória à hiperosmolalidade aguda utilizando preparações *in situ* de ratos. Corroborando estudos prévios (Antunes *et al.*, 2006; Stocker *et al.*, 2008; Colombari *et al.*, 2010; Stocker *et al.*, 2013; Holbein & Toney, 2015), os resultados apresentados mostram que a hiperosmolalidade ativa o sistema nervoso simpático e a respiração. A osmolalidade do perfusato foi gradualmente aumentada pelas consecutivas adições de NaCl hipertônico, correspondendo a uma elevação em aproximadamente 2% ao final dos testes hiperosmóticos. As infusões intra arteriais de salina hipertônica aumentaram a frequência de disparos do nervo frênico. Exceto pelo discreto aumento na ANSt com a infusão de NaCl 1,5 mol/L, a ANSt e a ANSC aumentaram somente durante a infusão de NaCl 2 mol/L. O aumento na ANSt e na ANF produzidas por hiperosmolalidade foi abolido pela desconexão do prosencéfalo, enquanto que a remoção dos corpúsculos carotídeos atenuou marcadamente a simpatoexcitação, sem alterar a resposta taquipneica. Estes resultados sugerem a participação de áreas prosencéfálicas nas alterações simpática e ventilatória produzidas por hiperosmolalidade. Ademais, eles também indicam que sinais provenientes dos corpúsculos carotídeos, que provavelmente alcançam o prosencéfalo, são essenciais para a completa expressão da resposta simpatoexcitatória durante a estimulação hiperosmótica.

Além de papel na regulação da pressão parcial dos gases sanguíneos e pH (Kumar & Prabhakar, 2012; Prabhakar & Peng, 2004), os resultados obtidos em estudos prévios mostraram que os corpúsculos carotídeos podem atuar nos ajustes reflexos aos estímulos hiperosmóticos (Morris e Alexander, 1988; Silva *et al.*, 2015; Pedrino *et al.*, 2016). Entretanto, a contribuição de sensores periféricos nos mecanismos de controle autonômico e respiratório durante a hiperosmolalidade aguda, e sua relação com o prosencéfalo, não foram completamente elucidados. Aqui, nós mostramos que a ANSC aumenta em

resposta à sobrecarga aguda de sódio. Além disso, nós mostramos, pela primeira vez, que o surgimento da resposta simpatoexcitatória à infusão de NaCl hipertônico ocorre em sincronização com a ativação do nervo do seio carotídeo. A desconexão do prosencéfalo, ao nível pré colicular, aboliu completamente o aumento na ANSt e na frequência de *bursts* do nervo frênico produzidos por infusão de salina hipertônica, enquanto que a remoção dos corpúsculos carotídeos promoveu marcante redução na ANSt, sem afetar significativamente a taquipneia. Estes resultados reforçam a participação de estruturas prosencefálicas nas alterações simpática induzidas por sobrecarga de sódio, como mostrado em estudos anteriores (Antunes *et al.*, 2006; Shi *et al.*, 2007; Colombari *et al.*, 2010; Holbein & Toney, 2015) e sugerem o envolvimento do prosencéfalo nas alterações ventilatórias produzidas por estimulação hiperosmótica. Ademais, nossos resultados indicam que os corpúsculos carotídeos podem atuar como osmossensores periféricos e contribuir para a regulação da atividade simpática durante a sobrecarga aguda de sódio.

Evidências experimentais indicam a natureza multissensorial dos corpúsculos carotídeos (Fung *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2009; Kumar & Prabhakar, 2012). Estudos da década de 70, documentaram que a perfusão da artéria carótida com NaCl hipertônico aumentou a frequência de descarga das fibras aferentes do corpúsculo carotídeo em gatos anestesiados (Trzebski *et al.*, 1978). Gallego *et al.* (1979), em um estudo *in vitro*, mostraram aumento na frequência de descarga das células quimiossensíveis do corpúsculo carotídeo banhado em solução hiperosmótica. Arelando a capacidade de responder a alterações na tonicidade no meio circundante com os efeitos fisiológicos, um estudo realizado em nosso laboratório mostrou que a inativação seletiva dos quimiorreceptores dos corpúsculos carotídeos abole a vasodilatação e simpatoinibição renal evocadas por infusão intravenosa de salina hipertônica em ratos anestesiados (Pedrino *et al.*, 2016), sugerindo que o corpúsculo carotídeo participa dos ajustes simpáticos e hemodinâmicos durante a hipernatremia.

No presente estudo, as infusões intra arteriais de salina hipertônica – mas não de manitol – aumentaram a ANF, ANSt e ANSC, indicando que estas respostas são específicas ao sódio e não devido ao efeito osmótico ou de volume.

Canais de sódio epiteliais (ENaC), sensíveis à amilorida e não dependentes de voltagem, são conhecidos por mediar o transporte de Na⁺ através dos epitélios. Estes canais foram descritos em uma variedade de tecidos, incluindo em áreas centrais implicadas no controle cardiovascular (Amin *et al.*, 2005). Estudos mostraram que a administração intracerebroventricular (ICV) de benzamil, um bloqueador dos canais ENaC, atenua a secreção de vasopressina, a simpatoexcitação à hipernatremia do fluido cerebroespinal e a hipertensão sal sensível (Gomez-Sanchez & Gomez-Sanchez, 1995; Nishimura *et al.*, 1998; Huang & Leenen, 2002; Abrams *et al.*, 2010), sugerindo que estes canais podem atuar como sensores de sódio. Assim, é possível que a ativação simpática e ventilatória induzida por sobrecarga de sódio seja mediada por canais específicos para o sódio.

Informações transmitidas pelos aferentes carotídeos ganham acesso ao SNC por meio de conexões diretas com o NTS (Spyer, 1981), alcançando posteriormente áreas bulbares e hipotalâmicas envolvidas com a regulação simpática e equilíbrio hidroeletrólítico (Tucker *et al.*, 1987; Saper *et al.*, 1983; Bailey *et al.*, 2006; Pedrino *et al.*, 2009; Holbein & Toney, 2015; McKinley *et al.*, 2015; Aicher *et al.*, 1996). Em nosso estudo, a remoção do prosencéfalo em ratos com corpúsculos carotídeos intactos aboliu o aumento na ANSt induzido por infusão de salina hipertônica. Estes resultados indicam que as informações produzidas pelo corpúsculo carotídeo durante a sobrecarga de sódio são processadas no prosencéfalo. Evidências experimentais sugerem que os osmorreceptores centrais no OVLT e no SFO são ativados por estímulos hiperosmóticos e desencadeiam ajustes simpáticos principalmente através de uma via descendente envolvendo o PVN e o MnPO (Shi *et al.*, 2008; Antunes *et al.*, 2006; Pedrino *et al.*, 2009; Holbein & Toney, 2015; McKinley *et al.*, 2015). Nós hipotetizamos que durante a sobrecarga aguda de sódio, os osmorreceptores centrais e os corpúsculos carotídeos são recrutados e fornecem sinais excitatórios para neurônios do PVN que, por sua vez, ativam regiões regulatórias da atividade simpática, incluindo os neurônios pré simpáticos localizados na região RVLM (Brooks *et al.*, 2004) e neurônios pré ganglionares simpáticos na medula espinhal (Antunes *et al.*, 2006) (Figura 32).

Estudo anteriores mostraram que a modulação respiratória da atividade simpática não é alterada durante a infusão intra carotídea de salina hipertônica em ratos adultos anestesiados (Holbein & Toney, 2015). Em nossos experimentos, nós verificamos que a taquipneia à sobrecarga aguda de sódio precede o aumento na ANSt, indicando que a resposta simpatoexcitatória à hiperosmolalidade não está relacionada com as alterações na atividade inspiratória. Por outro lado, nós observamos que o aumento na ANSt foi caracterizado pelo surgimento de *bursts* com grande amplitude durante a fase expiratória do ciclo respiratório (Figura 21), sugerindo que a resposta simpática à hiperosmolalidade aguda é modulada por neurônios que controlam a atividade expiratória. Modificações no padrão de sincronização entre as atividades simpática e respiratória, com a ocorrência de *bursts* adicionais durante o ciclo respiratório, é sugerido como um mecanismo para aumentar a eficiência da transmissão neuroefetora, especialmente entre neurônios pós ganglionares e células musculares lisas vasculares (Gilbey, 2007; Moraes *et al.*, 2014). Além disso, estudos prévios utilizando modelos experimentais de hipertensão neurogênica, como ratos espontaneamente hipertensos (SHR) e ratos submetidos à hipóxia intermitente crônica, documentaram interação reforçada entre neurônios simpáticos e respiratórios durante a fase expiratória, o que pode contribuir para a manutenção da hipertensão arterial (Zoccal *et al.*, 2008; Simms *et al.*, 2009; Moraes *et al.*, 2013; Moraes *et al.*, 2014). Baseado nestas observações, o padrão da sincronização entre as atividades simpáticas e respiratórias durante a hiperosmolalidade, com *bursts* adicionais na fase expiratória, podem representar um importante mecanismo para promover aumento na resistência vascular.

Atualmente os corpúsculos carotídeos têm atraído considerável interesse como um novo alvo para o tratamento da hipertensão neurogênica (Abdala *et al.*, 2012; McBryde *et al.*, 2013; Pijacka *et al.*, 2016a; Pijacka *et al.*, 2016b). Estudos recentes mostraram que a denervação dos corpúsculos carotídeos melhora a hipertensão em SHR e em ratos com hipertensão renovascular (tipo Goldblatt, dois rins um clipe) (Abdala *et al.*, 2012, Pijacka *et al.*, 2016b). Em ambos os casos, estes efeitos foram relacionados com a redução no componente simpático da PAS. Além disso, Pijacka *et al.* (2016a) mostraram que o antagonismo dos

receptores purinérgicos P2X3 resulta em normalização da hiperreflexia do corpúsculo carotídeo e na redução na pressão arterial e atividade simpática basal em SHR. Juntos, estes estudos indicam que a hiperatividade dos corpúsculos carotídeos podem aumentar a resistência vascular, contribuindo para a patogênese da hipertensão. Assim, é importante considerar a possibilidade dos corpúsculos carotídeos estarem envolvidos na hipertensão sal sensível, a qual é acentuadamente marcada por exacerbada ativação do sistema nervoso simpático e alterado controle neurocirculatório (Leenen *et al.*, 2002; Osborn & Fink, 2010; Kandlikar & Fink, 2011).

Nossos resultados sugerem que informações produzidas pelos corpúsculos carotídeos são importantes para os ajustes simpáticos induzidos por sobrecarga aguda de sódio. Em adição aos mecanismos centrais de detecção de alterações na composição dos fluidos circulantes, nossos resultados sugerem que o corpúsculo carotídeo pode atuar como sensor periférico de sódio e regular a atividade simpática durante a infusão de salina hipertônica. É possível que as informações produzidas pelos corpúsculos carotídeos alcancem áreas hipotalâmicas contribuindo para a ativação do sistema nervoso simpático. Neste caso é importante considerar que sinais gerados pelos corpúsculos carotídeos durante a sobrecarga de sódio podem contribuir para o desenvolvimento da hipertensão neurogênica sal sensível.

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos na primeira parte de nosso estudo, em experimentos realizados *in vivo*, mostraram que a denervação sinoaórtica abole a simpatoinibição renal induzida por infusão de salina hipertônica e que a remoção dos corpúsculos carotídeos atenua a resposta pressora e a excreção renal de sódio induzidas por hipernatremia aguda. Estes dados sugerem que os aferentes sinoaórticos estão envolvidos nos ajustes simpáticos para o leito renal, hemodinâmicos e renais induzidos por infusão de salina hipertônica.

Na segunda parte de nosso estudo, utilizando experimentos *in situ*, mostramos que em ratos controle a infusão de salina hipertônica provoca taquipneia e simpatoexcitação, a qual ocorre em sincronização com a ativação do nervo do seio carotídeo. Vimos que a remoção dos corpúsculos carotídeos atenua marcadamente o aumento na atividade simpática induzido por salina hipertônica, sem alterar a resposta taquipneica. Por fim, a transecção rostral ao colículo superior (remove o hipotálamo), abole as respostas ventilatória e simpática induzidas por infusão de salina hipertônica. Esses resultados sugerem que áreas prosencefálicas participam das alterações simpática e ventilatória produzidas por sobrecarga aguda de sódio. Além disso, indica que sinais provenientes dos corpúsculos carotídeos são essenciais para a completa expressão da resposta simpatoexcitatória durante a hiperosmolalidade.

De acordo com os resultados obtidos podemos concluir que as informações produzidas pelos corpúsculos carotídeos são importantes para os ajustes fisiológicos durante alterações na tonicidade dos fluidos circulantes. O aferente carotídeo é sensível à sobrecarga aguda de sódio e a integridade dos corpúsculos carotídeos é essencial para as respostas cardiovasculares, renais e simpáticas induzidas por salina hipertônica. Portanto, os corpúsculos carotídeos estão envolvidos nos ajustes regulatórios durante aumento agudo na tonicidade dos fluidos corporais. Neste sentido, é importante considerar que disfunções nos corpúsculos carotídeos poderiam contribuir para patologias relacionadas com a retenção de sódio, como a hipertensão arterial e insuficiência cardíaca.

7. REFERÊNCIAS

1. Abdala AP, McBryde FD, Marina N, Hendy EB, Engelman ZJ, Fudim M, Sobotka PA, Gourine AV & Paton JF. Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat. *J Physiol* 590(17), 4269–4277, 2012.
2. Abrams JM, Engeland WC & Osborn JW. Effect of intracerebroventricular benzamil on cardiovascular and central autonomic responses to DOCA-salt treatment. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 299(6), R1500–R1510, 2010.
3. Accorsi-Mendonça D, Almado CEL, Bonagamba LGH, Castania JA, Moraes DJA & Machado BH. Enhanced firing in NTS induced by short-term sustained hypoxia is modulated by glia-neuron interaction. *J Neurosci.* 35(17), 6903–6917, 2015.
4. Aicher SA, Saravay RH, Cravo S, Jeske I, Morrison SF, Reis DJ & Milner TA. Monosynaptic projections from the nucleus tractus solitarii to C1 adrenergic neurons in the rostral ventrolateral medulla: comparison with input from the caudal ventrolateral medulla. *J Comp Neurol.* 373(1), 62–75, 1996.
5. Alexander N. Plasma volumes and hematocrits in rats with chronic sinoaortic denervation hypertension. *Am J Phys.* 236(1), H92–H95, 1979.
6. Amaral NO, Naves LM, Ferreira-Neto ML, Freiria-Oliveira AH, Colombari E, Rosa DA, Reis AAS, Ianzer D, Xavier CH & Pedrino GR. Median Preoptic

- Nucleus Mediates the Cardiovascular Recovery Induced by Hypertonic Saline in Hemorrhagic Shock. *Scientific World Journal*. 2014(18), 1-9, 2014.
7. Amin SM, Wang HW, Reza E, Whitman SC, Tuana BS, & Leenen FHH. Distribution of epithelial sodium channels and mineralocorticoid receptors in cardiovascular regulatory centers in rat brain. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 289(6), 1787–1797, 2005.
8. Andrew RD. Seizure and acute osmotic changes: Clinical and neurophysiological aspects. *J Neurol Sci*. 101(1), 7-18, 1991.
9. Anderson JW, Washburn DL & Ferguson AV. Intrinsic osmosensitivity of subfornical organ neurons. *Neuroscience*. 100(3), 539–547, 2000.
10. Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valenca MM & McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev*. 84(1), 169-208, 2004.
11. Antunes-Rodrigues J, Favaretto AL, Gutkowska J & McCann SM. The neuroendocrine control of atrial natriuretic peptide release. *Mol Psychiatry*. 2(5), 359–367, 1997.

12. Antunes-Rodrigues J, Machado BH, Andrade HA, Mauad H, Ramalho MJ, Reis LC, Silva-Netto R, Favaretto AL, Gutkowska J & McCann SM. Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc Natl Acad Sci.* 89(15), 6828–6831, 1992.
13. Antunes-Rodrigues J, Ruginsk SG, Mecawi AS, Margatho LO, Reis VL, Ventura RR, Silva AL, Vilhena-Franco T & Elias LLK. Neuroendocrinology of Hydromineral Homeostasis. In: *Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration*. 1^a ed, Boca Raton. *CRC Press/Taylor & Francis*. 2014.
14. Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D & Paton JF. A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J Physiol.* 576(2), 569–583, 2006.
15. Arieff AI & Guisado R. Effects on the central nervous system of hypernatremic and hyponatremic states. *Kidney Int.* 10(1), 104-116, 1976.
16. Baertschi AJ & Vallet AP. Osmosensitivity of the hepatic portal vein area and vasopressin release in rats. *J Physiol* 315(1), 217-230, 1981.
17. Bailey TW, Hermes SM, Andresen MC & Aicher SA. Cranial visceral afferent pathways through the nucleus of the solitary tract to caudal ventrolateral medulla or paraventricular hypothalamus: target-specific synaptic reliability and convergence patterns. *J. Neurosci.* 26(46), 11893–11902, 2006.

18. Barres C, Lewis SJ, Jacob HJ & Brody MJ. Arterial pressure lability and renal sympathetic nerve activity are dissociated in SAD rats. *Am J Physiol.* 263(3), R639–646, 1992.
19. Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Murphy D, Paulin RF, Antunes-Rodrigues J, Colombari E, Menani JV & Colombari DSA. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 304(7), 531–542, 2013.
20. Bourque CW, Oliet SH & Richard D. Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 15(3), 231-274, 1994.
21. Brooks VL, Freeman KL & O'Donoghue TL. Acute and chronic increases in osmolality increase excitatory amino acid drive of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 287(6), 1359–1368, 2004.
22. Buckler KJ, Williams BA & Honore E. An oxygen-, acid- and anaesthetic-sensitive TASK-like background potassium channel in rat arterial chemoreceptor cells. *J Physiol.* 525(1), 135–142, 2000.
23. Callahan MF, Ludwing M, Tsai KP, Sim LJ & Morris M. Baroreceptor input regulates osmotic control of central vasopressin secretion. *Neuroendocrinology* 65(4), 238-245, 1997.

24. Chen QH, Nishida Y, Zhou MS, Murakami H, Okada K, Morita H, Hosomi H & Hiroaki Kosaka. Sinoaortic denervation produces sodium retention in Dahl salt-sensitive rats. *J Auton Nerv Syst.* 69(1), 56–63, 1998.
25. Choi-Kwon S & Baertschi AJ. Splanchnic osmosensation and vasopressin: mechanisms and neural pathways. *Am J Physiol.* 261(1), 18-25, 1991.
26. Ciriello J & Calaresu FR. Monosynaptic pathway from cardiovascular neurons in the nucleus tractus solitarii to the paraventricular nucleus in the cat. *Brain Research* 193(2), 529-533, 1980.
27. Ciura S & Bourque CW. Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. *J Neurosci.* 26(35), 9069–9075, 2006.
28. Ciura S, Liedtke W & Bourque CW. Hypertonicity sensing in organum vasculosum lamina terminalis neurons: a mechanical process involving TRPV1 but not TRPV4. *J Neurosci.* 31(41), 14669–14676, 2011.
29. Colombari DSA, Colombari E, Freiria-Oliveira AH, Antunes VR, Yao ST, Hindmarch C, Ferguson AV, Fry M, Murphy D & Paton JF. Switching control of sympathetic activity from forebrain to hindbrain in chronic dehydration. *J Physiol.* 589(18), 4457-4471, 2011.

30. Colombari DSA, Colombari E, Lopes OU & Cravo SL. Afferent pathways in cardiovascular adjustments induced by volume expansion in anesthetized rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 279(3), R884–R890, 2000.
31. Colombari E, Colombari DSA, Li H, Shi P, Dong Y, Jiang N, Raizada MK, Sumners C, Murphy D & Paton JFR. Macrophage Migration Inhibitory Factor in the Paraventricular Nucleus Plays a Major Role in the Sympathoexcitatory Response to Salt. *Hypertension.* 56(5), 956–963, 2010.
32. Cserr HR, DePasquale M & Patlak CS. Regulation of brain water and electrolytes during acute hyperosmolality in rats. *Am J Physiol.* 253(3), 522-529, 1987.
33. Cowley AWJr, Liard JF & Guyton AC. Role of baroreceptor reflex in daily control of arterial blood pressure and other variables in dogs. *Circ Res.* 32(5), 564-576, 1973.
34. Dibona GF & Sawin LL. Effect of arterial baroreceptor denervation on sodium balance. *Hypertens.* 40(4), 547–51, 2002.
35. Eyzaguirre C & Koyano B. Effects of hypoxia, hypercapnia and pH on the chemoreceptor activity of the carotid body in vitro. *J Physiol.* 178(3), 385-409, 1965.

36. Fidone SJ, Zapata P & Stensaas LJ. Axonal transport of labeled material into sensory nerve ending of cat carotid body. *Brain Res.* 124(1), 9–28, 1977.
37. Finley JC & Katz DM. The central organization of carotid body afferent projections to the brainstem of the rat. *Brain Res.* 572(1), 108–116, 1992.
38. Fitzsimons JT. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev.* 78(3), 583-686, 1988.
39. Fung ML, Lam SY, Chen Y, Dong X & Leung PS. Functional expression of angiotensin II receptors in type-I cells of the rat carotid body. *Pflugers Arch.* 441(4), 474–480, 2001.
40. Gallego R, Eyzaguirre C & Monti-Bloch L. Thermal and osmotic responses of arterial receptors. *J. Neurophysiol.* 42(3), 665-680, 1979.
41. Gilbey MP. Sympathetic rhythms and nervous integration. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 34(4), 356–361, 2007.
42. Gomez-Nino A, Obeso A, Baranda JA, Santo-Domingo J, Lopez-Lopez JR & Gonzalez C. MaxiK potassium channels in the function of chemoreceptor cells of the rat carotid body. *Am J Physiol Cell Physiol.* 297(3), C715–C722, 2009.

43. Gomez-Sanchez EP & Gomez-Sanchez CE. Effect of central infusion of benzamil on Dahl S rat hypertension. *Am J Physiol.* 269(3), H1044–H1047, 1995.
44. Granjeiro EM, Silva GSF, Giusti H, Oliveira JA, Glass ML & Garcia-Cairasco N. Behavioral, ventilatory and thermoregulatory responses to hypercapnia and hypoxia in the wistar audiogenic rat (WAR) strain. *PLoS One.* 11(5), 1-16, 2016.
45. Gullans SR & Verbalis JG. Control of brain volume during hyperosmolar and hypoosmolar conditions. *Annu Rev Med.* 44(1), 289-301, 1993.
46. Gutman MB, Ciriello J & Mogenson GJ. Effects of plasma angiotensin II and hypernatremia on subfornical organ neurons. *Am J Physiol.* 254(5), R746–754, 1988.
47. Guyton AC, Coleman TG, Cowley AWJr, Liard JF, Norman RAJr & Manning RDJr. Systems analysis of arterial pressure regulation and hypertension. *Ann Biomed Eng* 1(2), 254-281, 1972.
48. Hatzinikolaou P, Gavras H, Brunner HR & Gavras I. Role of vasopressin, catecholamines, and plasma volume in hypertonic saline-induced hypertension. *Am J Physiol.* 240(6), H827–H831, 1981.

49. Heusser K, Tank J, Engeli S, Diedrich A, Menne J, Eckert S, Peters T, Sweep FC, Haller H, Pichlmaier AM, Luft FC & Jordan J. Carotid baroreceptor stimulation, sympathetic activity, barore_ex function, and blood pressure in hypertensive patients. *Hypertension*. 55(3), 619–626, 2010.
50. Heymans CBJJaDL. Sinus carotidien et reflexes respiratoires. II: Influences respiratoires reflexes de l'acidose, de l'alcalose, de l'anhydride carbonique, de l'ion hydrogene et de l'anoxemie: sinus carotidiens et echanges respiratoires dans les poumons et au dela poumons. *Arch Int Pharmacodyn Ther*. 39(1), 400–408, 1930.
51. Holbein WW & Toney GM. Activation of the Hypothalamic Paraventricular Nucleus by Forebrain Hypertonicity Selectively Increases Tonic Vasomotor Sympathetic Nerve Activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 308(5), 351-359, 2015.
52. Holbein WW & Toney GM. Sympathetic network drive during water deprivation does not increase respiratory or cardiac rhythmic sympathetic nerve activity. *J Appl Physiol*. 114(12), 1689–1696, 2013.
53. Huang BS & Leenen FH. Brain amiloride-sensitive Phe-Met-Arg-Phe-NH(2)-gated Na⁽⁺⁾ channels and Na⁽⁺⁾-induced sympathoexcitation and hypertension. *Hypertension*. 39(2), 557–561, 2002.

54. Huang W , Lee SL & Sjoquist M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. *Am J Physiol.* 268(3), 634-640, 1995.
55. Iturriaga R & Alcayaga J. Neurotransmission in the carotid body: transmitters and modulators between glomus cells and petrosal ganglion nerve terminals. *Brain Res Rev.* 47(1), 46–53, 2004.
56. Iturriaga R, Varas R & Alcayaga J. Electrical and pharmacological properties of petrosal ganglion neurons that innervate the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol.* 157(1), 130–139, 2007.
57. Izal-Azcarate A, Belzunegui S, San Sebastian W, Garrido-Gil P, Vazquez-Claverie M, Lopez B, Marcilla I & Luquin MA. Immunohistochemical characterization of the rat carotid body. *Respir Physiol Neurobiol.* 161(1), 95–99, 2008.
58. Johns EJ, Kopp UC & DiBona GF. Neural Control of Renal Function. *Compr Physiol.* 1(2), 731-767, 2011
59. Julien C, Saul JP & Parati G. Very low frequency blood pressure fluctuations: not only myogenic responsiveness. *J Hypertens.* 26(6), 1065-1068, 2008.
60. Kc P, Haxhiu MA, Tolentino-Silva FP, Wu M, Trouth CO & Mack SO. Paraventricular vasopressin-containing neurons project to brain stem and

- spinal cord respiratory-related sites. *Respir Physiol Neurobiol.* 133(1), 75–88, 2002.
61. Kameda Y. Mash1 is required for glomus cell formation in the mouse carotid body. *Dev Biol.* 283(1), 28–139, 2005.
62. Kandlikar SS & Fink GD. Splanchnic sympathetic nerves in the development of mild DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301(5), H1965–1973, 2011.
63. Kinsman BJ, Simmonds SS, Browning KN & Stocker SD. Organum vasculosum of the lamina terminalis detects NaCl to elevate sympathetic nerve activity and blood pressure. *Hypertens.* 69(1), 163-170, 2017.
64. Kobashi M & Adachi A. Convergence of hepatic osmoreceptive inputs on sodium-responsive units within the nucleus of the solitary tract of the rat. *J Neurophysiol.* 54(2), 212-219, 1985.
65. Krieger EM. Neurogenic hypertension in the rat. *Circ Res.* 15(1), 511-521, 1964.
66. Kumar P & Prabhakar NR. Peripheral Chemoreceptors: Function and Plasticity of the Carotid Body. *Compr Physiol.* 2(1), 141–219, 2012.

67. Leenen FH, Ruzicka M & Huang BS. The brain and salt-sensitive hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 4(2), 129–135, 2002.
68. Liu X, He L, Stensaas L, Dinger B & Fidone S. Adaptation to chronic hypoxia involves immune cell invasion and increased expression of inflammatory cytokines in rat carotid body. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 296(2), 158–166, 2009.
69. Mack SO, Kc P, Wu M & Coleman BR. Tolentino-Silva FP, Haxhiu MA. Paraventricular oxytocin neurons are involved in neural modulation of breathing. *J Appl Physiol.* 92(2), 826–834, 2002.
70. Mack SO, Wu M, Kc P & Haxhiu MA. Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in pre-Botzinger complex. *J Appl Physiol* 102(1), 189–199, 2007.
71. McBryde FD, Abdala AP, Hendy EB, Pijacka W, Marvar P, Moraes DJ, Sobotka PA & Paton JF. The carotid body as a putative therapeutic target for the treatment of neurogenic hypertension. *Nat Commun.* 2395, 1-11, 2013.
72. McDowall LM, Horiuchi J & Dampney RA. Effects of disinhibition of neurons in the dorsomedial hypothalamus on central respiratory drive. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293(4), 1728–1735, 2007.

73. McKinley MJ & Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci.* 19(1), 1–6, 2004.
74. McKinley MJ, Mathai ML, McAllen RM, McClear RC, Miselis RR, Pennington GL, Vivas L, Wade JD & Oldfield BJ. Vasopressin secretion: Osmotic and hormonal regulation by the lamina terminalis. *Neuroendocrinol.* 16(4), 340-347, 2004.
75. McKinley MJ, Mathai ML, Pennington G, Rundgren M & Vivas L. Effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. *Am J Physiol.* 276(3), 673-683, 1999.
76. McKinley MJ, Yao ST, Uschakov A, McAllen RM, Rundgren M & Martelli D. The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiol.* 214(1), 8–32, 2015.
77. Malliani A, Pagani M, Lombardi F & Cerutti S. Cardiovascular neural regulation explored in the frequency domain. *Circulation.* 84(2), 482-492, 1991.
78. Moraes DJA, Bonagamba LGH, Zoccal DB & Machado BH. Modulation of respiratory responses to chemoreflex activation by L-glutamate and ATP in the rostral ventrolateral medulla of awake rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 300(6), 1476–1486, 2011.

79. Moraes DJ, da Silva MP, Bonagamba LG, Mecawi AS, Zoccal DB, Antunes-Rodrigues J, Varanda WA & Machado BH. Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by the respiratory network in rats. *J Neurosci.* 33(49), 19223-19237, 2013.
80. Moraes DJ, Machado BH & Paton JFR. Carotid body overactivity induces respiratory neurone channelopathy contributing to neurogenic hypertension. *J Physiol.* 593(14), 3055-3063, 2015.
81. Moraes DJ, Machado BH & Zoccal DB. Coupling of respiratory and sympathetic activities in rats submitted to chronic intermittent hypoxia. *Prog Brain Res.* 212(1), 25-38, 2014.
82. Morris M & Alexander N. Baroreceptor influences on plasma atrial natriuretic peptide (ANP): sinoaortic denervation reduces basal levels and the response to an osmotic challenge. *Endocrinology.* 122(1), 373-375, 1988.
83. Morris M & Alexander N. Baroreceptor influences on oxytocin and vasopressin secretion. *Hypertension.* 13(2), 110-114, 1989.
84. Morita H, Matsuda T, Tanaka K & Hosomi H. Role of hepatic receptors in controlling body fluid homeostasis. *Jpn J Physiol.* 45(3), 355-368, 1995.
85. Negoro H, Higuchi T, Tadokoro Y & Honda K. Osmoreceptor Mechanism for Oxytocin Release in the Rat. *Jpn J Physiol.* 38(1), 19-31, 1988.

86. Nishimura M, Ohtsuka K, Nanbu A, Takahashi H & Yoshimura M. Benzamil blockade of brain Na⁺ channels averts Na⁺-induced hypertension in rats. *Am J Physiol.* 274(3), R635–R644, 1998.
87. Nurse CA. Neurotransmission and neuromodulation in the chemosensory carotid body. *Autonom Neurosci Basic Clin.* 120(1), 1–9, 2005.
88. Osborn JW & Fink GD. Region specific changes in sympathetic nerve activity in AngII-salt hypertension in the rat. *Exp Physiol.* 95(1), 61-68, 2010.
89. Pardal R & Lopez-Barneo J. Low glucose—sensing cells in the carotid body. *Nat Neurosci.* 5(3), 197–208, 2002.
90. Panneton WM & Loewy AD. Projections of the carotid sinus nerve to the nucleus of the solitary tract in the cat. *Brain Research.* 191(1), 239-244, 1980.
91. Paton JF. A working heart-brainstem preparation of the mouse. *J Neurosci Methods.* 65(1), 63–68, 1996.
92. Pedrino GR, Maurino I, Colombari DAS & 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.* 91(6), 995–1005, 2006.

93. 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*. 7(5), 1-9, 2012.
94. Pedrino GR, Monaco LR & Cravo SL. Renal vasodilation induced by hypernatraemia: role of alpha-adrenoceptors in the median preoptic nucleus. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 36(12), 83-89, 2009.
95. Pedrino GR, Mourão AA, Moreira MCS, Silva EF, Lopes PR, Fajemiroye JO, Schoorlemmer GHM, Sato MA, Reis AAS, Rebelo ACS & Sergio L. Cravo. Do the carotid body chemoreceptors mediate cardiovascular and sympathetic adjustments induced by sodium overload in rats? *Life Sci*. 153(1), 9–16, 2016.
96. Pedrino GR, Rosa DA, Korim WS & Cravo SL. Renal sympathoinhibition induced by hypernatremia: involvement of A1 noradrenergic neurons. *Autonom Neurosci Basic Clin*. 142(1), 55–63, 2008.
97. Pedrino GR, Rossi MV, Schoorlemmer GHM, Lopes OU & Cravo SL. Cardiovascular adjustments induced by hypertonic saline in hemorrhagic rats: Involvement of carotid body chemoreceptors. *Auton Neurosci*. 160(1), 37–41, 2011.
98. Pedrino GR, Sera CTN, Cravo SL & Colombari DS. Anteroventral third ventricle lesions impair cardiovascular responses to intravenous hypertonic saline infusion. *Auton Neurosci*. 117(1), 9–16, 2005.

-
99. Peers C, Wyatt CN & Evans AM. Mechanisms for acute oxygen sensing in the carotid body. *Respir Physiol Neurobiol.* 174(3), 292-298, 2010.
100. Peng YJ, Nanduri J, Raghuraman G, Souvannakitti D, Gadall MM, Kumar GK, Snyder SH & Prabhakar NR. H₂S mediates O₂ sensing in the carotid body. *Proc Natl Acad Sci.* 107(23), 10719–10724, 2010.
101. Pijacka W, Moraes DJA, Ratcliffe LEK, Nightingale AK, Hart EC, Silva MP, Machado BH, McBryde FD, Abdala AP, Ford AP & Paton JFR. Purinergic receptors in the carotid body as a new drug target for controlling hypertension. *Nat Med.* 22(10), 1151-1159, 2016a.
102. Pijacka W, McBryde FD, Marvar PJ, Lincevicius GS, Abdala AP, Woodward L, Li D, Paterson DJ & Paton JF. Carotid sinus denervation ameliorates renovascular hypertension in adult Wistar rats. *J Physiol.* 594(21), 6255-6266, 2016b.
103. Prabhakar NR & Peng Y. Peripheral chemoreceptors in health and disease. *J Appl Physiol.* 96(1), 359-366, 2004.
104. Robertshaw D. Central and peripheral osmoreceptors. *Acta Physiol Scand.* 583(1), 151-156, 1989.
105. Schweda F. Salt feedback on the renin-angiotensin-aldosterone system. *Eur J Physiol.* 467(3), 565–576, 2015.

106. Saper CB, Reis DJ & Joh T. Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *Neurosci Lett.* 42(3), 285-291, 1983.
107. Sawchenko PE & Swanson LW. The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *J Comp Neurol* 218(2), 121–144, 1983.
108. Schlenker E, Barnes L, Hansen S & Martin D. Cardiorespiratory and metabolic responses to injection of bicuculline into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of conscious rats. *Brain Res.* 895(1), 33–40, 2001.
109. Shi P, Martinez MA, Calderon AS, Chen Q, Cunningham JT & Toney GM. Intra-carotid hyperosmotic stimulation increases Fos staining in forebrain organum vasculosum laminae terminalis neurones that project to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Physiol.* 586(21), 5231–5245, 2008.
110. Shi P, Stocker SD & Toney GM. Organum vasculosum laminae terminalis contributes to increased sympathetic nerve activity induced by central hyperosmolality. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 293(6), 2279–2289, 2007.
111. Silva EF, Freiria-Oliveira AH, Custódio CH, Ghedini PC, Bataus LA, Colombari E, de Castro CH, Colugnati DB, Rosa DA, Cravo SL & Pedrino

- GR. A1 noradrenergic neurons lesions reduce natriuresis and hypertensive responses to hypernatremia in rats. *Plos One*. 8(9), 1-11, 2013.
112. Silva EF, Sera CTN, Mourão AA, Lopes PR, Moreira MCS, Ferreira-Neto ML, Colombari DSA, Cravo SLD & Pedrino GR. Involvement of sinoaortic afferents in renal sympathoinhibition and vasodilation induced by acute hypernatremia. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 42(11), 1135-1141, 2015.
113. Simms AE, Paton JFR, Pickering AE & Allen AM. Amplified respiratory–sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? *J Physiol*. 587(3), 597–610, 2009.
114. Smith PG & Mills E. Autoradiographic identification of the terminations of petrosal ganglion neurons in the cat carotid body. *Brain Res*. 113(1), 174–178, 1976.
115. Spyer KM. Neural organisation and control of the baroreceptor reflex. *Rev Physiol Biochem Pharmacol*. 88(1), 24-124, 1981.
116. Starbuck EM & Fitts DA. Effects of SFO lesion or captopril on drinking induced by intragastric hypertonic saline. *Brain Res*. 795(1), 37–43, 1998.
117. Stocker SD, Monahan KD & Browning NK. Neurogenic and Sympathoexcitatory Actions of NaCl in Hypertension. *Curr Hypertens Rep* 15(6), 538–546, 2013.

118. Stocker SD, Osborn JL & Carmichael SP. Forebrain osmotic regulation or the sympathetic nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 35(1), 695–700, 2008.
119. Strange K. Cellular and Molecular Physiology of Cell Volume Regulation.1^a ed. Boca Raton, *CRC Press*,1993.
120. Takamata A, Mack GW, Gillen CM & Nadel ER. Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement. *Am J Physiol Regul Int Comp Physiol*. 266(5), R1493–R1502, 1994.
121. Taylor AC, McCarthy JJ & Stocker SD. Mice lacking the transient receptor vanilloid potential 1 channel display normal thirst responses and central Fos activation to hypernatremia. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 294(4), R1285–R1293, 2008.
122. Thrasher TN, Keil LC & Ramsay DJ. Lesions of the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) attenuate osmotically-induced drinking and vasopressin secretion in the dog. *Endocrinology*. 110(5), 1837–1839, 1982.
123. Toney GM, Chen QH, Cato MJ & Stocker SD. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand*. 177(1), 43–55, 2003.

124. Toney GM & Stocker SD. Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: implications for cardiovascular disease. *J Physiol.* 588(18), 3375–3384, 2010.
125. Trzebski A, Lech C & Stanislaw M. Effect of osmotic stimuli on the carotid baroreceptor and chemoreceptor discharge in cats. *Acta Physiol Pol.* 29(4), 373-377, 1978.
126. Tucker DC, Saper CB, Ruggiero DA & Reis DJ. Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J Comp Neurol.* 259(4), 591-603, 1987.
127. Tucker AB & Stocker SD. Hypernatremia-induced vasopressin secretion is not altered in TRPV1^{-/-} rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 311(3), R451–R456, 2016.
128. Vandongen R, Peart WS & Boyd GW. Adrenergic Stimulation of Renin Secretion in the Isolated Perfused Rat Kidney. *Circulation Research.* 32(1), 290-296, 1973.
129. Verney EB. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. *Proc R Soc London.* 135(878), 25-106, 1947.

130. Weiss ML, Claassen DE, Hirai T & Kenney MJ. Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion. *J Auton Nerv Syst.* 57(1), 109–115, 1996.
131. Williams BA & Buckler KJ. Biophysical properties and metabolic regulation of a TASK-like potassium channel in rat carotid body type 1 cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 286(1), L221–L230, 2004.
132. Yao ST, Antunes VR, Bradley PMJ, Kasparov S, Ueta Y, Paton JFR & Murphy D. Temporal profile of arginine vasopressin release from the neurohypophysis in response to hypertonic saline and hypotension measured using a fluorescent fusion protein. *J Neurosci Methods.* 201(1), 191– 195, 2011.
133. Yeh ER, Erokwu B, LaManna JC & Haxhiu MA. The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat. *Neurosci Lett.* 232(2), 63–66, 1997.
134. Zhang XJ, Wang X, Xiong LZ, Fan J, Duan XL & Wang BR. Upregulation of IL-1 receptor type I and tyrosine hydroxylase in the rat carotid body following intraperitoneal injection of IL-1beta. *Histochem Cell Biol.* 128(6), 533–540, 2007.
135. Zoccal DB, Simms AE, Bonagamba LG, Braga VA, Pickering AE, Paton JF & Machado BH. Increased sympathetic outflow in juvenile rats submitted to

chronic intermittent hypoxia correlates with enhanced expiratory activity. *J Physiol.* 586(13), 3253–3265, 2008.

ANEXOS

1. Artigo publicado relacionado à tese

1.1. INVOLVEMENT OF SINOARTIC AFFERENTS IN RENAL SYMPATHOINHIBITION AND VASODILATION INDUCED BY ACUTE HYPERNATREMIA (2015)

2. Artigos publicados não relacionados à tese

2.1. A1 NORADRENERGIC NEURONS LESIONS REDUCE
NATRIURESIS AND HYPERTENSIVE RESPONSES TO
HYPERNATREMIA IN RATS (2013)

2.2. INVOLVEMENT OF THE MEDIAN PREGNANT NUCLEUS IN BLOOD PRESSURE CONTROL (2014)

2.3. HYPOTENSIVE AND VASORELAXANT EFFECTS OF (E) –
METHYL ISOEUGENOL: A NATURALLY OCCURRING FOOD
FLAVOUR (2014)

2.4. HYPOTENSIVE AND ANTIHYPERTENSIVE POTENTIAL OF 4-
[(1-PHENYL-1H-PYRAZOL-4-YL) METHYL]1-PIPERAZINE
CARBOXYLIC ACID ETHYL ESTER: A PIPERAZINE
DERIVATIVE (2014)

2.5. HIGH SODIUM INTAKE DURING POSTNATAL PHASES
INDUCES AN INCREASE IN ARTERIAL BLOOD PRESSURE IN
ADULT RATS (2014)

2.6. NEUROPATHWAYS INVOLVED IN THE REGULATION OF CIRCULATING VOLUME (2015)

2.7. DO THE CAROTID BODY CHEMORECEPTORS MEDIATE
CARDIOVASCULAR AND SYMPATHETIC ADJUSTMENTS
INDUCED BY SODIUM OVERLOAD IN RATS? (2016)

2.8. BLOCKADE OF ROSTRAL VENTROLATERAL MEDULLA (RVLM) BOMBESIN RECEPTOR TYPE 1 DECREASES BLOOD PRESSURE AND SYMPATHETIC ACTIVITY IN ANESTHETIZED SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS (2016)