



Sociedade Brasileira de Fisiologia
SBFis



Universidade Federal da Paraíba
Centro de Biotecnologia



Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Participação da glia hipotalâmica na modulação das respostas neuroendócrinas, comportamentais e cardio-respiratórias induzidas pela angiotensina II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados

Atalia Ferreira de Lima Flôr

JOÃO PESSOA / PB

2016

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Biotecnologia
Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Participação da glia hipotalâmica na modulação das respostas neuroendócrinas, comportamentais e cardio-respiratórias induzidas pela angiotensina II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados

Atalia Ferreira de Lima Flôr

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia- SBFis, associada ao Centro de Biotecnologia na Universidade Federal da Paraíba (Cbiotec-UFPB), como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof^a Dr^a Josiane de Campos Cruz

Co-orientador: Prof Dr Valdir de Andrade Braga

JOÃO PESSOA / PB

2016

F632p Flôr, Atalia Ferreira de Lima.
Participação da glia hipotalâmica na modulação das respostas neuroendócrinas, comportamentais e cardio-respiratórias induzidas pela angiotensina II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados / Atalia Ferreira de Lima Flôr.- João Pessoa, 2016.
84f. : il.
Orientadora: Josiane de Campos Cruz
Coorientador: Valdir de Andrade Braga
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CB
1. Fisiologia. 2. Astrócitos. 3. Vasopressina. 4. Ocitocina. 5. Ingestão de sódio. 6. Resposta pressora. 7. Frequência respiratória.

UFPB/BC

CDU: 612(043)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluna: Atalia Ferreira de Lima Flôr

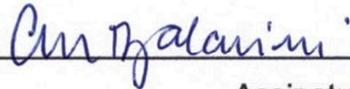
Título: Participação da glia hipotalâmica na modulação das respostas neuroendócrinas, comportamentais e cardio-respiratórias induzidas pela angiotensina II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Camille de Moura Balarini

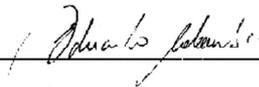
Instituição: Departamento de Fisiologia e Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba.



Assinatura

Prof Dr Eduardo Colombari

Instituição: Departamento de Fisiologia e Patologia da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mequista, Campus Araraquara/SP.



Assinatura

Prof Dr João Henrique da Costa e Silva

Instituição: Centro Acadêmico de Vitória de Santo Antão da Universidade Federal de Pernambuco.

Assinatura

JOÃO PESSOA / PB

2016

APOIO FINACEIRO

PVE/CAPES 8888.1.062209/2014.1.

CNPq 161260/2015-2

A minha filha, Marrie Valentine

Cada segundo do tempo que lhe foi roubado me estimulou a lutar para buscar um futuro melhor pra você. Obrigada por cada sorriso, cada beijo, cada afago, sua existência traz sentido a esse mundo, a mamãe te ama demais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Deus que sirvo em espírito e em verdade pela saúde e perseverança que sempre tive.

Aos meus pais, Onã e Terezinha, que mais do que me proporcionar uma boa infância e vida acadêmica, moldaram os fundamentos do caráter que hoje tenho e me orgulho. Em especial a minha querida mãe, que por vezes sorria e sofria com minhas conquistas e desenganos, mas que sempre me estimulou a lutar e nunca desistir dos meus sonhos. Seu espírito guerreiro e materno sempre será meu maior exemplo.

Ao meu esposo, Felipe, um amigo improvável que Deus moldou a sua maneira para ser meu maior companheiro e me fazer feliz, sempre. Te amo!

A minha filha amada, Marrie Valentine, sua chegada me trouxe um sentimento que não cabe em mim, que transborda e me faz cada dia querer ser melhor pra você. Te amo!

A minha outra família, Ivanize, Airton e Fernanda, vocês são uns dos melhores presentes que Deus me deu. Obrigada sempre pelo apoio constante, pela acolhida e pelo amor de vocês.

A minha Orientadora, Prof^a Josiane Cruz, uma das pessoas mais competentes das quais tive o prazer de trabalhar, o meu mais profundo afeto, agradecimento e admiração.

As técnicas do nosso laboratório LACONCHA, Clênia e Sara, e aos demais Professores da área de Fisiologia do Departamento de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba – CBIOTEC/UFPB – Prof^a Camille, Prof^a Maria de Socorro, Prof José Luiz, Prof^a Juliana e especialmente ao Prof Valdir Braga por todo o suporte laboral que nos proporcionou no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof José Antunes-Rodrigues do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP e a Prof^a Silvia Ruginsk do Departamento de Ciências

Fisiológicas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Alfenas/MG pelo auxílio no procedimento do radioimunoensaio.

Aos meus colegas de Pós Renata, Taísa, James, Clênia, Chris, Márcia, Fany, Dayse, Júnior, Aracely e Aline. Especialmente à Renata, por seu companheirismo e afeto, ele é inteiramente recíproco.

Aos demais companheiros de Laboratório Drielle, Ricardo, Luciano, Leônidas e Patrícia.

Aos meus amigos queridos Radamis, Débora, Tayla, Brenda, Rayssa, Gilana, Renã, Paloma, Daniel, Isabela, Ana, Cosmo, Jennifer, Rafael Xavier, Jéssica, Louise, Luana, Rafael Dourado, Júlia, Viviane, Janaína, Daniela, Lucas, Mateus e a todos os alunos do Curso de Biotecnologia pelo carinho e apoio direta ou indiretamente. Especialmente à Radamis, Débora e Tayla, meus amigos de laboratório com os quais dividi momentos especiais que nunca vou esquecer.

A todos os demais professores da Pós de Fisiologia e do curso de Biotecnologia: Prof Ian Porto, Profª Tatjana Keesen, Profª Sandra Mascarenhas, Profª Fabíola Nunes, Prof Rafael Travassos, Prof Ulrich Vasconcelos, Profª Flávia Paulino, Profª Sildivane Silva, Prof Kristerson Freire e à Emilinha, secretária do curso de Biotecnologia- UFPB.

Aos órgãos de fomento, CAPES e CNPq, sem os quais muito não seria concretizado. Especialmente ao CNPq (Processo nº 161260/2015-2) pela concessão da bolsa de mestrado.

LISTA DE ABRAVIATURAS E SIGLAS

[Ca²⁺]: Concentração intracelular de Cálcio

AMPA: Alfa-amino-3-hidroxi-metil-5-4-isoxazolpropiónico

ANOVA: Análise de normalidade e variância

ANG II: Angiotensina II

AT¹R: Receptor Angiotensinérgico do subtipo 1

AT²R: Receptor Angiotensinérgico do subtipo 2

ATP: Adenosina Trifosfato

AV3V: Antero Ventral ao 3º Ventrículo

AVP: Vasopressina

AP: Anteroposterior

bpm: Batimentos por minutos

CeA: Núcleo Central da amígdala

CIL: Coluna intermediolateral

DV: Dorsoventral

EPM: Erro padrão da média

FC: Frequência Cardíaca

FCt: Fluocitrato

F_R: Frequência Respiratória

GABA: ácido gama-aminobutírico

icv: Intracerebroventricular

ip: intraperitonal

iv: intravenosa

JNK: c-Jun N-terminal quinase

KF: Kölliker-Fuse

LL: Laterolateral

MAPK: Proteína quinase ativadas por mitógenos

NaCl: Cloreto de Sódio

NMDA: N-metil D-Aspartato

NMF: Núcleo Motor do Frênico

NPBL: Núcleo Parabraquial Lateral

NRT: Núcleo Retrotrapezóide

NSL: Núcleo do Septo Lateral

NTS: Núcleo do Trato Solitário

OVLT: Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal
OT: Ocitocina
PAM: Pressão Arterial Média
PMSF: Fenil-metil-sulfonil-fluoreto
PVN: Núcleo Paraventricular
RIE: Radioimunoensaio
RPM: rotações/min
RV: Registro Ventilatório
RVLM: Bulbo Ventro Lateral Rostral
SFO: Órgão Subfornical
SNC: Sistema Nervoso Central
SON: Núcleo Súpra-Óptico
SRA: Sistema Renina Angiotensina
SVB: Superfície Ventral do Bulbo
TTX: Tetrodotoxina
V_c: Volume Corrente
V_M: Ventilação/min.
VL: Ventrículo Lateral
WKT: Linhagem Wistar Kyoto

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ativação do sistema renina-angiotensina periférico gerando respostas neuroendócrinas, comportamentais e cardiovasculares promovidas pela ANG II na região da lâmina terminal.	20
Figura 2: Componentes centrais da regulação das respostas neuroendócrinas, comportamentais, cardiovasculares e respiratórias promovidas pela ANG II na região da lâmina terminal.	22
Figura 3: Representação esquemática da hipótese de trabalho deste projeto..	30
Figura 4: Ilustração do procedimento de implantação do cateter arterial	36
Figura 5: Fotomicrografia de um corte histológico coronal no encéfalo de um rato representativo.	43
Figura 6: Liberação de vasopressina plasmática induzida pela microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II, FCt e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL.	45
Figura 7: Liberação de ocitocina plasmática induzida pela microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II, FCt e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL	46
Figura 8: Ingestão não cumulativa e cumulativa de água induzida pela microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II, FCt e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL	48
Figura 9: Ingestão cumulativa de água induzida pela microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II, FCt e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL	49
Figura 10: Ingestão não cumulativa e cumulativa de sódio (1,5%) induzida pela microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II, FCt e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL.	50
Figura 11: Ingestão cumulativa de sódio (1,5%) induzida pela microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II, FCt e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL.	51
Figura 12: Traçado de um animal, representativo do grupo, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e frequência respiratória (F_R) à microinjeção de ANG II antes e aos 5 e 30 minutos após a microinjeção de FCt no VL de ratos não anestesiados	54
Figura 13: Valores da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) basais e à microinjeção de ANG II ou Salina estéril 0,9% no VL	55
Figura 14: Valores da pressão arterial média (PAM) e da frequência cardíaca (FC) basais e à microinjeção de ANG II ou FCt no VL	56

Figura 15: Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca (Δ FC) à microinjeção de ANG II antes e aos 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção de Salina estéril 0,9% no VL.....	57
Figura 16: Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e da frequência cardíaca basais (Δ FC) à microinjeção de ANG II antes e aos 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção de FCt no VL	58
Figura 17: Frequência respiratória (F_R), volume corrente (V_C) e Ventilação/min. (V_M) à microinjeção de ANG II antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após a microinjeção de Salina estéril 0,9% no VL.....	60
Figura 18: Frequência respiratória (F_R), volume corrente (V_C) e Volume/min. (V_M) à microinjeção de ANG II antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após a microinjeção de FCt no VL	61
Figura 19: Participação das células da glia da região da lâmina terminal na inibição tônica da liberação de OT plasmática e na modulação da liberação de AVP plasmática induzida pela ANG II no VL	65
Figura 20: Participação das células da glia da região da lâmina terminal exercendo tanto efeito estimulatório tônico sobre a ingestão de sódio, quanto efeito estimulatório à resposta da ANG II no VL.....	68
Figura 21: Participação das células da glia e dos neurônios da região da lâmina terminal na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo estímulo da ANG II no VL	70
Figura 22: Participação das células da glia da região da lâmina terminal na modulação tônica da atividade rítmica respiratória (F_R) por efeito estimulatório das vias neuronais envolvidas na respiração, cujo efeito não é observado na presença da ANG II no VL..	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Concentração de Vasopressina e Ocitocina plasmáticas induzidas pelas microinjeções de salina estéril 0,9%, ANG II, FCt e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL.....47

Tabela 2: Ingestão cumulativa de água concomitante à ingestão cumulativa de sódio (1,5%) induzidas pela microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II antes e após a prévia microinjeção de FCt no VL 52

Tabela 3: Valores da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais à microinjeção de ANG II, Salina estéril 0,9% ou FCt no VL e Variação da Pressão arterial média (Δ PAM), e Frequência Cardíaca (Δ FC) à microinjeção de ANG II antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após a microinjeção de Salina estéril 0,9% ou FCt no VL.....59

Tabela 4: Frequência Respiratória (F_R), Volume Corrente (V_C) e Ventilação/minut. (V_M) à microinjeção de ANG II antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após a microinjeção de Salina estéril 0,9% ou FCt no VL.....62

SUMÁRIO

RESUMO	xv
ABSTRACT	xvi
1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Homeostase Hidroeletrolítica e o Sistema Renina-Angiotensina.....	19
1.2. ANG II e o controle neuroendócrino do balanço hidroeletrolítico	21
1.3. ANG II e o controle da ingestão de água e sódio.....	24
1.4. Células da glia, ANG II e a modulação da pressão arterial	25
1.5. Células da glia, ANG II e a modulação da atividade respiratória.....	27
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo Geral.....	32
2.2. Objetivos Específicos.....	32
3. METODOLOGIA	33
3.1. Animais.....	33
3.2. Implante de cânula-guia em direção ao ventrículo lateral	33
3.3. Microinjeção de drogas no ventrículo lateral	34
3.4. Coleta de sangue.....	34
3.5. Radioimunoensaio (RIE)	35
3.6. Canulação da artéria femoral	36
3.7. Registros cardio-respiratórios	36
3.8. Análise da Frequência respiratória (F_R)	37
3.9. Análise do volume corrente (V_C) e da ventilação minuto (V_M)	37
3.10. Eutanásia.....	38
3.11. Soluções e Drogas utilizadas	38
3.12. Histologia.....	39
3.13. Análise estatística	39
3.14. Fonte Orçamentária	39
4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	40
4.1. Efeito da microinjeção de ANG II (25 ng/0.5 μ l), FCt (21 μ g/0.5 μ l) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre a concentração plasmática de AVP e OT.....	40
4.2. Efeito da microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 μ l), FCt (41 μ g/0.5 μ l) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre a ingestão de água e sódio (1,5%).	41

4.3. Efeito da microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre os parâmetros cardio-respiratórios basais.....	42
5. RESULTADOS	43
5.1. Corte Histológico	43
5.2. Efeito da microinjeção de ANG II (25 ng/0.5 µl), FCt (21 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre as respostas neuroendócrinas de liberação Vasopressina (AVP) e Ocitocina (OT) plasmáticas.	44
5.3. Efeito da microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre as respostas comportamentais de ingestão de água e sódio (1,5%).....	47
5.4. Efeito da microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre as respostas cardio-respiratórias. .	52
6. DISCUSSÃO	63
6.1. Papel da glia astrocítica da lâmina terminal nas respostas neuroendócrinas observadas após a microinjeção de ANG II no VL de ratos não anestesiados	63
6.2. Papel dos astrócitos hipotalâmicos nas respostas comportamentais observadas após a microinjeção de ANG II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados	66
6.3. Papel dos astrócitos hipotalâmicos nas respostas cardio-respiratórias observadas após a microinjeção de ANG II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados	68
7. CONCLUSÕES	73
8. REFERÊNCIAS	74

RESUMO

A Angiotensina II (ANG II) intracerebroventricular (icv) induz respostas neuroendócrinas, comportamentais e cardiovasculares. Sabendo que receptores AT^1 e AT^2 para ANG II estão localizados em neurônios e células da glia da lâmina terminal (LT), nossa hipótese é que as respostas neuroendócrinas, comportamentais e cardio-respiratórias induzidas pela ANG II central são mediadas, em parte, pela glia da lâmina terminal. O objetivo do presente estudo foi avaliar a participação da glia da lâmina terminal na liberação de Vasopressina (AVP) e Ocitocina (OT) plasmáticas, ingestão de água e sódio (1,5 %) e nas respostas cardio-respiratórias induzidas pela microinjeção de ANG II no ventrículo lateral (VL) de ratos não anestesiados. Utilizamos ratos Wistar [(260-280g) Ceua/Cbiotec nº133/2015]. Realizamos microinjeções de ANG II diluída em solução fisiológica estéril (salina 0,9%) com concentração final de 25 e 50 ng/0.5 μ l e Fluorocitrato [(FCt) um inibidor da atividade da glia] diluído com concentração final de 21 ou 41 μ g/0.5 μ l, ou de salina estéril 0,9% (500 nL) no VL de ratos não anestesiados. O plasma foi coletado para análise da concentração AVP e OT plasmáticas, pela técnica de radioimunoensaio. A análise da ingestão de água e sódio (1,5%) foi feita após a adaptação dos animais à gaiola metabólica. Em outro grupo de animais, a artéria femoral foi cateterizada para os registros da pressão arterial (PA, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) basais. Para o registro da frequência respiratória (cpm) os animais foram colocados em uma câmara pletismográfica. Os resultados mostraram que a ANG II no VL promoveu aumento na concentração de AVP [$2,3 \pm 0,4$ vs. $1,3 \pm 0,1$ pg/ml, $p=0,039$ ($n=6$)] e OT plasmáticas [$3,9 \pm 0,8$ vs. $1,4 \pm 0,2$ pg/ml, $p=0,025$ ($n=6$)] comparada ao controle salina 0,9%. O FCt microinjetado no VL promoveu aumento na liberação de OT plasmática ($2,6 \pm 0,4$ vs. $1,4 \pm 0,2$ pg/ml, $p=0,024$ ($n=6$)), mas não alterou a concentração plasmática de AVP ($0,99 \pm 0,1$ vs. $1,3 \pm 0,1$ pg/ml, $p=0,78$ ($n=6$)). A prévia microinjeção de FCt atenuou a resposta à ANG II de aumento na concentração de AVP ($1,3 \pm 0,2$ vs $2,3 \pm 0,4$ pg/ml, $p=0,05$ ($n=6$)), mas não de OT plasmática ($2,9 \pm 0,4$ vs. $3,9 \pm 0,8$ pg/ml, $p=0,31$ ($n=5-6$)). A ANG II no VL promoveu aumento na ingestão cumulativa de água ($5,3 \pm 1,6$ vs. $1,2 \pm 0,4$ ml/4 h, $p=0,02$ ($n=4-6$)] e de sódio (1,5 %) [$16 \pm 1,1$ vs. $2,5 \pm 0,7$ ml/4 h, $p=0,0001$ ($n=5-6$)]. O FCt não promoveu alterações na ingestão cumulativa de água [$1,3 \pm 0,3$ vs. $1,2 \pm 0,4$ ml/4 h, $p=0,79$ ($n=5-6$)], mas reduziu a ingestão cumulativa de sódio (1,5%)[$0,83 \pm 0,3$ vs. $2,5 \pm$

0,7 ml/4 h, $p=0,04$ (n=6)]. A prévia microinjeção de FCt inibiu a resposta de ingestão de sódio (1,5%) [$2,7 \pm 0,3$ vs. $16 \pm 1,1$ ml/4 h, $p=0,0001$ (n=5-7)], mas não alterou a ingestão de água induzida pela ANG II no VL [$8 \pm 2,4$ vs. $5,3 \pm 1,6$ ml/4 h, $p=0,44$ (n=4-7)]. A ANG II no VL promoveu aumento na PAM basal dos ratos [$137,8 \pm 4,9$ vs. $115,1 \pm 3,5$ mmHg, $p=0,002$ (n=7)]. A resposta pressora promovida pela ANG II foi significativamente reduzida pela prévia microinjeção do FCt no VL após 5 minutos [$\Delta 12,6 \pm 2,1$ vs. $\Delta 22,6 \pm 1,9$ mmHg, $p=0,004$ (n=7)]. Não foram observadas alterações promovidas pela ANG II [$311,7 \pm 37,9$ vs. $352,4 \pm 15$ bpm, $p=0,10$ (n=7)] ou FCt [$310,4 \pm 16,7$ vs. $341,3 \pm 14$ bpm, $p=0,18$ (n=7)] na FC basal (bpm) dos animais. A microinjeção de ANG II não promoveu alterações significativas na frequência respiratória basal { F_R [$109,6 \pm 5,9$ vs. $105,9 \pm 4,6$ cpm, $p=0,63$ (n=6)]}, no volume corrente { V_C [$8,6 \pm 0,7$ vs. $7,8 \pm 0,7$ mL.Kg⁻¹, $p=0,43$ (n=6)]} ou no volume/min. { V_M [$950,7 \pm 98,2$ vs. $873,5 \pm 86,7$ mL.Kg⁻¹.min⁻¹, $p=0,57$ (n=6)]}. A microinjeção de FCt promoveu diminuição significativa na frequência respiratória basal { F_R [$77,7 \pm 3,8$ vs. $105,9 \pm 4,6$ cpm, $p=0,002$ (n=6)]}, sem alterações significativas no V_C [$9,7 \pm 0,6$ vs. $7,8 \pm 0,7$ mL.Kg⁻¹, $p=0,66$ (n=6)] e no V_M basais [$827,2 \pm 57,3$ vs. $873,5 \pm 86,7$ mL.Kg⁻¹.min⁻¹, $p=0,66$ (n=6)].

Nossos resultados sugerem que as células da glia hipotalâmicas: a) participam da modulação tônica da liberação de OT plasmática e da ingestão de sódio; b) modulam a resposta angiotensinérgica central para a liberação de vasopressina plasmática, indução da ingestão de sódio e de resposta pressora. c) além disso, participam da modulação da frequência respiratória basal em ratos não anestesiados.

Palavras-chave: Astrócitos, Vasopressina, Ocitocina, Sede, Ingestão de sódio, Resposta Pressora, Frequência Respiratória.

ABSTRACT

The central Ang II (ANG II) induces neuroendocrine, behavioral and cardiovascular responses. Knowing that AT¹ and AT² receptors for ANG II are located in neurons and glial cells in the lamina terminalis (LT), our hypothesis is that neuroendocrine, behavioral and cardiorespiratory responses induced by central ANG II are mediated by glia of lamina terminalis. Our aim was to evaluate the participation of the glia of lamina terminalis in the release of plasma vasopressin (AVP) and oxytocin (OT), water and sodium (1.5%) intake and cardiorespiratory responses induced by ANG II into lateral ventricle (LV). We used Wistar rats [(260-280g) Ceua/Cbiotec 133/2015]. We perform microinjections of ANG II diluted in sterile saline solution (0.9% saline) with final concentration of 25 ou 50 ng/0.5 µl and of Fluorocitrate [(FCt) inhibitor of glial activity] with final concentration of 21 ou 41 µg/0.5 µl or sterile saline 0.9% (500nl) into VL of the unanesthetized rats. Plasma was collected for analysis of AVP and OT concentration by radioimmunoassay. The analysis of the water and sodium (1.5%) intake were done after adaptation of animals to the metabolic cage. In another group of animals, the femoral artery was catheterized for the records of baseline blood pressure (BP, mmHg) and heart rate (HR, bpm). For the record the respiratory rate (cpm) the animals were placed in a plethysmographic chamber. The results showed that ANG II into VL promoted an increase in the AVP [2.3 ± 0.4 vs. 1.3 ± 0.1 pg/ml, $p=0.039$ (n=6)] and OT [3.9 ± 0.8 vs. 1.4 ± 0.2 pg/ml, $p=0.025$ (n=6)] compared to the control saline (0.9%). FCt into VL increased plasma OT (2.6 ± 0.4 vs. 1.4 ± 0.2 pg/ml, $p=0.024$ (n=6)), but did not change the plasma AVP (0.99 ± 0.1 vs. 1.3 ± 0.1 pg/ml, $p=0.78$ (n=6)). Prior microinjection of FCt attenuated ANG II-induced AVP (1.3 ± 0.2 vs 2.3 ± 0.4 pg/ml, $p=0.05$ (n=6)), but no OT (2.9 ± 0.4 vs. 3.9 ± 0.8 pg/ml, $p=0.31$ (n=5-6).] The plasma release ANG II increased the cumulative water (5.3 ± 1.6 vs. 1.2 ± 0.4 ml/4 h, $p=0.02$ (n=4-6)] and sodium (1.5 %) intake [16 ± 1.1 vs. 2.5 ± 0.7 ml/4 h, $p=0.0001$ (n=5-6)]. The FCt did not change the cumulative water [1.3 ± 0.3 vs. 1.2 ± 0.4 ml/4 h, $p=0.79$ (n=5-6)], but decreased sodium (1.5 %) intake [0.83 ± 0.3 vs. 2.5 ± 0.7 ml/4 h, $p=0.04$ (n=6)]. Prior microinjection of FCt decrease the sodium intake [2.7 ± 0.3 vs. 16 ± 1.1 ml/4 h, $p=0.0001$ (n=5-7)], but did not change the water intake induced by ANG II [8 ± 2.4 vs. 5.3 ± 1.6 ml/4 h, $p=0.44$ (n=4-7)]. ANG II into VL promoted increase in baseline MAP [137.8 ± 4.9 vs. 115.1 ± 3.5 mmHg, $p=0.002$ (n=7)]. The pressor response promoted by ANG II was significantly reduced after 5 minutes by prior microinjection of FCt [$\Delta 12.6 \pm$

2.1 vs. $\Delta 22.6 \pm 1.9$ mmHg, $p=0.004$ (n=7)]. Did not change by ANG II [311.7 ± 37.9 vs. 352.4 ± 15 bpm, $p=0.10$ (n=7)] or FCt [310.4 ± 16.7 vs. 341.3 ± 14 bpm, $p=0.18$ (n=7)] in HR (bpm) baseline. The ANG II did not change in respiratory rate (F_R) [109.6 ± 5.9 vs. 105.9 ± 4.6 cpm, $p=0.63$ (n=6)], tidal volume (V_C) [8.6 ± 0.7 vs. 7.8 ± 0.7 mL.Kg⁻¹, $p=0.43$ (n=6)] or expiratory volume in the first minute (V_M) [950.7 ± 98.2 vs. 873.5 ± 86.7 mL.Kg⁻¹.min⁻¹, $p=0.57$ (n=6)]. The microinjection of FCt promoted significant decrease in basal F_R [77.7 ± 3.8 vs. 105.9 ± 4.6 cpm, $p=0.002$ (n=6)], but did not change in V_C [9.7 ± 0.6 vs. 7.8 ± 0.7 mL.Kg⁻¹, $p=0.66$ (n=6)] and V_M [827.2 ± 57.3 vs. 873.5 ± 86.7 mL.Kg⁻¹.min⁻¹, $p=0.66$ (n=6)].

Our results suggest that the hypothalamic glial cells: 1) participate of plasma OT release and sodium intake; 2) modulate ANG II-induced AVP plasma release, sodium intake and pressor response; 3) furthermore, modulate the basal respiratory rate in unanesthetized rats.

Keywords: astrocytes, Vasopressin, Oxytocin, Thirst, Sodium intake, pressor response, respiratory rate.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Homeostase Hidroeletrólítica e o Sistema Renina-Angiotensina

A capacidade de manter o estado de equilíbrio das variáveis físico-químicas essenciais para a vida sempre foi um desafio na evolução dos seres vivos, de forma que o conceito da “homeostasia do meio interno” definido por Claude Bernard em 1878 introduziu a idéia da existência de mecanismos integrados que mantêm a homeostase hidroeletrólítica dos fluidos corporais, tais como os mecanismos neurais, hormonais cardiovasculares e renais. Nesse sentido, o sistema renina-angiotensina (SRA) periférico e central são importantes mecanismos na modulação da pressão arterial e do balanço hidroeletrólítico (Ferguson e Renaud 1986; Davisson 2003; Hunyady e Catt 2006; Reis e cols., 2010). A ativação do SRA periférico é induzida pela ativação das células justaglomerulares da arteríola aferente, as quais em situações de hiposmolalidade, hipovolemia e hipotensão liberam renina (Finke e cols., 1883; Wideman Jr. e cols., 1993; Harrison-Bernard 2009). A renina plasmática retira 10 fragmentos de aminoácidos (AA) do Angiotensinogênio, uma globulina circulante produzida no fígado, formando a Angiotensina I [(ANG I) Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-His-Leu]. A ANG I circulante é degradada em seus dois AA terminais e convertida em Angiotensina II [(ANG II) Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe] pela Enzima Conversora de Ang I (ECA1) presente em grande quantidade no endotélio do leito pulmonar (Deschepper 1994; Paul e cols., 2006). A estrutura molecular da ANG II não permite que esta atravesse a barreira hematoencefálica em condições fisiológicas (Füchtbauer e cols., 2011; Biancardi e cols., 2014), mas existem regiões diencefálicas desprovidas desta barreira, tais como os Órgãos Circumventriculares (OCV's): Núcleo Pré-óptico Mediano (MnPO) e Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT) que juntos ao Órgão Subfornical (SFO) compõem a região da Lâmina Terminal (LT)(Gross e cols., 1987; Ganong 2000) (Figura 1).

A região da LT apresenta microvasculatura com inúmeras fenestrações endoteliais que permitem contato direto com os componentes do fluido periférico que ascendem ao sistema nervoso central [SNC (Gross e cols., 1987)] e está localizada na parede anterior do 3ª ventrículo entre a superfície ventral do Fórnix e o quiasma óptico, estabelecendo comunicação direta com os ventrículos laterais de tal forma que os componentes que fluem em seu interior alcançam estas regiões diencefálicas e hipotalâmicas (Atlas Paxinos e Watson 1986). Além disso, os neurônios da região da LT estão envolvidos em importantes circuitarias de controle do balanço hidroeletrólítico e da função

cardiovascular (Fitts e cols., 1990; Vivas e Chiaraviglio 1992; Bains e cols., 1992; Tanaka e cols., 1998; Saad e cols., 2004; Reis e cols., 2010).

Há uma intensa densidade de receptores angiotensinérgicos (AT^1 e AT^2) em neurônios e astrócitos localizados no SFO e OVLT (Lenkei e cols., 1997; Gebke e cols., 1998). Estudos de Wei e cols., (2009) discutem que a ativação dessas regiões diencefálicas e hipotalâmicas pela ANG II periférica aumenta a expressão de receptores AT^1 em diversos núcleos hipotalâmicos por meio da formação de espécies reativas e oxigênio e fosforilação das proteínas p44/42 MAPK e JNK, aumentando a sensibilidade a ANG II plasmática. Estudos *in vitro* com cultura primária de astrócitos e neurônios isolados do SFO e OVLT, mostraram que a ANG II induz ondas de cálcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$ tanto nos neurônios quanto nos astrócitos, indicando haver participação astrocítica nos processos decorrentes à ativação angiotensinérgica na região da LT (Li e Ferguson 1993; Gebke e cols., 1998).

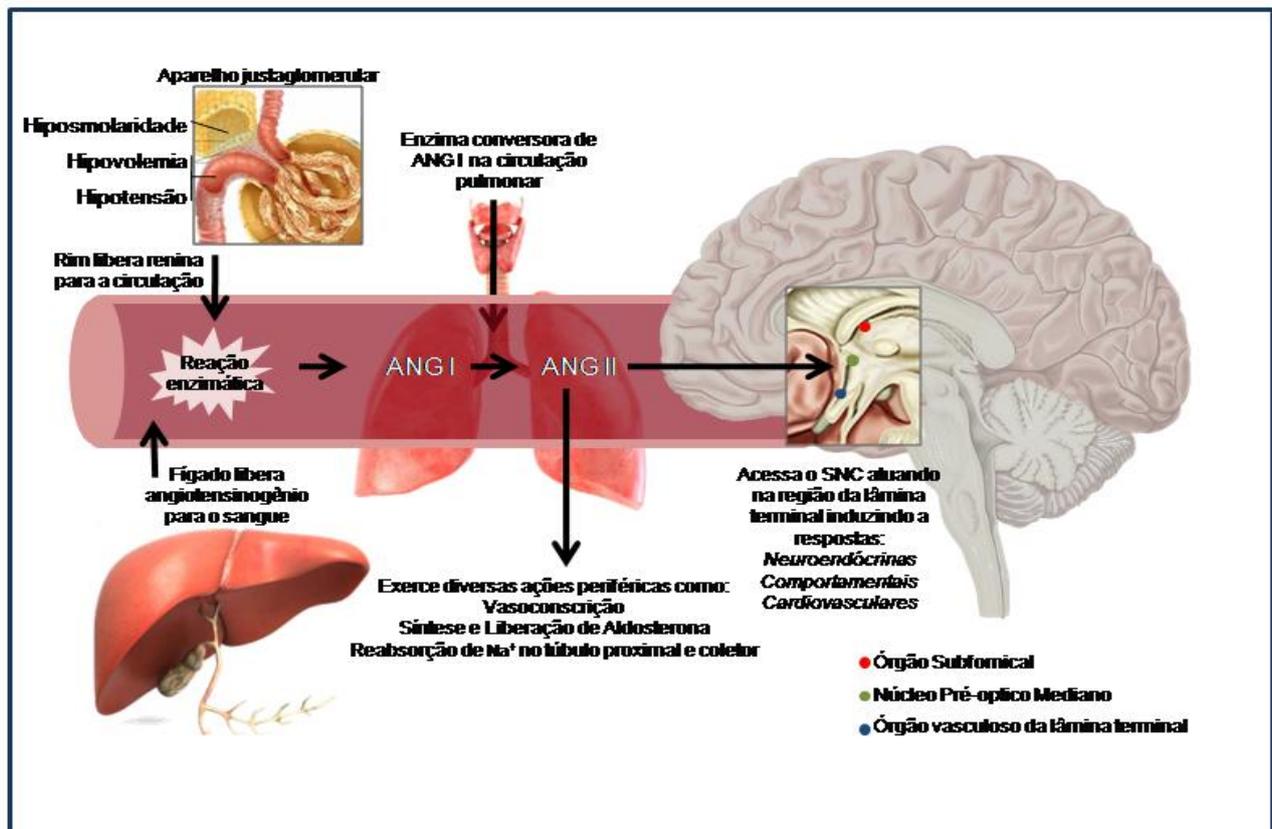


Figura 1: Ativação do sistema renina-angiotensina periférico gerando respostas neuroendócrinas, comportamentais e cardiovasculares promovidas pela ANG II na região da lâmina terminal.

Além disso, diferentes células dessa região da lâmina terminal respondem a estímulos hiperosmóticos sendo capazes de integrar respostas comportamentais e neuroendócrinas em diversas espécies (Andersson e McCann 1955a, b; Iadecola 2007; Shimizu e cols., 2007). A ANG II atuando na LT ativa uma subpopulação de neurônios

angiotensinérgicos que são sensíveis aos níveis de Na^+ no plasma (Oldfield e McKinley 1995; Johnson e Thunhorst 1997), indicando que a ANG II exerce um papel na modulação das vias compensatórias à osmolaridade. A privação hídrica é um exemplo claro de que, mesmo em condição hiperosmótica há ativação do SRA uma vez que o sistema também se encontra em hipovolemia. Barney e cols., (1983) observaram aumento da osmolaridade e concentração de Na^+ plasmático em ratos submetidos a 12-48h de privação hídrica com aumento da atividade da renina plasmática a partir de 24h de privação. Indicando que quando o organismo é desafiado a equilibrar os níveis hipovolêmicos aos hiperosmóticos (contração hiperosmótica), a angiotensina II frequentemente participa das respostas que restauram esse equilíbrio.

Além disso, estudos recentes destacam o papel das células da glia, na modulação da osmolaridade plasmática (Hiyama e Noda 2016). Células da glia e células ependimáticas do SFO e dos CVO's expressam canais de Na^+ atípicos [(Na_x) Watanabe e cols., 2000; Iadecola 2007; Shimizu e cols., 2007; Hiyama e Noda 2016] cuja deleção em camundongos resultou em desregulação da homeostase do Na^+ (Watanabe e cols., 2000). Diversos autores sugerem que estes canais Na_x , considerados sensores para Na^+ , podem estimular a liberação de lactato pelas células da glia da lâmina terminal, que ativa neurônios gabaérgicos locais, e estes inibem os neurônios que se projetam às áreas comportamentais, resultando em inibição da ingestão de sódio e natriurese (Shimizu e cols., 2007; Iadecola 2007; Hiyama e Noda 2016). Em estudos com camundongos *knockout* para o receptor da ANG II (AT^1), foi observado atenuação da liberação de AVP plasmática em resposta à hiperosmolaridade, indicando que a ANG II aumenta a sensibilidade dos osmosensores do hipotálamo (Morris e cols., 1999). Estes estudos em conjunto, demonstram que diferentes células da lâmina terminal atuam na modulação das respostas comportamentais e neuroendócrinas frente à alteração da osmolaridade e que a ANG II está envolvida na ativação de mecanismos osmosensoriais centrais.

1.2. ANG II e o controle neuroendócrino do balanço hidroeletrólítico

A Ang II plasmática atua em seus receptores específicos (subtipo AT^1) localizados na região da lâmina terminal ativando projeções angiotensinérgicas aos neurônios do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e do núcleo supra-óptico (Lind e cols., 1985; Wilkin e cols., 1989; Oldfield e cols., 1991), os quais possuem neurônios magnocelulares vasopressinérgicos (AVPérgicos) e Ocitocinérgicos (OTérgicos) com projeções à

neurohipófise. O PVN possui populações distintas de neurônios com propriedades neuroquímicas e eletrofisiológicas diferentes (Swanson e cols., 1980; Stern 2001).

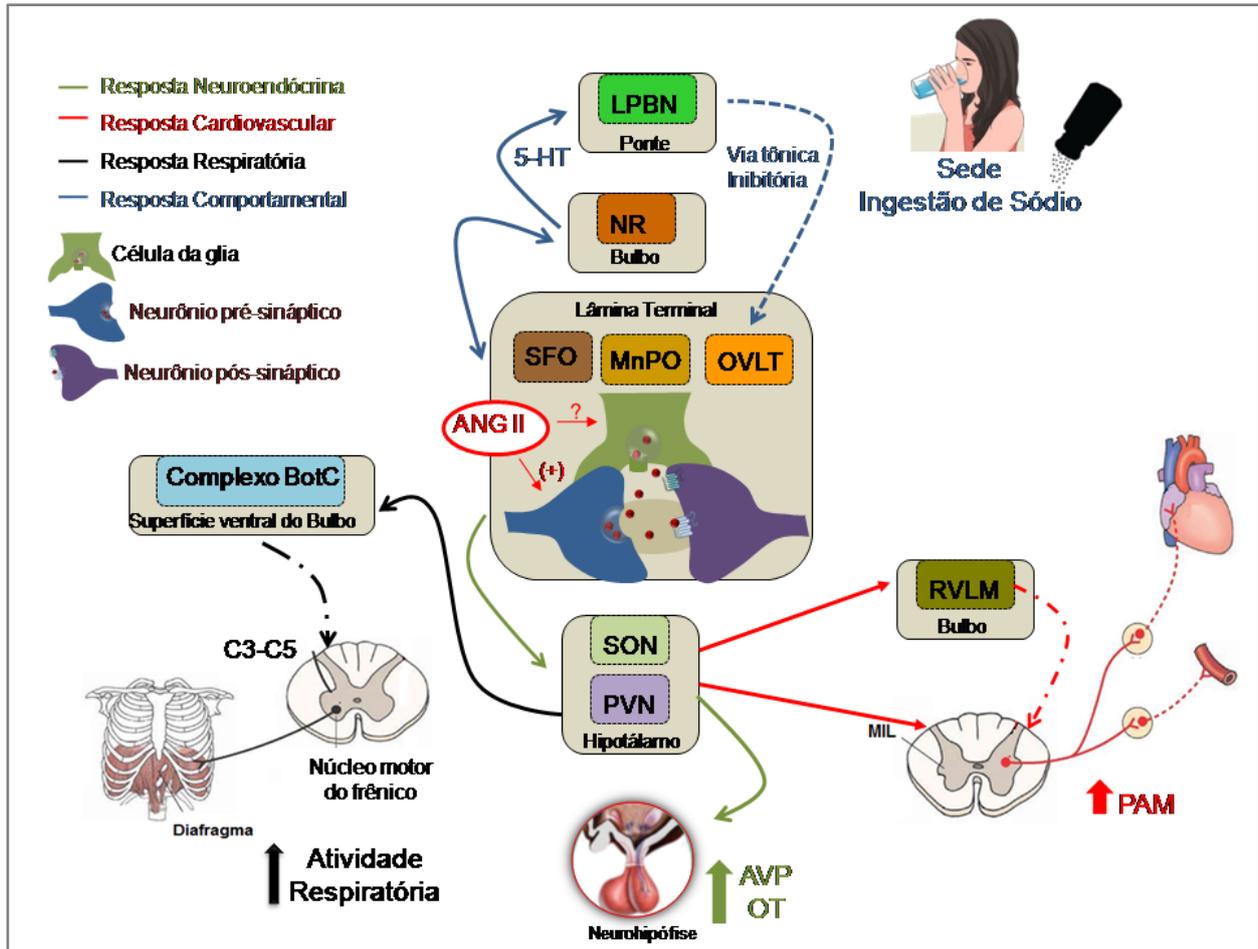


Figura 2: Vias neurais envolvidas nas respostas neuroendócrinas, comportamentais, cardiovasculares e respiratórias promovidas pela ANG II na região da lâmina terminal. SFO: Órgão Subfornical, OVLT: Órgão Vasculoso da lâmina terminal, MnPO: Núcleo pré-óptico mediano, PVN: Núcleo Paraventricular, SON: Núcleo Supra-óptico, RVLM: Bulbo ventrolateral rostral, AVP: Vasopressina, OT: Ocitocina, NR: Núcleo Rafe, CeA: Núcleo central da amígdala, LPBN: Núcleo parabraquial lateral, NMF: Núcleo motor do frênico, MIL: Medula Intermédio Lateral, PAM: Pressão arterial média, ANG II: Angiotensina II. Adaptado de Schlenker e cols., 2001 e Tiruneh e cols., 2013

Além do subnúcleo magnocelular, há subnúcleos com neurônios parvocelulares pré-autônômicos, os quais projetam-se à coluna ou medula intermédio-lateral [(MIL) Saper e cols., 1976; Stern 2015] ou a núcleos bulbares envolvidos com a modulação cardio-respiratória tais como o núcleo do trato solitário [(NTS) McKellar e Loewy 1981] e a região ventral do bulbo [RVLM (Poulain e Wakerley 1982; Armstrong e cols., 1994; Ludwig e Stern 2015) Figura 2].

Diferentes estudos mostraram que a microinjeção de ANG II intracerebroventricular (icv), na região do ventrículo lateral (VL), promove resposta neuroendócrina de liberação de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) plasmáticas (Davisson 2003; Hunyady e Catt 2006; Reis e cols., 2008 e 2010). Ao revisar os fundamentos da dinâmica que envolve a neurosecreção de AVP e OT, estudos de Leng e cols., (2009) descrevem que neurônios vasopressinérgicos não são capazes de promover liberação pulsátil de AVP plasmática, ao invés disso, exibem atividade elétrica em fases dependente de suas propriedades intrínsecas de membrana que podem ser influenciadas por fatores externos, como alterações na osmolalidade plasmática, volume sanguíneo e pressão de perfusão arterial (Antunes-Rodrigues e cols., 2005). Os neurônios OTérgicos, por outro lado, possuem propriedades de membrana que favorecem a produção de disparos contínuos tônicos, os quais não dependem de influências extrínsecas, cuja atividade pode ser modulada durante a lactação e pelo estímulo da privação hídrica (Stern e Armstrong 1996; Di e Tasker 2004). Em suma, estudos demonstram que neurônios AVPérgicos e OTérgicos possuem mecanismos intrínsecos distintos.

Recentemente nós observamos que a ANG II promove uma redução significativa na recaptção de glutamato em cultura de astrócitos do hipotálamo, o que poderia contribuir para aumento na biodisponibilidade de glutamato no ambiente extracelular (Cruz e cols., 2013; Ruginsk e cols., 2015), promovendo assim, aumento da despolarização do neurônio pós-sináptico resultando na liberação de AVP e OT. Estes estudos reúnem indícios de que os astrócitos hipotalâmicos participam das respostas neuroendócrinas induzidas pela ANG II de liberação de AVP e OT. Estes hormônios apesar de apresentarem efeitos fisiológicos distintos, promovem juntos, finos ajustes no volume e osmolalidade.

Esses efeitos fisiológicos foram mostrados em diversos estudos *in vivo* e em *in vitro* que demonstraram que a infusão periférica de AVP aumenta a expressão, translocação e inserção de canais aquaporina 2 na membrana apical do ducto coletor de ratos resultando em aumento da reabsorção de água e consequentemente da volemia (DiGiovanni e cols., 1994; Yamamoto e cols., 1995). Outros estudos com fotometria de chama mostraram que a OT intravenosa aumenta a excreção de Na^+ , K^+ e GMP_C em ratos (Soares e cols., 1999). Os autores sugerem que o GMP_C medeia o fechamento dos canais de Na^+ na mácula densa e nos túbulos proximais resultando em diminuição da reabsorção de Na^+ e consequentemente aumento da osmolaridade urinária. Estes trabalhos indicam que a AVP e a OT plasmáticas tem, entre outras funções, importante

papel fisiológico na regulação do balanço hidroeletrólítico promovendo antidiurese e natriurese, repectivamente.

1.3. ANG II e o controle da ingestão de água e sódio

Aparentemente, diversos sistemas trabalham sinergicamente para condicionar o comportamento de ingestão de líquidos e são modulados principalmente pela condição de volume e osmolaridade plasmática.

Como já descrito, a ANG II é formada em situações hiposmóticas, hipovolêmicas e de hipotensão, atua como molécula sinalizadora para o SNC induzindo à ativação de respostas compensatórias. Diversos estudos comportamentais sugerem que lesões na região da lâmina terminal (SFO, OVLT e MnPO) promovem redução das respostas de sede e ingestão de sódio induzidas pela ANG II plasmática, demonstrando que os circuitos neurais das respostas comportamentais induzidas pela ANG II são modulados pelos neurônios da lâmina terminal (Fitts e cols., 1990; Vivas e Chiaraviglio 1992; Tanaka e cols., 1998), especialmente o SFO e o OVLT, os quais enviam projeções angiotensinérgicas ao Núcleo da Rafe (NR) (Tanaka e cols., 1998). Estudos de Lind (1986) observaram, por meio do uso de traçadores e imunofluorescência, projeções dos neurônios angiotensinérgicos do SFO para o NR mediano, bem como observaram projeções de neurônios serotoninérgicos do NR mediano para o SFO. Em adição, estudos funcionais de Olivares e cols., (2003) mostraram que a lesão eletrolítica do NR dorsal (região com grande concentração de neurônios serotoninérgicos) induz ingestão de sódio, sugerindo que projeções serotoninérgicas do NR estão envolvidas em mecanismos inibitórios da ingestão de sódio. Outros estudos têm mostrado a participação do núcleo parabraquial lateral (NPBL) nas vias neurais de modulação da ingestão de água e sódio. Estudos de Menani e Johnson (1995) mostraram que a microinjeção de methilsergine (inibidor dos receptores serotoninérgicos 5-HT^{1/2}) no NPBL promove aumento na resposta de ingestão de água observada após a ANG II icv. Adicionalmente, Colombari e cols., (1996) demonstraram que o pré-tratamento com methilsergine no NPBL aumenta a ingestão de sódio induzido pela ANG II no SFO, sendo esse efeito bloqueado com o pré-tratamento do losartan (antagonista do receptor AT¹) no SFO. Esses estudos sugerem que os mecanismos serotoninérgicos do NR e/ou SFO ao LPBL estão envolvidos na circuitaria da modulação inibitória da ingestão de água e sódio induzida pela ANG II, atuando em receptores AT¹ na LT. Tanto a regulação serotoninérgica tônica inibitória do NR, quanto à modulação inibitória serotoninérgica na LT parecem ser importantes mecanismos de ajustes dos efeitos comportamentais de

ingestão de água e sódio induzidos pela ANG II periférica (Lind 1986; Menani e Johnson 1995; Tanaka e cols., 1998; Olivares e cols., 2003).

Ademais, as projeções oriundas dos OCV's também se conectam ao PVN e ao núcleo parabraquial lateral [(LPBN) Figura 2], estes dois núcleos se projetam ao bulbo no núcleo do trato solitário (NTS), o qual possui neurônios com projeções a estruturas límbicas, como o CeA, e estruturas corticais formando a complexa circuitaria neural da sede e da ingestão de sódio moduladas pela Ang II [(Reis e cols., 2008; Menani e cols., 2014) Figura 2].

Os clássicos experimentos do Prof Covian demonstraram que lesões bilaterais no hipotálamo anterior (PVN e SON), porção corticomédial da amígdala (MA_C), área septal e bulbo olfatório produziam aumento da ingestão de sódio, demonstrando que a porção MA_C exerce efeito inibitório, enquanto a porção basolateral (LA_B) exerce efeito facilitatório, uma vez que lesões nessa porção da amígdala diminuem a ingestão de sódio demonstrando que os núcleos da amígdala possuem neurônios que participam de ambos os circuitos comportamentais e interpretam diversos estímulos (internos e externos), predispondo o animal ao comportamento motivado de procura e ingestão de água e sódio (Covian e Antunes-Rodrigues 1963; Saad e cols., 1981; Schulkin 1991; Spector e cols., 1992; Johnson e Thunshorst 1997; Mckinley e cols., 2001, Albrecht e cols., 2003; Hu e cols. 2015). Esses neurônios da amígdala enviam projeções ao hipocampo que se comunica com o córtex motor e sensorial convergindo para o hipotálamo e iniciando a ingestão ao sódio (Covian e Antunes-Rodrigues 1963; Gentil e cols., 1968; Saad e cols., 1972; 1981). Adicionalmente, os estudos de Hu e cols., (2015) demonstram que neurônios do CeA expressam AT¹ e podem ser ativados por ANG II.

De acordo com Davisson (2000), a resposta comportamental de ingestão induzida pela Ang II icv é dependente da ativação do receptor AT^{1b}. Em adição, estudos de Kakar e cols., (1992) reportaram uma predominância desse subtipo de receptor AT^{1b} no SFO, OVLT e hipotálamo. Estudos imunohistoquímicos de cérebro inteiro, observaram que astrócitos apresentam uma expressão seletiva para o receptor AT^{1b} (Premer e cols., 2013). Estes estudos, em conjunto, levantam indícios de que os astrócitos poderiam estar envolvidos nas respostas comportamentais induzidas pela Ang II contribuindo, portanto, para a modulação do balanço hidroeletrólítico.

1.4. Células da glia, ANG II e a modulação da pressão arterial

O controle da pressão arterial (PA) é feito pela ativação de sistemas ou alças de retroalimentação que operam a curto e longo-prazo (os chamados fatores funcionais),

para manter as oscilações da PA em uma estreita faixa uniformemente variada em torno de 100 mmHg, a depender da espécie. Nesse sentido, finos ajustes na resistência periférica e no débito cardíaco influenciam diretamente a PA, sendo estes ajustes feitos principalmente pelo SNC, em uma região de neurônios pré-simpáticos com propriedade intrínseca autodespolarizante denominada Bulbo Ventrolateral Rostral [(RVLM) Guertzenstein e Silver 1974; Sun e cols., 1988; Dampney 1994; Accorsi-Mendonça e cols., 2016] que se projetam a coluna ou medula intermédia lateral (MIL) e liberam noradrenalina e glutamato promovendo aumento na atividade simpática e pressão arterial (Amendt e cols., 1979; Ross e cols., 1984; Sun e cols., 1988; Abbott e cols., 2009). Diversos estudos com injeção de vírus trans-sináptico em órgãos periféricos (tais como rins, adrenal e coração) ou gânglios da cadeia simpática observaram a marcação de neurônios do SFO e OVLT na lâmina terminal e de alguns outros núcleos prosencefálicos (Sly e cols., 1999; Westerhaus e Loewy 1999) sugerindo que os neurônios da LT estão envolvidos na modulação do *drive* simpático e da pressão arterial.

Como já mencionado, a ANG II plasmática é um dos mais importantes componentes humorais de modulação da pressão arterial, uma vez que promove vasoconstrição periférica, síntese e liberação de aldosterona e aumento da reabsorção de sódio nos túbulos renais, regulando assim, o volume do líquido extracelular e a pressão sanguínea (Harrison-Bernard 2009). O efeito pressor induzido pela ANG II periférica atuando na região da lâmina terminal, foi primeiramente descrito por estudos em cães com circulação cruzada de Bickerton e Buckley (1961) que observaram que a ANG II promovia aumento pressor tanto no animal doador (30 a 50%) quanto no animal que recebia o fluxo para a cabeça (12 a 40%), sendo esse efeito bloqueado pela administração de piperoxan (antagonista alfa-adrenérgico) na circulação periférica do animal receptor, indicando que a ANG II plasmática eleva a PA não apenas por ação direta na vasculatura periférica, mas também atuando em núcleos centrais envolvidos com a modulação da PA. Posteriormente, estudos de Yu e Dickinson (1965) mostraram que a infusão intravenosa (iv) de Ang II resulta em aumento progressivo da PA em coelhos não anestesiados. Não obstante, há diferentes estudos realizados em ratos não anestesiados, mostrando que a microinjeção de ANG II no VL induz não apenas respostas neuroendócrinas e comportamentais de ingestão de água e sódio, mas também induz significativa resposta pressora (Bains e cols., 1992; Saad e cols., 2004; Reis e cols., 2010; Braga e cols., 2011; Buttler e cols., 2016). As respostas cardiovasculares induzidas pela ANG II plasmática no SNC, envolve a ativação de neurônios angiotensinérgicos da lâmina terminal que projetam-se aos neurônios pré-

autônômicos parvocelulares do PVN e estes projetam-se à IML e/ou ao RVLM excitando neurônios vasomotores pré-simpáticos (Bains e Ferguson 1995; Cato e Toney 2005; Braga e cols., 2011; Tiruneh e cols., 2012; 2013), os quais também enviam projeções à MIL [(Amendt e cols., 1979; Ross e cols., 1984; Sun e cols., 1988; Abbott e cols., 2009) Figura 2].

Estudos de Morimoto e cols., (2002) observaram aumento da pressão arterial média em camundongos transgênicos, os quais superexpressaram o RNAm da Renina e do Angiotensinogênio em astrócitos da região do SFO, os autores ainda observaram que a microinjeção icv de Losartan, promove redução significativa na pressão arterial média dos camundongos transgênicos, sugerindo que a renina e o angiotensinogênio sintetizados em astrócitos da região da LT têm papel importante na regulação da pressão arterial.

Recentemente estudos de Marina e cols., (2013) demonstraram que a estimulação optogênica (manipulação de vectores virais para expressar canais sensíveis à luz como o canal rhodopsina 2) em astrócitos do RVLM aumentava a atividade simpática, a pressão arterial e a frequência cardíaca em ratos não anestesiados. Além disso, estudos com *path clamp* de Park e cols., (2009) mostraram que os astrócitos da região do PVN modulam os níveis extracelulares de GABA e as correntes inibitórias tônicas pelos transportadores GAT's (transportadores para GABA) contribuindo para manutenção do tônus basal simpático e modulação da atividade dos neurônios pré-simpáticos do RVLM. Estes estudos em conjunto levantam indícios de que as células da glia do hipotálamo, especialmente os astrócitos, podem ter participação na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelas ANG II central, como também podem contribuir para geração ou manutenção do *drive* simpático basal.

1.5. Células da glia, ANG II e a modulação da atividade respiratória

O desenvolvimento de técnicas com preparação *in vitro* de ratos neonatos decerebrados ao nível pré-bulbar demonstrou que neurônios abaixo dessa secção geram espontaneamente o ritmo respiratório (Smith e Feldman 1987). Adicionalmente, estudos de *path clamp* de Smith e cols., (1991) em *slices* coronais do bulbo de ratos neonatos demonstraram que a atividade respiratória é produzida por um grupo de neurônios com propriedades oscilatórias de marcapasso localizados na porção ventral do bulbo em um complexo denominado Pré-Botzinger (pre-BötC), os quais são sincrônicos aos movimentos inspiratórios, enquanto os neurônios do complexo

Botzinger (BotC) são sincrônicos aos movimentos expiratórios (Molkov e cols., 2014; Cui e cols., 2016). Estes núcleos estabelecem conexões recíprocas excitatórias e inibitórias que resultam em padrão respiratório rítmico (Feldman e McCrimmon 2008; Abdala e cols., 2009a, b) que é tonicamente modulado por outros núcleos bulbares tais como, o Núcleo Retrotrapezóide (RTN) e o NTS, além de núcleos pontinos [Núcleo Parabraqueal (NPB), Área A5, Kölliker-Fuse (KF)] e áreas supra bulbares como o PVN que estão envolvidas direta ou indiretamente na modulação/coordenação da respiração (Yeh e cols., 1997; Abdala e cols., 2009b; Bonis e cols., 2013; Molkov e cols., 2014).

Não obstante, diversos estudos sugerem que o hipotálamo é uma importante área supra bulbar envolvida no controle da atividade respiratória (Ferguson e cols., 1989, Yeh e cols., 1997; Schlenker e cols., 2001). As primeiras evidências foram descritas por Yeh e cols., (1997) os quais mostraram que neurônios do PVN enviam projeções ao núcleo motor do frênico (C3-C5). Funcionalmente os autores mostraram em estudos realizados em ratos anestesiados, vagotomizados e com ventilação mecânica, que a microinjeção de glutamato no PVN promove aumento na amplitude e na frequência de disparo das fibras musculares do diafragma. Em adição, estudos anatômicos mostraram que há subpopulações de neurônios AVPérgicos e OTérgicos do PVN com projeções ao núcleo motor do frênico (Mack e cols., 1985; Kc e cols., 2002). A microinjeção de AVP no núcleo Pré-Botzinger promove aumento na frequência de disparo do diafragma (Kc e cols., 2002). Outros estudos mostraram que a microinjeção de bicuculina (antagonista GABA_A) no PVN estimula a ventilação e a frequência respiratória de ratos não anestesiados (Schelenker e cols., 2001). Além disso, há evidências mostrando a participação da LT na modulação respiratória, a estimulação elétrica do SFO aumenta a atividade respiratória de ratos anestesiados (Ferguson e cols., 1989) sugerindo que a ativação do SFO pelos componentes periféricos, como a ANG II plasmática, poderia estar envolvida na modulação da respiração. Estudos em diferentes modelos animais como cães anestesiados e não anestesiados (Potter e McCloskey 1979; Alexander e Lumbers 1981; Ohtake e Jennings 1993) e em coelhos não anestesiados (Potter e McCloskey 1979) sugerem que a Ang II periférica estimula a ventilação. A ANG II periférica parece ser importante para modular as respostas ventilatórias reflexas as oscilações na pressão arterial média (Ohtake e Jennings 1993; Walker e Jennings 1998). Em ratos não anestesiados foi observado que a ANG II induz aumento na ventilação em situações de hipotensão (Walker e Jennings 1988).

Em adição, estudos de Olsson e cols., (2004) demonstraram que a microinjeção de Salazina no VL (um antagonista competitivo do receptor para ANG II) promove diminuição da frequência respiratória e do volume minuto em ratos não anestesiados.

Estudos de Costa e cols., (2013) mostraram que a microinjeção de fluorocitrato (FCt)(inibidor das células da glia) na região ventral do bulbo promove aumento significativo na frequência respiratória basal, mas não altera os parâmetros respiratórios e simpáticos basais em preparações tronco-cérebro isolados de ratos juvenis. Demonstrando que as células da glia dessas regiões do bulbo participam da modulação da atividade respiratória basal. Além disso, estudos de Gourine e cols., (2010) demonstraram que a estimulação optogênica em cultura primária de astrócitos e em slides da superfície ventral do bulbo (SVB) promove aumento de $[Ca^{2+}]_i$ e liberação de ATP. Em outro grupo de ratos, anestesiados, vagotomizados e ventilados artificialmente, a estimulação optogênica de astrócitos da SVB promove aumento da amplitude de disparo do nervo frênico *in vivo*. Estudos imunohistoquímicos de Hartel e cols., (2009) em camundongos neonatos mostraram que astrócitos da superfície ventral do bulbo respondem à presença dos neuromoduladores, tais como: Serotonina, Substância P e Hormônio liberador de tireotrofina, com aumento transiente de Ca^{2+} , sugerindo que estes neuromoduladores regulam a sinalização de Ca^{2+} em astrócitos para ajustar os processos de auto-regulação da função respiratória. Outros estudos mostraram que astrócitos do preBotC apresentaram aumento de Ca^{2+}_i em resposta a norepinefrina mesmo após o bloqueio da atividade neuronal por tetrodotoxina (TTX)(Schnell e cols., 2016). Estes estudos em conjunto sugerem que as células da glia, especialmente os astrócitos da região ventral do bulbo exercem importante papel na modulação da atividade respiratória basal.

Como anteriormente descrito, estudos sugerem que o SFO e o PVN, modulam a atividade respiratória (Mack e cols., 1985; Ferguson e cols., 1989; Yeh e cols., 1997; Schlenker e cols., 2001; Kc e cols., 2002) e possuem projeções aos núcleos do centro respiratório e a núcleos motores dos movimentos respiratórios (Mack e cols., 1985; Kc e cols., 2002). Nesse sentido, estudos comportamentais de Qin e cols., (2008) demonstraram que a exposição à humidade e/ou ao calor no interior de uma câmara controlada promovia, entre outras respostas, aumento da frequência respiratória. Adicionalmente, a análise imunohistoquímica do hipotálamo desses ratos demonstrou aumento de Fos em astrócitos do PVN e SON, indicando aumento da atividade astrocítica nesses núcleos hipotalâmicos. Os autores concluem que astrócitos e

neurônios do PVN e SON participam da regulação dessas respostas, incluindo a respiratória, frente a mudanças ambientais severas.

Considerando que a Ang II ativa neurônios e astrócitos da lâmina terminal hipotalâmica (Li e Ferguson 1993; Gebke e cols., 1998) a qual está envolvida em diversas repostas induzidas pela Ang II (Potter e McCloskey 1979; Lang e cols., 1981; Bains e cols., 1992; Qadri e cols., 1993; Davisson 2000, 2003; Saad e cols., 2004; Hunyady e Catt 2006; Reis e cols., 2008, 2010; Lancien e cols., 2010), a hipótese investigada no presente estudo é que as respostas neuroendócrinas, comportamentais, cardiovasculares e respiratórias observadas após a microinjeção de angiotensina II icv são moduladas por células da glia hipotalâmica da lâmina terminal (Figura 3).

Como abordagem experimental, realizamos microinjeção intracerebroventricular em direção ao ventrículo lateral, um método amplamente utilizado, conhecido por ativar os núcleos da região da lâmina terminal, especialmente pela ANG II (Bains e cols., 1992; McKinley e cols., 1995; Davisson 2000; Davisson 2003; Olsson e cols., 2004; Saad e cols., 2004; Hunyady e Catt 2006; Reis e cols., 2008 e 2010; Buttler e cols., 2016).

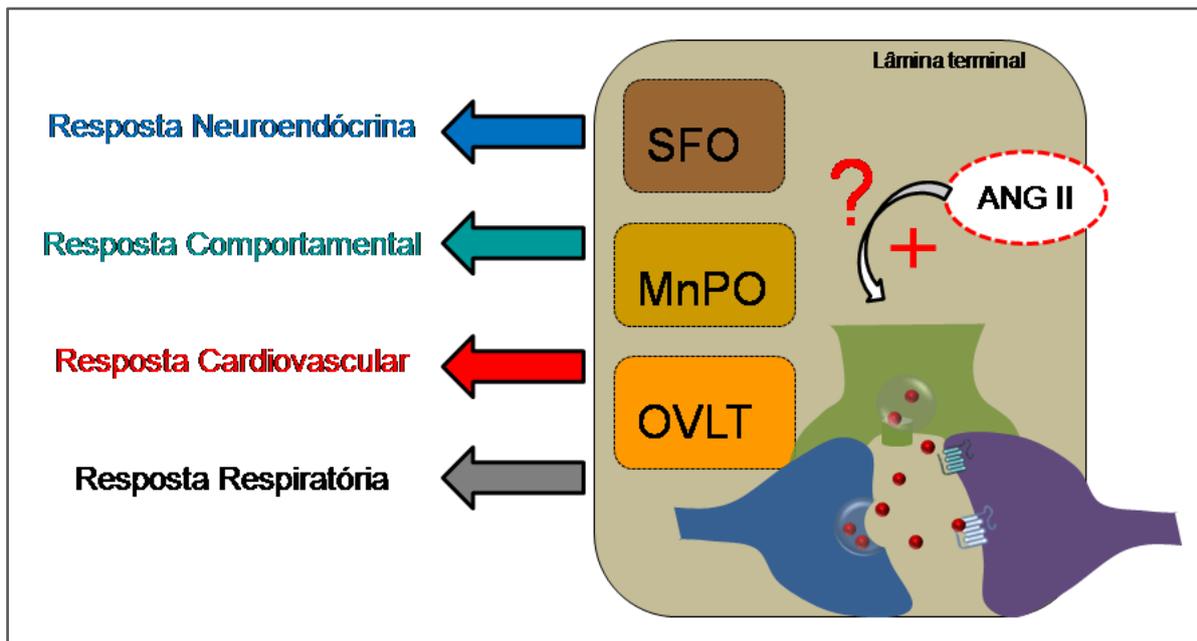


Figura 3: Representação esquemática da hipótese de trabalho deste projeto. O fluxograma representa, de forma simplificada, a participação da glia hipotalâmica na modulação das respostas neuroendócrina (liberação de AVP e OT), comportamental (ingestão de água e sódio), cardiovascular e respiratória induzidas pela ANG II na região da lâmina terminal. Órgão Subfornical (SFO), Núcleo pré-Óptico Mediano (MnPO) e Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal (OVLT) em cores de destaque. O item verde (Glia) representa a possível participação das células da glia hipotalâmica na modulação das respostas induzidas pela microinjeção icv de ANG II.

Para investigar esta hipótese, nós realizamos microinjeção intracerebroventricular utilizando um inibidor seletivo da atividade da glia, o Fluorocitrato, o qual foi microinjetado no VL de ratos não anestesiados. O Fluorocitrato é uma gliotoxina derivada das plantas do gênero *Dichapetalum* (Peters 1957; Paulsen e cols., 1987), conhecido por inibir seletivamente e de forma reversível a atividade metabólica da glia (Paulsen e cols., 1987; Paulsen e cols., 1988b). Isto se deve ao fato de que citrato e acetato exógeno não são metabolizados por neurônios, apenas por células da glia (Muir e cols., 1986; Paulsen e cols., 1987; Fonnum e cols., 1997). O Fluorocitrato bloqueia a Aconitase (Peters 1957), uma enzima que transforma Citrato em isocitrato no ciclo de Krebs, além disso, o acúmulo de citrato e Fluorocitrato inibe alostericamente a Fosfofrutoquinase-1, a enzima da glicólise que transforma frutose 6-fosfato em frutose 1,6-bisfosfato (Paulsen e cols., 1988b) resultando em alterações na estrutura das células da glia (Paulsen e cols., 1987), inibição da síntese e liberação de glutamina e dos gliotransmissores Glutamato e GABA (Szerb e cols., 1987; Paulsen e cols., 1988a; Paulsen 1988b; Paulsen e Fonnum 1989; Hassel e cols., 1992), reduzindo significativamente os níveis de ATP, comprometendo assim o metabolismo celular (Paulsen e cols., 1987). Dessa forma, o Fluorocitrato e o Fluoroacetato (um precursor do Fluorocitrato) tem sido utilizados em diversos estudos como ferramenta metodológica com o objetivo de interferir na interação neurônio-glia no tecido neural *in vivo* e *in vitro*, avaliando assim a importância dessa interação na circuitaria estudada (Hassel e cols., 1992; Hülsmann e cols., 2000; Costa e cols., 2012; Hayakawa e cols., 2016).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a participação da glia hipotalâmica nas respostas neuroendócrinas, comportamentais e cardio-respiratórias induzidas pela ANG II no VL de ratos não anestesiados.

2.2. Objetivos Específicos

Analisar a resposta à microinjeção icv de ANG II antes e após a inibição da glia hipotalâmica;

- na concentração plasmática de OT e AVP;
 - na ingestão de água e sódio (1.5%);
 - na modulação dos parâmetros cardiovasculares e respiratórios basais.
-

3. METODOLOGIA

3.1. Animais

Neste estudo foram utilizados experimentalmente 40 ratos Wistar [(WKT) 260-280g] provenientes do Biotério Prof. Thomas George– IpeFarM - da Universidade Federal da Paraíba/UFPB e do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura (21 ± 1 °C) e ciclo claro-escuro de 12 horas (Luzes acesas das 6 às 18 horas), com livre acesso a água e ração (Labina®, Purina). Os procedimentos com animais, bem como os protocolos experimentais deste projeto, foram submetidos à análise da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/CBIOTEC/UFPB) e aprovado sob o número de protocolo 133/2015. Os protocolos de radioimunoensaio para a análise da concentração plasmática de AVP e OT foram realizados no Laboratório Neuroendócrino do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo, com o apoio financeiro e técnico do Prof. Dr. José Antunes Rodrigues.

3.2. Implante de cânula-guia em direção ao ventrículo lateral

Utilizamos um aparelho estereotáxico (David-Kopf, Tujunga, CA, EUA) para o implante de cânulas-guia no SNC adaptamos a técnica descrita por Michelini e Bonagamba (1988) para o implante das cânulas-guia no ventrículo lateral esquerdo. As cânulas de aço inoxidável (12 mm de comprimento) foram confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (25 x 0,7 mm) e fixadas no suporte da torre do estereotáxico. Os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xilazina (0,7: 0,2 v/v, 0,08 ml/100g, ip). A profundidade da anestesia foi avaliada por uma falha em responder a uma pinçada nociva na cauda. Posteriormente os animais foram depilados na região dorsal da cabeça e posicionados no aparelho de estereotáxico. Realizamos incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo a região da calota craniana. A cânula-guia foi posicionada com base nas coordenadas estereotáxicas do Atlas de Paxinos e Watson [1986 (AP = -0,5 mm em relação ao bregma; L = $\pm 1,4$ mm da linha média e DV = -3,9 mm ventral à superfície do osso para o protocolo Neuroendócrino e Comportamental. No entanto, para acessar as regiões posteriores mais envolvidas na modulação cardiovascular, alteramos o parâmetro AP= -0,6)]. Realizamos a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um

motor de baixa rotação. A cânula-guia foi fixada ao crânio com resina acrílica de uso odontológico (Simplex, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) presa por pequenos parafusos de aço-inoxidável previamente introduzidos na região occipital da calota craniana. Ao final do implante, os animais foram retirados do aparelho estereotáxico e como medida de profilaxia pós-cirúrgica, injetamos 0,1 ml/100g (intramuscular) de Pentabiótico Veterinário de amplo-espectro (associação de penicilina e estreptomicina, 1,200.000 UI, Fort Dodge, Campinas, SP, Brasil) e Analgésico injetável ip [intraperitonal (Banamine 2,2 mg/kg, Schering-Plough, SP, Brasil)]. Em seguida, para recuperação pós-cirúrgica, os animais foram alojados em caixas com água e ração “*ad-libitum*” e mantidos no biotério Prof. Thomas George ou no biotério Central da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP até a data do experimento.

3.3. Microinjeção de drogas no ventrículo lateral

As drogas foram microinjetadas no ventrículo lateral esquerdo através de uma seringa Hamilton de 1µl (Hamilton, Reno, NV) conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha dental (200 µm de diâmetro, Missy). O volume final de cada droga microinjetada foi de 500 nl (Reis e cols., 2010). A ANG II [(H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH) Bachem] foi diluída em solução fisiológica estéril (salina 0,9%) com concentração final de 25 e 50 ng/0.5 µl (Reis e cols. 2010). O Fluorocitrato- FCt [Sal de bário / Sigma-Aldrich (inibidor reversível da atividade da glia)] foi diluído de acordo com Costa e cols., (2013) com concentração final de 21 µg/0.5 µl para o protocolo neuroendócrino. Para os protocolos comportamental e cardio-respiratório foram feitos testes nas concentrações de 21, 41 e 81µg/0.5 µl, das quais estabelecemos 41 µg/0.5 µl por ser a menor concentração capaz de promover alterações nas respostas comportamentais e cardio-respiratórias à ANG II. Após a diluição, o pH da solução foi ajustado para valores próximos a 7,4.

3.4. Coleta de sangue

Para as dosagens hormonais de AVP e OT, os animais foram sacrificados por decapitação (guilhotina) e, logo em seguida, o sangue foi coletado do tronco em tubos de polipropileno, mantidos sob gelo, contendo anticoagulante (10 µl de heparina/ml de sangue). O plasma foi separado por centrifugação a 3000 rpm, durante 15 min, em centrífuga refrigerada a 4°C, e em seguida estocado a – 70°C até o momento de cada dosagem.

3.5. Radioimunoensaio (RIE)

O plasma armazenado a -70°C foi utilizado para as dosagens de AVP e OT plasmáticos. A extração dos hormônios AVP e OT foram realizadas utilizando-se 1 ml de plasma adicionados a 2 ml de acetona gelada seguida de agitação contínua (20 segundos) e centrifugação (3000 rpm por 25 min a 4°C), sendo o sobrenadante decantado em um tubo contendo 2 ml de éter de petróleo e em seguida agitado e mantido em repouso por 5 minutos para a separação das camadas. A camada superior foi aspirada com o auxílio de uma bomba de vácuo e a camada inferior foi liofilizada em um *SpeedVac* sendo as amostras estocadas a -20°C para posterior dosagem por RIE. A eluição foi realizada com 3 ml de solução acetonitrila 60% e o extrato obtido foi liofilizado e então estocado a -20°C . No dia da realização do RIE, as amostras de AVP e OT foram ressuspensas em 250 μl de tampão AVP ou OT (tampão TRIS 0,05M com albumina humana 0,25%), sendo que, 100 μl do ressuspensão foi utilizado para o ensaio, em duplicata. No RIE, foram utilizados peptídeos marcados com ^{125}I , foram utilizados 4000 cpm/100 μl para a OT e 2000 cpm/100 μl para a AVP, o volume final de incubação foi de 500 μl durante quatro dias a 4°C . Os anti-soros utilizados (primeiro anticorpo de coelho anti-AVP e anti-OT) foram específicos para os hormônios analisados sem reação cruzada com outros peptídeos. Foi adicionado 100 μl do primeiro anticorpo nas amostras desconhecidas e os tubos foram agitados e incubados a 4°C durante 24 horas. O hormônio marcado (100 μl) foi armazenado em tubos, agitados e reincubados novamente por 24 h a 4°C . O hormônio marcado foi separado do não marcado com o auxílio da técnica de anticorpo secundário (anticorpo antigamaglobulina de coelho produzido em cabra) específicos para cada hormônio analisado. Após a adição de 100 μl do segundo anticorpo estes foram reincubados por 24 h a 4°C , e no dia seguinte, após incubação de 4 a 6 horas pela adição de 1 ml de polietilenoglicol (PEG 6,25%), as amostras foram centrifugadas a 3000 rpm por 25 minutos a 4°C e o sobrenadante foi aspirado. A radioatividade no precipitado foi determinada com o auxílio de um contador gama (Packard). Todos os dados foram expressos em pg/ml de plasma. As dosagens mínimas detectáveis foram de 0,8 pg/ml para AVP, 0,9 pg/ml para a OT, e os coeficientes de variação intra-ensaio e inter-ensaio foram de 7,7% e 11,9%, para a AVP, e 7,0% e 12,6% para a OT, respectivamente. Esse protocolo foi realizado em colaboração com o laboratório do Dr. José Antunes-Rodrigues (Departamento de Fisiologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP) e com auxílio técnico da Profa. Dra. Silvia Ruginsk (Universidade Federal de Alfenas/MG).

3.6. Canulação da artéria femoral

Na véspera da análise cardio-respiratória (24h antes), a artéria femoral dos animais foi canulada para a obtenção dos registros cardiovasculares. A cânula foi confeccionada a partir de um tubo de polietileno [(PE-10) Clay Adams, Parsippany, NJ, EUA], de 4 a 5 cm soldado a outro tubo de polietileno (PE-50) de aproximadamente 16 cm de comprimento, ajustado de acordo com o tamanho do animal.

Antes de iniciarmos o procedimento cirúrgico, preenchemos a cânula com solução fisiológica (salina 0,9%) e obstruímos com pinos de metal a extremidade livre do PE-50. Os ratos foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xilazina (0,7: 0,2 v/v, 0,08 ml/100g, ip), a cânula foi inserida e fixada na artéria femoral esquerda dos animais, a extremidade livre da cânula foi subcutaneamente dirigida, com o auxílio de um trocater, para a cintura escapular na região dorsal, onde foi exteriorizada no dorso do animal onde foi fixada com linha fina de sutura. A cânula arterial foi utilizada para o registro da pressão arterial (PA) e frequência cardíaca (FC).

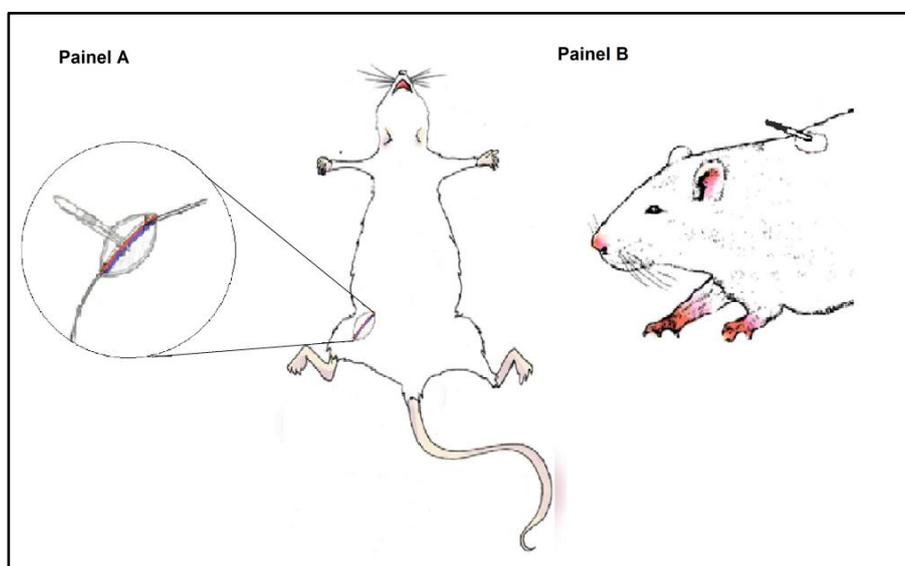


Figura 4: Ilustração do procedimento de implantação do cateter arterial. Painel A, identificação, dissecção da artéria e local de inserção do cateter. Painel B, exteriorização do cateter na região dorsal do animal.

3.7.Registros cardio-respiratórios

No dia seguinte à canulação da artéria femoral, a cânula foi heparinizada e em seguida conectada a um transdutor de pressão (MLT 0380, AD-Instruments, NSW, Austrália). O sinal foi então transferido para um amplificador (Bridge Amp, ML221, AD-Instruments, NSW, Austrália) e deste para o computador no qual se encontra instalado o software “Power Lab” (Power Lab, AD-Instruments, NSW, Austrália) para aquisição e

análise dos sinais. A frequência cardíaca (FC, bpm) foi registrada por meio de um biotacômetro digital acionado a partir dos pulsos de pressão arterial.

As medidas de ventilação foram obtidas por pletismografia em uma câmara de corpo inteiro para animais de pequeno porte descrito por Bartlett e Tenney (1970). O procedimento consiste na colocação do animal em um sistema fechado à entrada de gases. Foram consideradas as oscilações de pressão no interior do sistema em decorrência da diferença da temperatura entre o gás inspirado ($\sim 25\text{ C}^\circ$) e o gás expirado ($\sim 37\text{ C}^\circ$) para análise dos parâmetros ventilatórios. O procedimento foi feito da seguinte forma: a câmara foi aberta para a realização da microinjeção e após a câmara foi hermeticamente fechada para a realização da medida de ventilação, o fluxo de ar foi interrompido e a câmara do animal permaneceu totalmente vedada pelo período de tempo de ~ 3 min. As oscilações causadas pela respiração do animal foram captadas por um dispositivo conectado à câmara que contém o transdutor diferencial de pressão (ML141 spirometer, PowerLab, ADInstruments). O sinal foi então enviado para o sistema de aquisição de análise dos dados (LabChart TM Pro, PowerLab, ADInstruments) que amplifica os sinais e quantifica a amplitude e a frequência dos sinais respiratórios. A calibração do volume foi obtida durante cada experimento, injetando-se um volume conhecido de ar (1 mL) dentro da câmara do animal com o uso de uma seringa graduada. O sistema nos permitiu registrar as medidas de frequência respiratória (F_R) em Volts (V) que posteriormente foi analisada em ciclos por minuto (cpm). Os parâmetros analisados neste estudo foram a F_R , o Volume Corrente [(V_C) volume de ar inspirado ou expirado em cada respiração normal] e a Ventilação minuto [(V_M) volume de ar corrente que entra nas vias respiratórias a cada minuto].

3.8. Análise da Frequência respiratória (F_R)

As análises dos parâmetros respiratórios foram feitos manualmente para garantir a análise correta das medidas, uma vez que os animais estavam acordados e em livre movimentação na câmara durante a realização do experimento. A quantificação da F_R foi feita imediatamente após a microinjeção de ANG II icv (50 ng/0.5 μ l) ou FCt (41 μ g/0.5 μ l) de onde foi retirado um trecho correspondente à 10 segundos livre de ruídos e representativo do padrão da resposta gerada.

3.9. Análise do volume corrente (V_C) e da ventilação minuto (V_M)

A quantificação dos dados do V_C e V_M foi feita a partir das equações descritas por Drorbaugh e Fenn 1955:

$$V_C = \frac{PT}{Pk} \times V_k \times \frac{T_c (PB - PA)}{T_c (PB - PA) - TA (PB - PC)}$$

$$V_M \text{ (mL.Kg}^{-1}\text{.min}^{-1}\text{)} = V_C \text{ (mL.Kg}^{-1}\text{)} \times F_R \text{ (cpm)}$$

Onde:

V_C : Volume de ar corrente

PT: Deflexão da pressão associada a cada volume de ar corrente

Pk: Deflexão da pressão associada a cada volume de ar injetado para calibração

V_k : Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração

T_C : Temperatura Corporal

PB: Pressão Barométrica

PA: Pressão de vapor d'água a temperatura da câmara

TA: Temperatura de ar dentro da câmara do animal

PC: Pressão de vapor d'água a temperatura do animal

No presente estudo, os registros respiratórios em condições basais apresentaram os valores médios: (F_R : 102.2 ± 5.8 cpm), (V_C : 7.6 ± 0.8 mL.Kg⁻¹) e (V_M : 858.2 ± 110.2 mL.Kg⁻¹.min⁻¹), os quais correspondem aos valores respiratórios basais de ratos não anestesiados, observados em estudos prévios da literatura (Machado e cols., 1992; Granjeiro e cols., 2009).

3.10. Eutanásia

Ao final dos experimentos os animais receberam dose sublimiar da mistura do anestésico e relaxante muscular Ketamina e Xilazina (ip) e foram sacrificados por decaptação em guilhotina adequada para roedores, com lâminas em aço Inox 420 com cerca de 200 mm de altura (Bonther, Monte Alegre, Ribeirão Preto, SP).

3.11. Soluções e Drogas utilizadas

- Solução fisiológica estéril (0,9%) – veículo.
 - ANG II [(H-Asp-Arg-Val-Tyr-Ile-His-Pro-Phe-OH) Bachem, Bubendorf, Suíça].
 - Fluorocitrato- FcT [(inibidor reversível da atividade da glia (Sal de bário / Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA)].
 - Cloridrato de cetamina [Anestésico (Quetamina[®] Laboratório – Vetnil, Brasil)].
-

- Xilazina [Analgésico e Relaxante muscular (Dopaser - Laboratório Calier, Espanha)].
- Heparina [Anticoagulante (Parinex[®] - Laboratório Hipolabor Brasil)].
- Pentabiótico Veterinário de amplo-espectro (associação de penicilina e estreptomicina, Fort Dodge, SP, Brasil).
- Banamine [(Analgésico) Schering-Plough, SP, Brasil)].

3.12. Histologia

Ao final dos experimentos fizemos a microinjeção no VL do corante azul de Evans 2% (Vetec, Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) no volume de 500 nl, para a determinação do sítio específico da microinjeção. Na sequência, os animais foram anestesiados com uma mistura de Ketamina e Xilazina (0,7: 0,2 v/v, 0,08 ml/100g, ip) e perfundidos com solução de salina (0,9%) seguido da perfusão com solução formol (10%) tamponada. O cérebro foi removido e fixado em formol (10%) por 48 horas e então transferido para solução de sacarose (30%) para a crioproteção. Os cortes histológicos foram realizados no criostato (60 µm) e montados em lâminas gelatinizadas, após, foram cobertos com lamínulas e posteriormente analisados por microscopia de luz [Axioskop (Carl Zeiss, Alemanha)] para identificação do sítio da microinjeção.

3.13. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como MÉDIA ± EPM (erro padrão da média) e analisados pelo teste de variância One-way ou Two-way (ANOVA) seguido do teste de comparações múltiplas (Newman-Keuls, Programa Prisma GrafPad, versão 06). Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

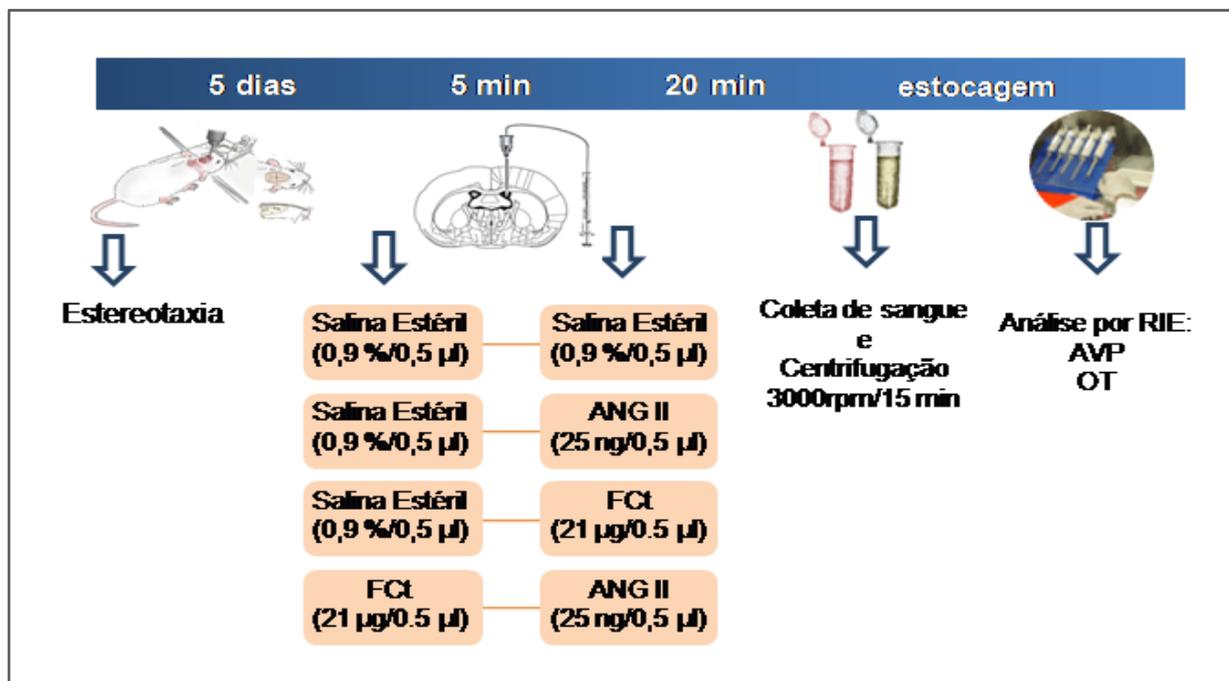
3.14. Fonte Orçamentária

As drogas foram adquiridas com recurso do projeto PVE/CAPES 8888.1.062209/2014.1. CNPq 161260/2015-2

4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1. Efeito da microinjeção de ANG II (25 ng/0.5 µl), FCt (21 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre a concentração plasmática de AVP e OT.

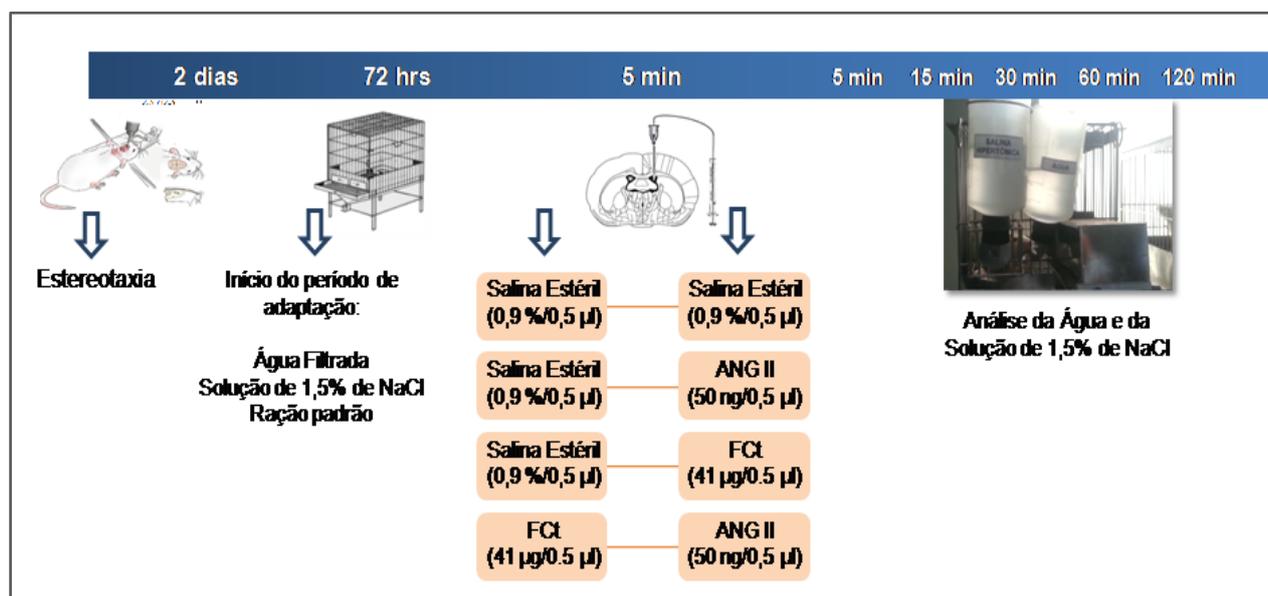
Entre 4 a 5 dias após a cirurgia de estereotaxia para a introdução da cânula guia na região do ventrículo lateral, os animais foram subdivididos em 4 grupos (G) de acordo com as microinjeções realizadas no VL: 1º G - salina estéril (0,9%) + salina estéril (0,9%); 2º G - salina estéril (0,9%) + ANG II (25 ng/0.5 µl); 3º G - salina estéril (0,9%) + FCt (21 µg/0.5 µl); 4º G - FCt + ANG II. As microinjeções foram realizadas a intervalos de 5 min. e após 20 min da segunda microinjeção, os animais de cada grupo foram decapitados e tiveram o sangue coletado e centrifugado para obtenção do plasma, o qual foi estocado até o momento da dosagem da concentração de AVP e OT plasmáticas por meio da técnica de Radioimunoensaio (RIE).



O objetivo desse protocolo foi avaliar a participação da glia hipotalâmica nas respostas neuroendócrinas observadas após a microinjeção de ANG II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados.

4.2. Efeito da microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre a ingestão de água e sódio (1,5%).

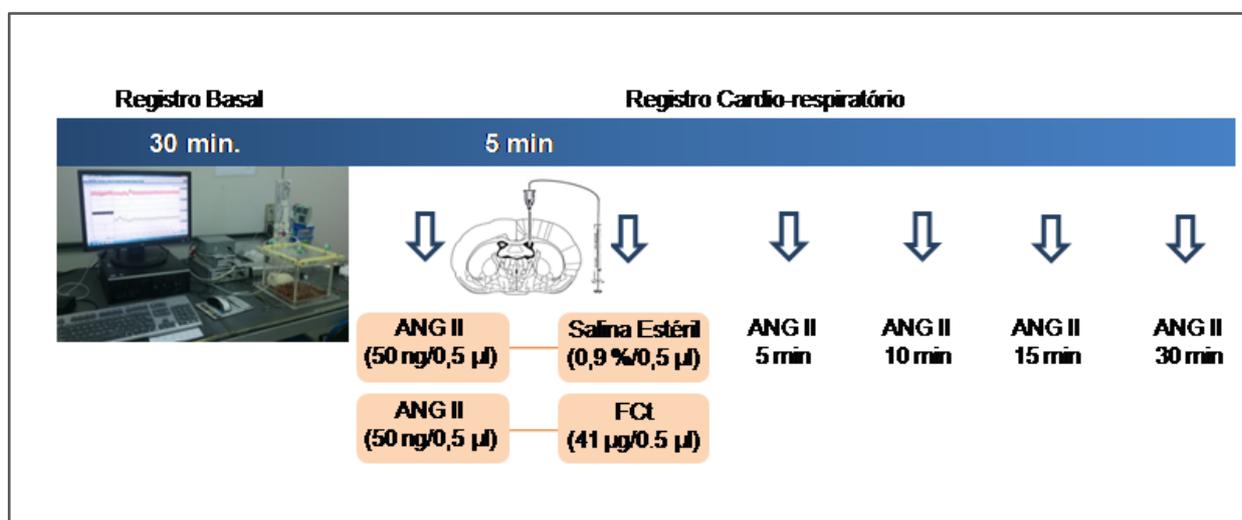
No segundo dia, após a cirurgia de estereotaxia para a introdução da cânula-guia na região do ventrículo lateral, os animais foram adaptados às gaiolas metabólicas por um período de 72 horas com ração padrão e bebedouros. Os bebedouros foram preenchidos com água filtrada ou solução de sódio (1,5%) e fixados na frente da gaiola metabólica. Após período de adaptação, os bebedouros foram retirados das gaiolas e os animais subdividimos em 4 grupos experimentais de acordo com as microinjeções realizadas no VL: 1º G - salina estéril (0,9%) + salina estéril (0,9%); 2º G - salina estéril (0,9%) + ANG II (50 ng/0.5 µl); 3º G - salina estéril (0,9%) + FCt (41 µg/0.5 µl); 4º G - FCt + ANG II. As microinjeções no VL foram realizadas a intervalos de 5 min. Após a segunda microinjeção, recolocamos os bebedouros com água filtrada e sódio (1,5% NaCl) nas gaiolas e analisamos a ingestão dos líquidos nos tempos de 5, 15, 30, 60, 120 e 240 min. utilizando uma proveta de vidro com capacidade para 200 ml, graduada por cada ml.



O objetivo desse protocolo foi avaliar a participação da glia hipotalâmica nas respostas comportamentais basais de ingestão de água e de sódio (1,5%) observadas após a microinjeção de ANG II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados.

4.3. Efeito da microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre os parâmetros cardio-respiratórios basais.

Entre 4 e 5 dias após a cirurgia de estereotaxia para a introdução da cânula guia na região do ventrículo lateral, os animais tiveram a artéria femoral canulada e cerca de 24h após a canulação, a cânula arterial foi conectada ao transdutor de pressão para os registros da Pressão Arterial Pulsátil (PAP, mmHg), Pressão Arterial Média (PAM, mmHg) e Frequência Cardíaca (FC, bpm). O animal foi colocado na câmara pletismográfica para o registro da Frequência Respiratória (F_R , cpm), do Volume Corrente (V_C , mL.Kg⁻¹) e da Ventilação Minuto (V_M , mL.Kg⁻¹.min⁻¹). Após 30 minutos de registro basal, para a estabilização dos parâmetros cardio-respiratórios, realizamos o registro ventilatório basal por um período de 3 min., após esse período realizamos a microinjeção de ANG II icv (50 ng/0.5 µl) antes e aos 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção de salina estéril (0,9%) ou FCt (41 µg/0.5 µl) no VL.



O objetivo desse protocolo foi avaliar a participação da glia hipotalâmica nas respostas cardiovasculares e respiratórias basais e observadas após a microinjeção de ANG II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados.

5. RESULTADOS

5.1. Corte Histológico

Na Figura 5, podemos observar um corte histológico (60 μm) do cérebro de um rato, na região do diencéfalo destacando o corpo caloso e núcleo supra-óptico, mostrando o trajeto da cânula-guia em direção ao ventrículo lateral (seta vermelha). Em todos os nossos protocolos, as microinjeções foram consideradas positivas mediante a presença do corante azul de *evans* ou rastro da microinjetora em direção ao ventrículo lateral.

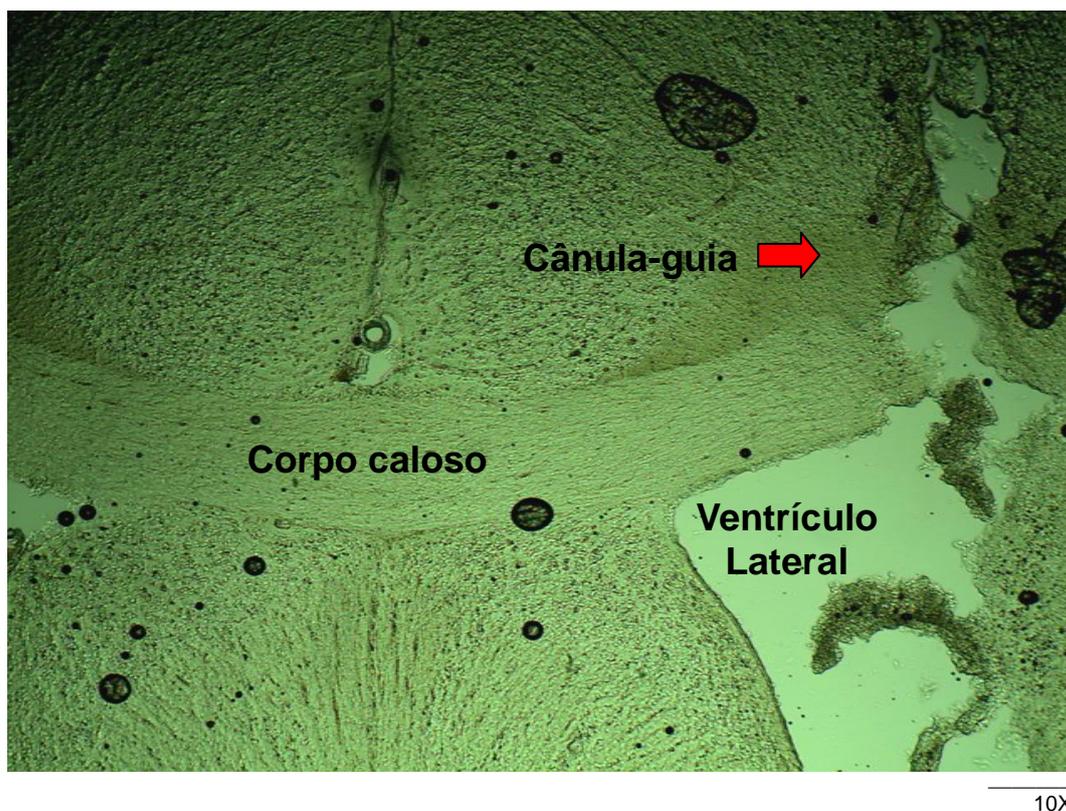


Figura 5: Fotomicrografia de um corte histológico coronal (60 μm , 10X) mostrando o sítio da microinjeção na região do VL e o percurso da cânula (indicado pela seta) no encéfalo de um rato representativo.

5.2. Efeito da microinjeção de ANG II (25 ng/0.5 µl), FCt (21 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre as respostas neuroendócrinas de liberação Vasopressina (AVP) e Ocitocina (OT) plasmáticas.

A Figura 6 e a Tabela 1 mostram o efeito da microinjeção icv do veículo salina estéril 0,9%, ANG II (25 ng/0.5 µl), FCt (21 µg/0.5 µl) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt sobre a concentração de AVP plasmática. Os resultados mostram que a microinjeção de ANG II no VL promoveu aumento significativo na concentração de AVP plasmática quando comparado ao controle salina estéril 0,9% ($2,3 \pm 0,4$ vs. $1,3 \pm 0,1$ pg/ml, $p=0,039$). A microinjeção de FCt não promoveu alterações significativas na concentração de AVP plasmática quando comparado ao controle salina estéril 0,9% ($0,99 \pm 0,1$ vs. $1,3 \pm 0,1$ pg/ml, $p=0,78$). Por outro lado, a prévia microinjeção de FCt no VL atenuou o aumento na concentração de AVP plasmática observado após a microinjeção de ANG II ($1,3 \pm 0,2$ vs. $2,3 \pm 0,4$ pg/ml, $p=0,05$).

A Figura 7 e a Tabela 1 representam o efeito da microinjeção no VL do veículo salina estéril 0,9%, ANG II (25 ng/0.5 µl), FCt (21 µg/0.5 µl) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt sobre a concentração de OT plasmática. Os resultados mostram que a microinjeção de ANG II ($3,9 \pm 0,8$ pg/ml, $p=0,025$) ou FCt ($2,6 \pm 0,4$ pg/ml, $p=0,024$) no VL de ratos não anestesiados promovem aumento significativo na concentração de OT plasmática em relação ao controle salina estéril 0,9% ($1,4 \pm 0,2$ pg/ml). A prévia microinjeção de FCt não promoveu alterações no aumento da concentração de OT plasmática observado após a microinjeção de ANG II ($2,9 \pm 0,4$ vs. $3,9 \pm 0,8$ pg/ml, $p=0,31$).

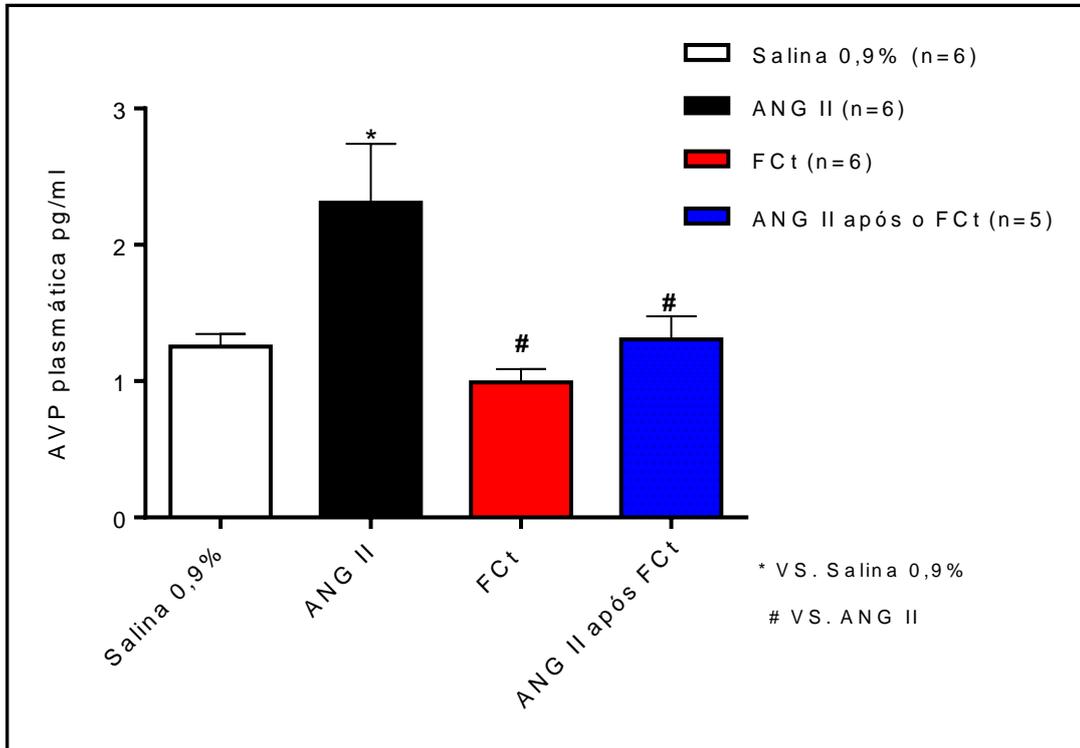


Figura 6: Liberação de vasopressina plasmática induzida pela microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II (25 ng/0.5 μ l), FCt (21 μ g/0.5 μ l) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL. Os dados foram expressos como MÉDIAS \pm EPM. * p <0,05 vs. Salina 0,9%, # p <0,05 vs. ANG II.

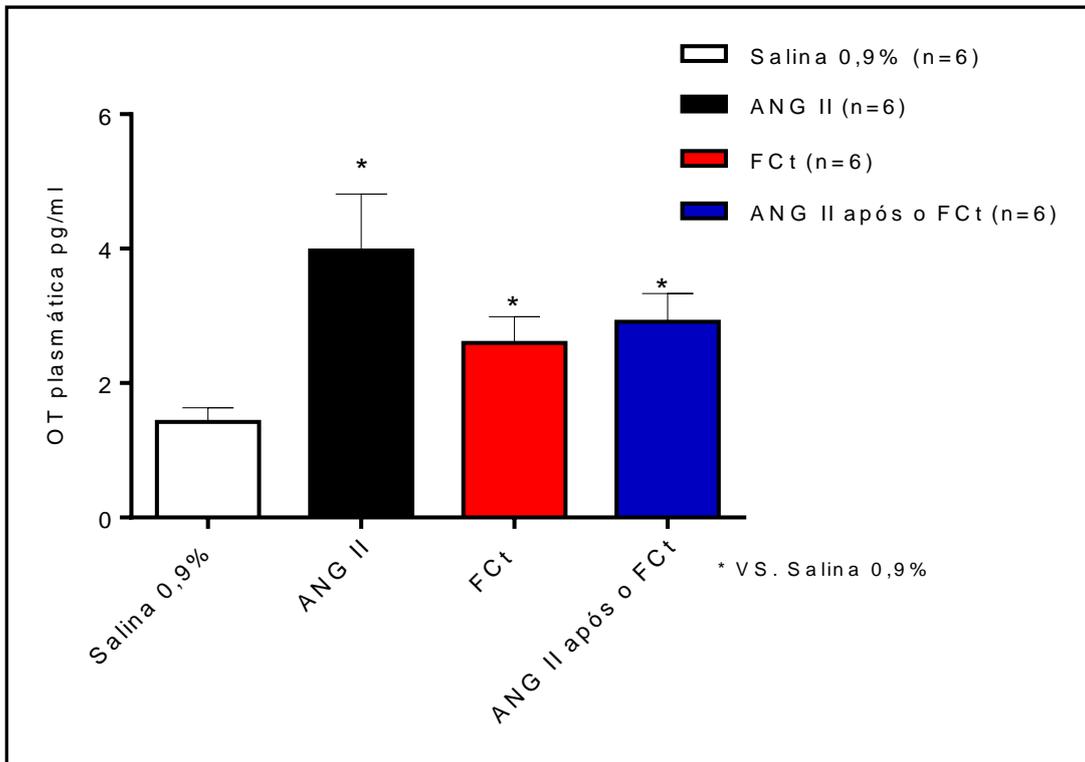


Figura 7: Liberação de ocitocina plasmática induzida pela microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II (25 ng/0.5 μ l), FCt (21 μ g/0.5 μ l) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt sobre a concentração de ocitocina (OT) plasmática. Os dados foram expressos como MÉDIAS \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Salina 0,9%.

Tabela 1: Concentração de Vasopressina e Ocitocina plasmáticas induzidas pelas microinjeções icv de salina estéril 0,9%, ANG II (25 ng/0.5 µl), FCt (21 µg/0.5 µl) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no ventrículo lateral de ratos não anestesiados. Os dados foram expressos como MÉDIAS ± EPM. * $p < 0,05$ vs. Salina 0,9%, # $p < 0,05$ vs. ANG II.

Grupos	Concentração Plasmática (pg/ml)	
	AVP	OT
Salina 0,9%	1,3 ± 0,1	1,4 ± 0,2
ANG II	2,3 ± 0,4*	3,9 ± 0,8*
FCt	0,99 ± 0,1 [#]	2,6 ± 0,4*
ANG II após o FCt	1,3 ± 0,2 [#]	2,9 ± 0,4*

5.3. Efeito da microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre as respostas comportamentais de ingestão de água e sódio (1,5 %).

Os painéis da Figura 8 representam a ingestão não cumulativa (Painel A) e cumulativa (Painel B) de água após a microinjeção icv de salina estéril 0,9%, ANG (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL. A microinjeção da ANG II promoveu aumento significativo na ingestão de água cumulativa em relação ao controle salina estéril 0,9% (5,3 ± 1,6 ml vs. 1,2 ± 0,4 ml/4 h, $p=0,02$). A microinjeção do FCt não promoveu alterações na ingestão de água em relação ao controle salina estéril 0,9% (1,3 ± 0,3 vs. 1,2 ± 0,4 ml/4 h, $p=0,8$), tampouco promoveu alterações significativas na resposta de aumento de ingestão de água induzido pela ANG II no VL (8 ± 2,4 vs. 5,3 ± 1,6 ml/4 h, $p=0,44$) Figura 8 e Figura 9, Tabela 2)].

Os painéis da

Figura 10 representam a ingestão não cumulativa (Painel A) e cumulativa (Painel B) de sódio (1,5%) após a microinjeção icv de salina estéril 0,9%, ANG II (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt. A ANG II no VL promoveu aumento significativo na ingestão de sódio (1,5%) quando comparado ao controle salina estéril 0,9% (16 ± 1,1 vs. 2,5 ± 0,7 ml/4 h, $p=0,0001$). A microinjeção de FCt promoveu diminuição na ingestão de sódio (1,5%) quando comparada ao controle salina estéril 0,9% (0,83 ± 0,3 vs. 2,5 ± 0,7 ml/4 h, $p=0,04$). A prévia microinjeção de FCt atenuou significativamente a ingestão de sódio promovido pela ANG II no VL [2,7 ± 0,3 vs. 16 ± 1,1 ml/4 h, $p=0,0001$ (Figura 11)].

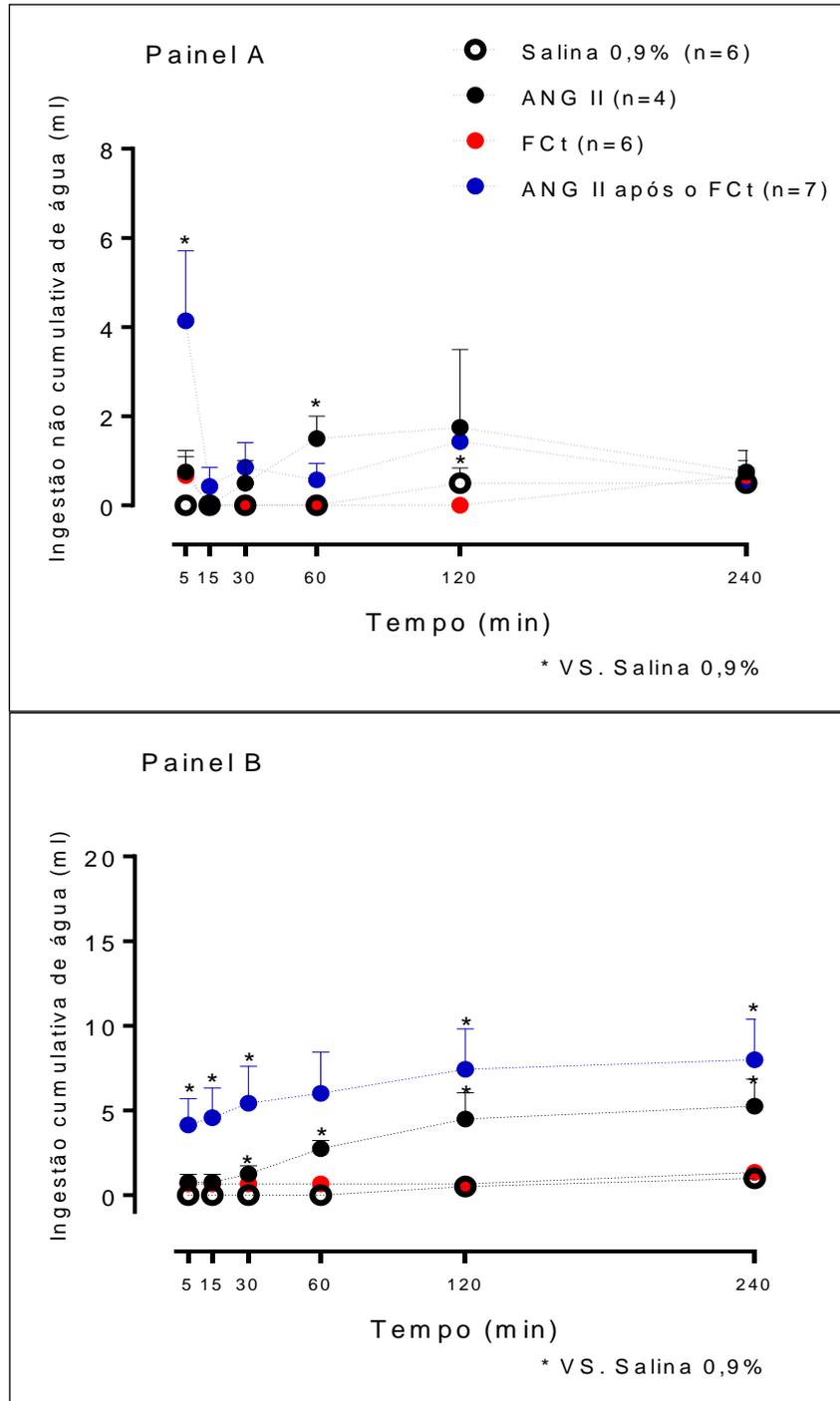


Figura 8: Ingestão de água não cumulativa (Painel A) e cumulativa (Painel B) após a microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II (50 ng/0.5 μ l), FCt (41 μ g/0.5 μ l) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL de ratos não anestesiados. Os dados mostram as MÉDIAS \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Salina 0,9%.

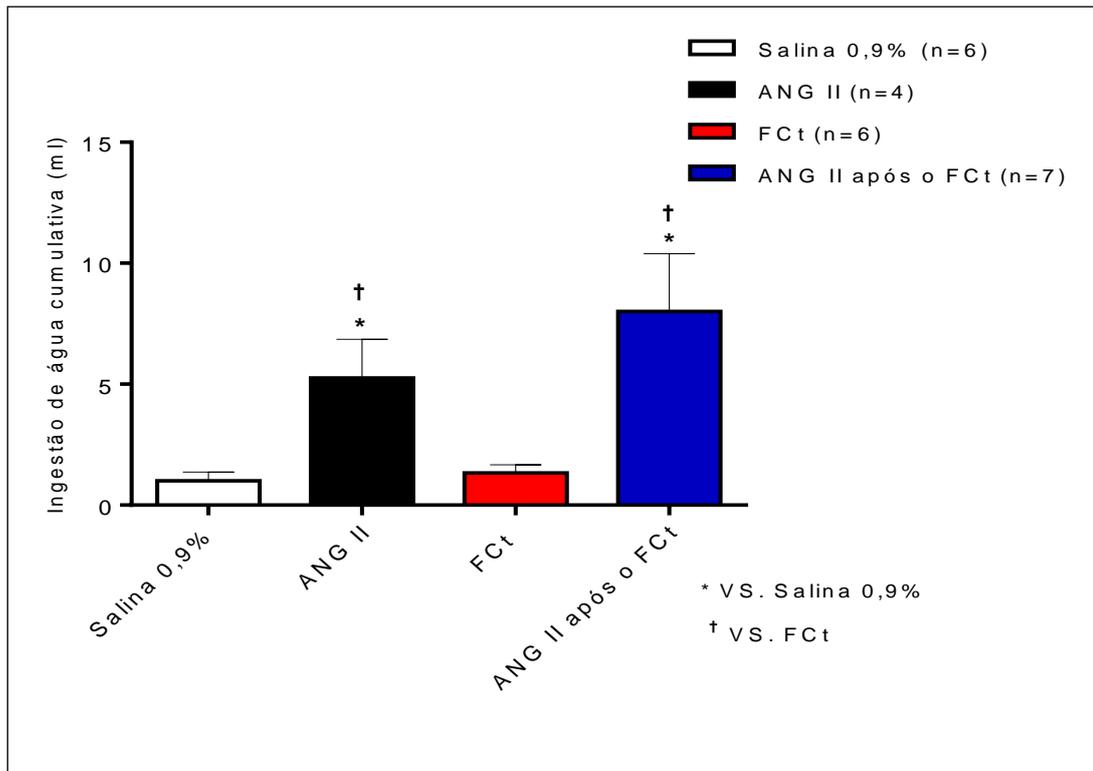


Figura 9: Ingestão de água 240 min. (cumulativa) após as microinjeção de salina estéril 0,9%, ANG II (50 ng/0.5 μ l), FCt (41 μ g/0.5 μ l) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL de ratos não anestesiados. Os dados mostram as MÉDIAS \pm EPM. * $p < 0,05$ vs. Salina 0,9%, † $p < 0,05$ vs. FCt.

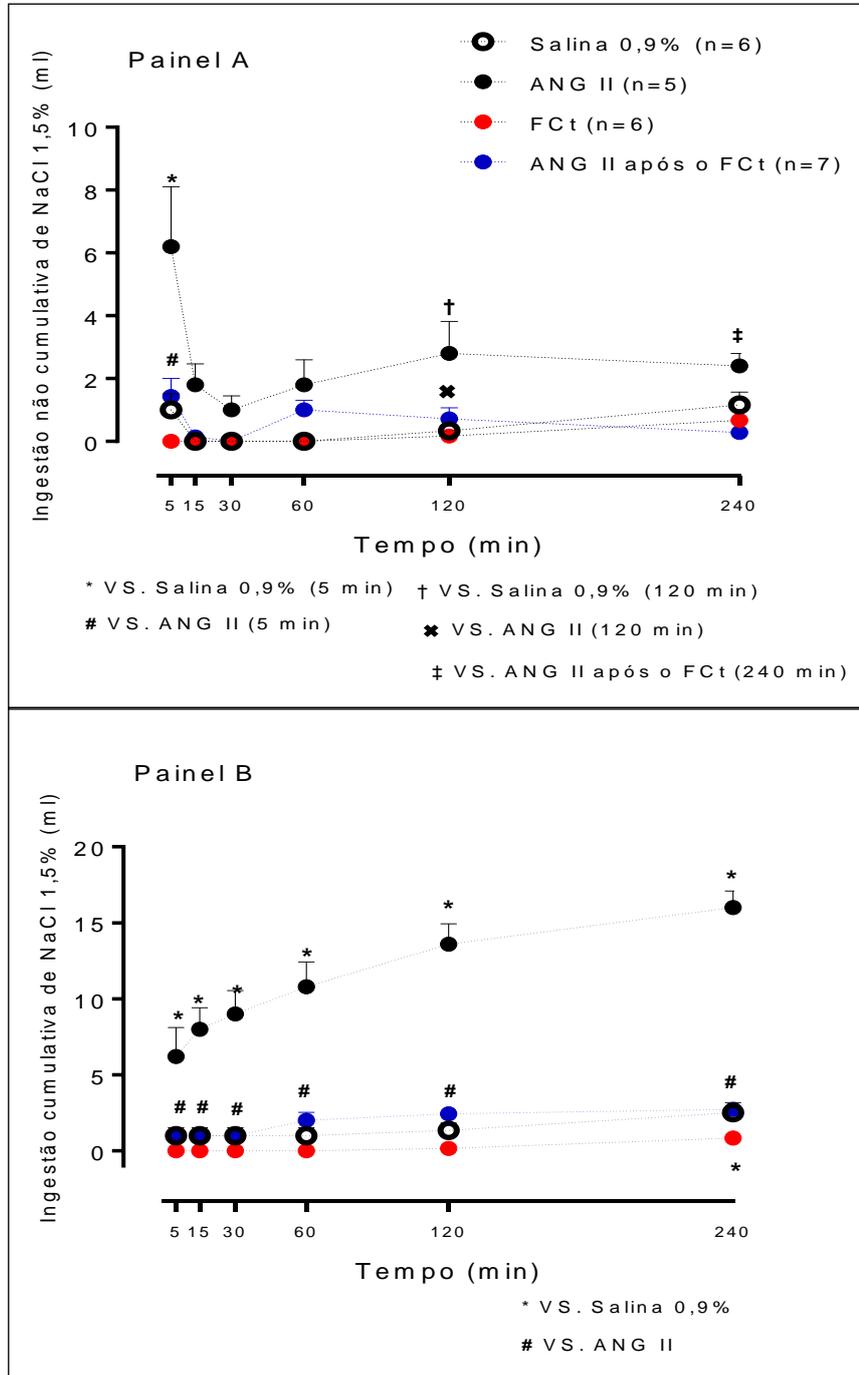


Figura 10: Ingestão de sódio (1,5%) não cumulativa (Painel A) e cumulativa (Painel B) após a microinjeção icv de salina estéril 0,9%, ANG II (50 ng/0.5 μ l), FCt (41 μ g/0.5 μ l) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL de ratos não anestesiados. Os dados mostram as MÉDIAS \pm EPM [$*p < 0,05$ vs. Salina 0,9%, $\#p < 0,05$ vs. ANG II (5 min), $\dagger p < 0,05$ vs. Salina 0,9% (120 min), $\times p < 0,05$ vs. ANG II (120 min), $\ddagger p < 0,05$ vs. ANG II após o FCt (240 min)].

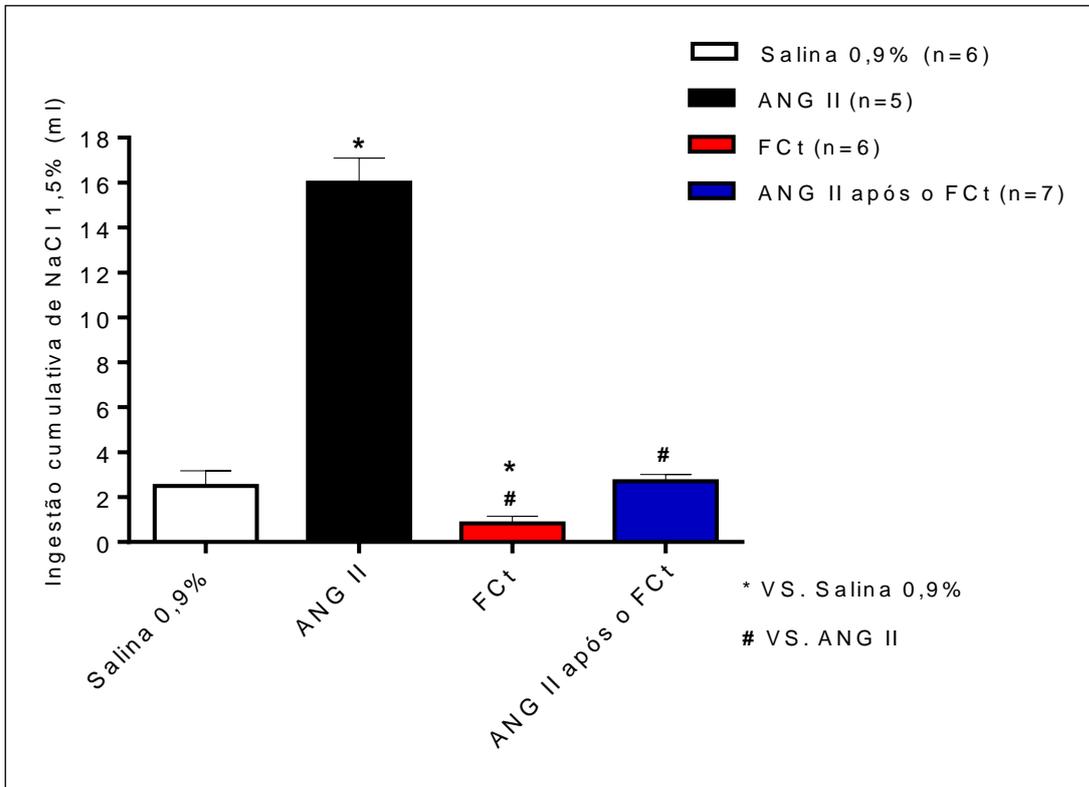


Figura 11: Ingestão cumulativa de sódio (1,5%) após a microinjeção icv de salina estéril 0,9%, ANG II (50 ng/0.5 μ l), FCt (41 μ g/0.5 μ l) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL de ratos não anestesiados. Os dados mostram as MÉDIAS \pm EPM (* p <0.05 vs. Salina 0,9%, # p <0,05 vs. ANG II).

Tabela 2: Ingestão cumulativa de água concomitante à ingestão cumulativa de sódio (1,5%) aos 5 min, 15 min, 30 min, 60 min, 120 min e 240 min após as microinjeções de salina estéril 0,9%, ANG II (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e ANG II após a prévia microinjeção de FCt no VL de ratos não anestesiados. Os resultados mostram as MÉDIAS ± EPM. * $p < 0,05$ vs. Salina 0,9%, # $p < 0,05$ vs. ANG II, † $p < 0,05$ vs. FCt.

Grupos	Ingestão cumulativa de Água (ml)					
	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Salina 0,9%	0,67 ± 0,67	0,67 ± 0,67	0,67 ± 0,67	0,67 ± 0,67	1,2 ± 0,7	1,2 ± 0,4
ANG II	0,75 ± 0,5	0,75 ± 0,5	1,3 ± 0,5*	2,8 ± 0,5*	4,5 ± 1,5*	5,3 ± 1,6*†
FCt	0,67 ± 0,4	0,67 ± 0,4	0,67 ± 0,4	0,67 ± 0,4	0,67 ± 0,4	1,3 ± 0,3
ANG II após o FCt	4,1 ± 1,6*	4,6 ± 1,7*	4,8 ± 2*	6 ± 2,4*	7,4 ± 2,4*	8 ± 2,4*†

Grupos	Ingestão cumulativa da Sódio (1.5% de NaCl) (ml)					
	5 min	15 min	30 min	60 min	120 min	240 min
Salina 0,9%	1 ± 0,5	1 ± 0,5	1 ± 0,5	1 ± 0,52	1,3 ± 0,5	2,5 ± 0,7
ANG II	6,2 ± 1,9 *	8,4 ± 1,7 *	9 ± 1,8 *	10,8 ± 1,6*	13,6 ± 1,3*	16 ± 1,1*
FCt	0,17 ± 0,17*#	0,17 ± 0,17*#	0,17 ± 0,17*#	0,17 ± 0,17*#	0,17 ± 0,2*#	0,83 ± 0,3*#
ANG II após o FCt	1 ± 0,4#	1 ± 0,4#	1 ± 0,4#	2 ± 0,5#	2,4 ± 0,3#	2,7 ± 0,3#

5.4. Efeito da microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl), FCt (41 µg/0.5 µl) e/ou salina estéril no VL de ratos não anestesiados sobre as respostas cardio-respiratórias.

Os painéis da Figura 12 mostram o traçado de um animal representativo do grupo, mostrando os registros da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca [(FC, bpm) Figura 12, painel A] e da Frequência Respiratória [(FR, cpm) Figura 12, painel B] a microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl) antes e após a microinjeção de FCt (41 µg/0.5 µl) no VL de ratos não anestesiados.

Nos painéis da Figura 13 e Tabela 3 podemos observar que a ANG II promoveu aumento significativo na PAM basal dos ratos (144,5 ± 5,7 vs. 118,3 ± 4,5 mmHg, $p=0,02$), mas não houve alterações significativas na FC basal (325,4 ± 12,3 vs. 357,9 ± 7,9 bpm, $p=0,09$). A microinjeção de salina estéril 0,9% também não promoveu alteração na PAM basal (131,4 ± 0,6 vs. 129,1 ± 1,8 mmHg, $p=0,2$) ou na FC basal [331 ± 25 vs. 340,3 ± 12,7 bpm, $p=0,7$ (Figura 13 e Tabela 3)].

Nos painéis da Figura 14 e Tabela 3, observamos que a Ang II promoveu aumento significativo na PAM basal dos ratos (137,8 ± 4,9 vs. 115,1 ± 3,5 mmHg, $p=0,002$), mas não promoveu alterações significativas na FC basal (311,7 ± 37,9 vs. 352,4 ± 15 bpm, $p=0,10$). A microinjeção de FCt também não promoveu alterações tanto da PAM basal

($129,6 \pm 3,4$ vs. $121,7 \pm 3,6$ mmHg, $p=0,13$) quanto na FC basal dos animais ($310,4 \pm 16,7$ vs. $341,3 \pm 14$ bpm, $p=0,18$).

Nos painéis da Figura 15 observamos que a microinjeção de salina estéril 0,9% não promoveu alterações na variação da resposta pressora (Figura 15, painel A, Tabela 3) ou da FC (Figura 15, painel B, Tabela 3) induzidas pela ANG II nos diferentes tempos analisados. Entretanto, os painéis da Figura 16 mostram que o FCt foi eficaz em reduzir a resposta pressora induzida pela ANG II [$\Delta 12,6 \pm 2,1$ vs. $\Delta 22,6 \pm 1,9$ mmHg, $p=0,05$] aos 5 minutos (Figura 16 painel A, Tabela 3), sem promover alterações significativas na FC (Figura 16, painel B, Tabela 3) nos diferentes tempos analisados.

Na sequência, nos painéis da Figura 17, observamos que a microinjeção de ANG II não promoveu alterações significativas na F_R ($109,8 \pm 5,5$ vs. $116,2 \pm 13,2$ cpm, $p=0,67$) dos ratos (Figura 17, painel A, Tabela 4), no V_C [$9 \pm 2,1$ vs. $11,2 \pm 2,2$ mL.Kg⁻¹m, $p=0,52$] (Figura 17, painel B) ou no V_M basal [$978,5 \pm 184,3$ vs. $1260 \pm 87,3$ mL.Kg⁻¹m, $p=0,24$] (Figura 17, painel C)]. A microinjeção de salina estéril 0,9% também não alterou os parâmetros analisados, a F_R [$97,2 \pm 4,7$ vs. $116,2 \pm 13,2$ cpm, $p=0,24$] (Figura 17, painel A)], o V_C [$9,9 \pm 1,7$ vs. $11,2 \pm 2,2$ mL.Kg⁻¹m, $p=0,69$] (Figura 17, painel B)] ou no V_M basal [$955,4 \pm 126,8$ vs. $1260 \pm 87,3$ mL.Kg⁻¹m, $p=0,11$] (Figura 17, Tabela 4)].

Semelhantemente, na Figura 18, observamos que a microinjeção de ANG II não promoveu alterações na F_R [$109,6 \pm 5,9$ vs. $105,9 \pm 4,6$ cpm, $p=0,63$] (Figura 18, painel A)], o V_C [$8,6 \pm 0,7$ vs. $7,8 \pm 0,7$ mL.Kg⁻¹, $p=0,43$] (Figura 18, painel B)] ou no V_M basal [$950,7 \pm 98,2$ vs. $873,5 \pm 86,7$ mL.Kg⁻¹.min⁻¹, $p=0,57$] (Figura 18, painel C) Tabela 4}. Entretanto, a microinjeção de FCt no VL promoveu redução significativa na F_R ($77,7 \pm 3,8$ vs. $105,9 \pm 4,6$ cpm, $p=0,002$) dos ratos (Figura 18, painel A, Tabela 4), mas não promoveu alterações significativas no V_C ($9,7 \pm 0,6$ vs. $7,8 \pm 0,7$ mL.Kg⁻¹m, $p=0,06$) (Figura 18, painel B, Tabela 4) ou V_M ($827,2 \pm 57,3$ vs. $873,5 \pm 86,7$ mL.Kg⁻¹m, $p=0,66$) (Figura 18, painel C, Tabela 4)].

Tanto a microinjeção de salina estéril, quanto a de FCt não alteraram o padrão atividade respiratória da microinjeção de ANG II em nenhum dos tempos analisados.

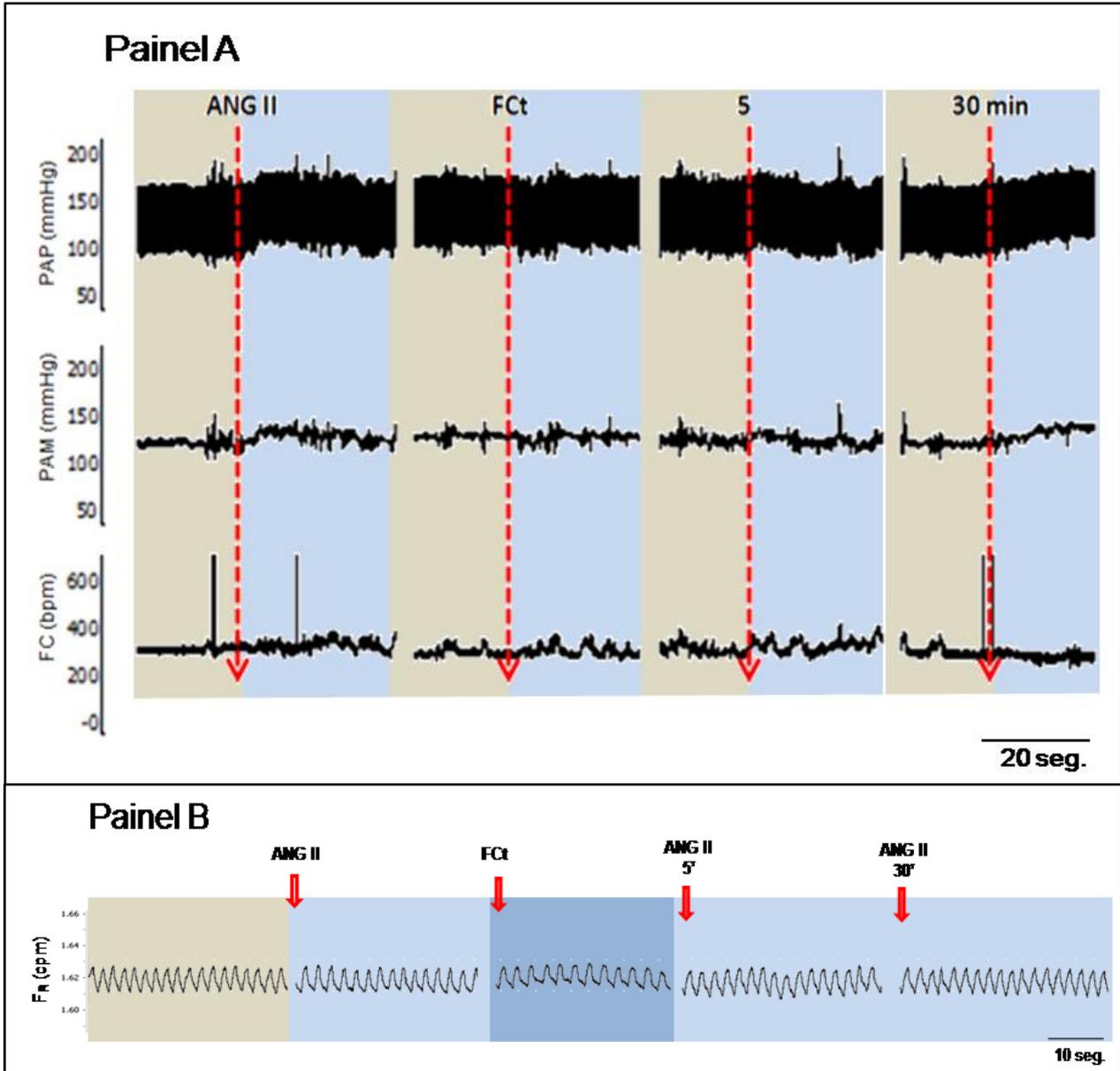


Figura 12: Traçado de um animal representativo do grupo, mostrando as alterações na pressão arterial pulsátil (PAP), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca [(FC, bpm) Painel A] e a frequência respiratória [(F_R , cpm) Painel B] a microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 μ l) antes e aos 5 e 30 minutos após a microinjeção de FCt (41 μ g/0.5 μ l) no VL de ratos não anestesiados.

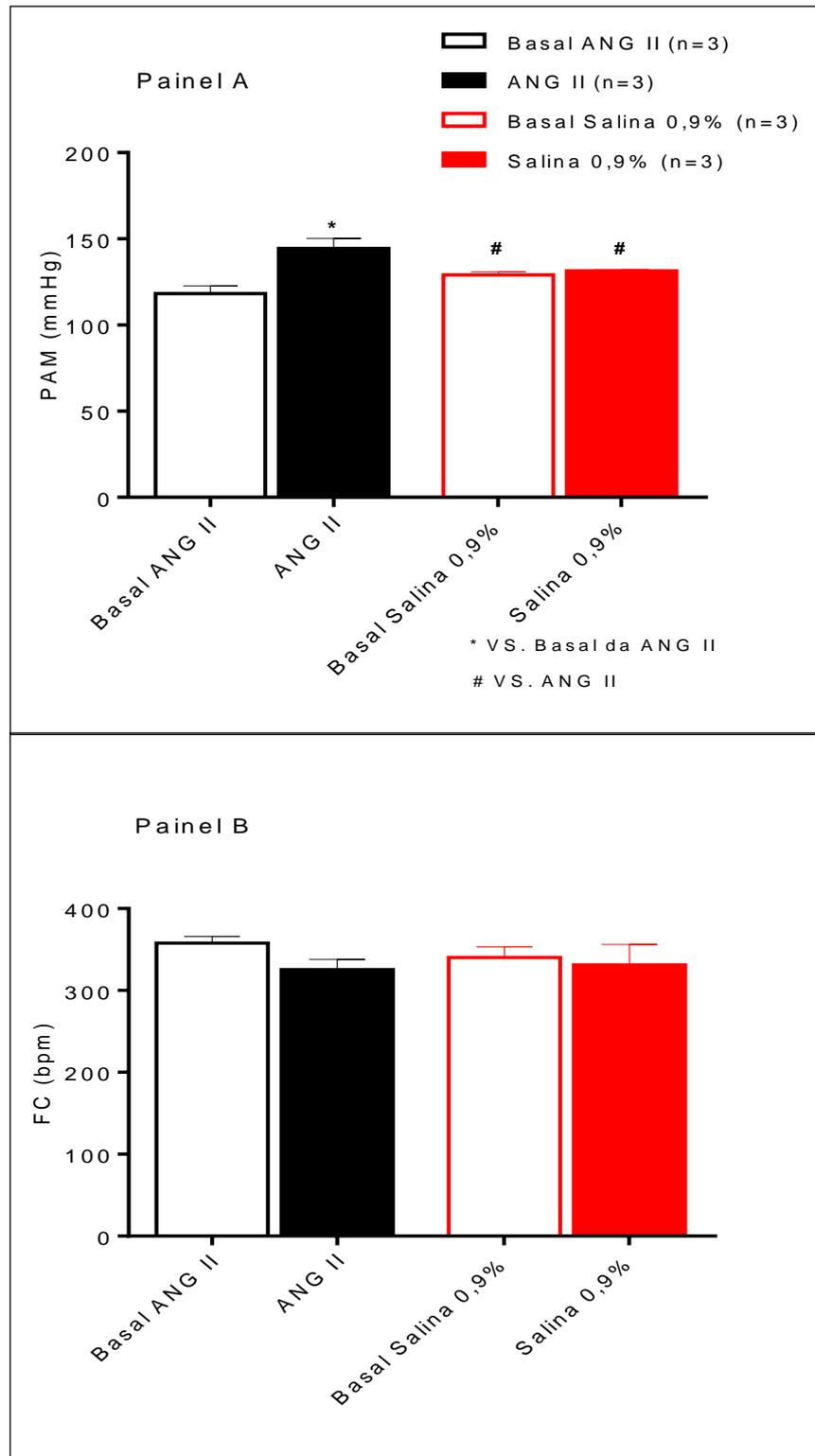


Figura 13: Valores da Pressão Arterial Média [PAM, mmHg (Painel A)] e da Frequência Cardíaca [FC, bpm (Painel B)] basais dos animais antes e após a microinjeção icv de ANG II (50 ng/0.5 μ l) ou Salina estéril 0,9% no VL de ratos não anestesiados. Os dados foram expressos como MÉDIAS \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. Basal da ANG II, # $p < 0,05$ vs. ANG II.

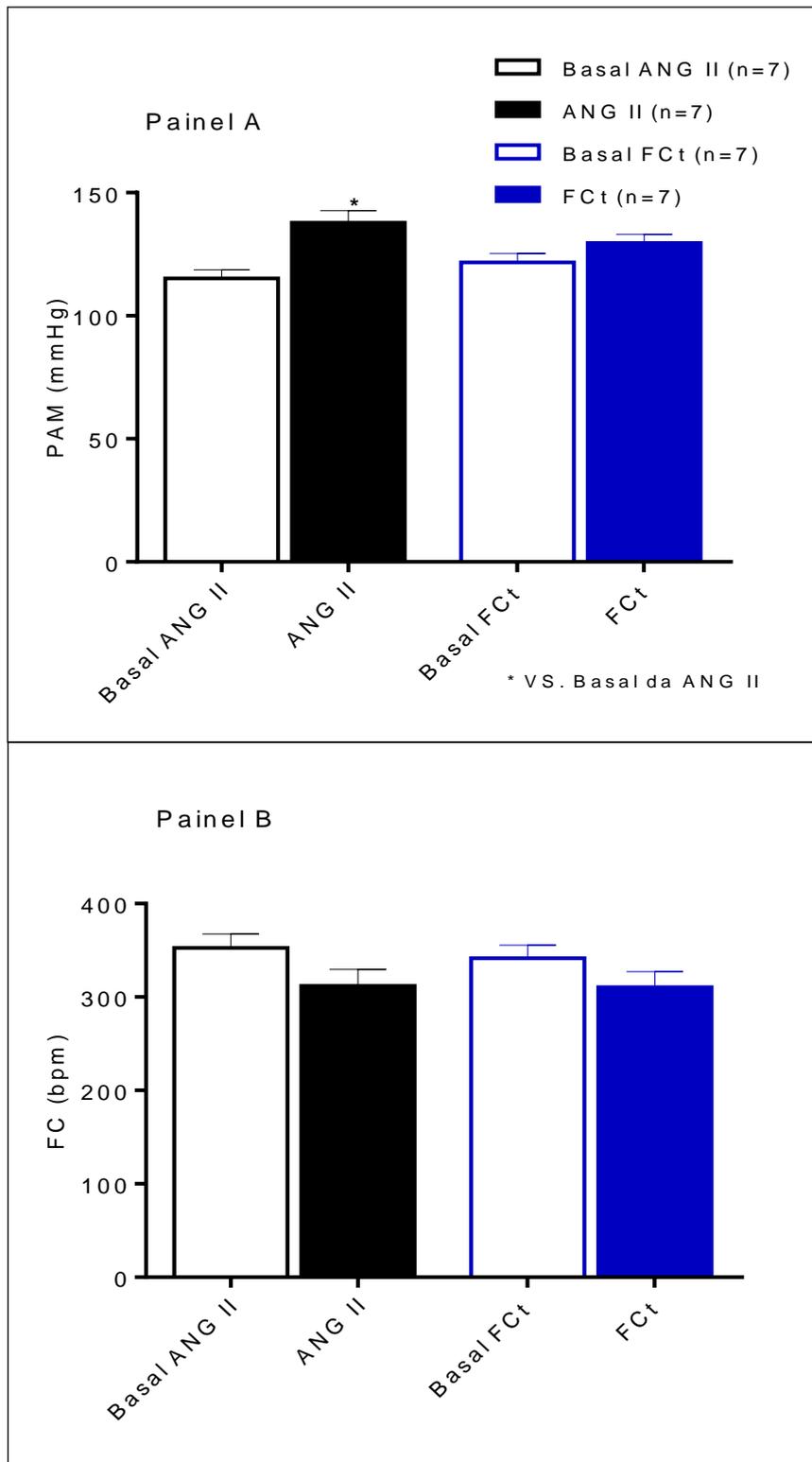


Figura 14: Valores da Pressão Arterial Média [PAM, mmHg (Painel A)] e da Frequência Cardíaca [FC, bpm (Painel B)] basais dos animais antes e após a microinjeção icv de ANG II (50 ng/0.5 μ l) ou FCt (41 μ g/0.5 μ l) no VL de ratos não anestesiados. Os dados foram expressos como MÉDIAS \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. Basal da ANG II.

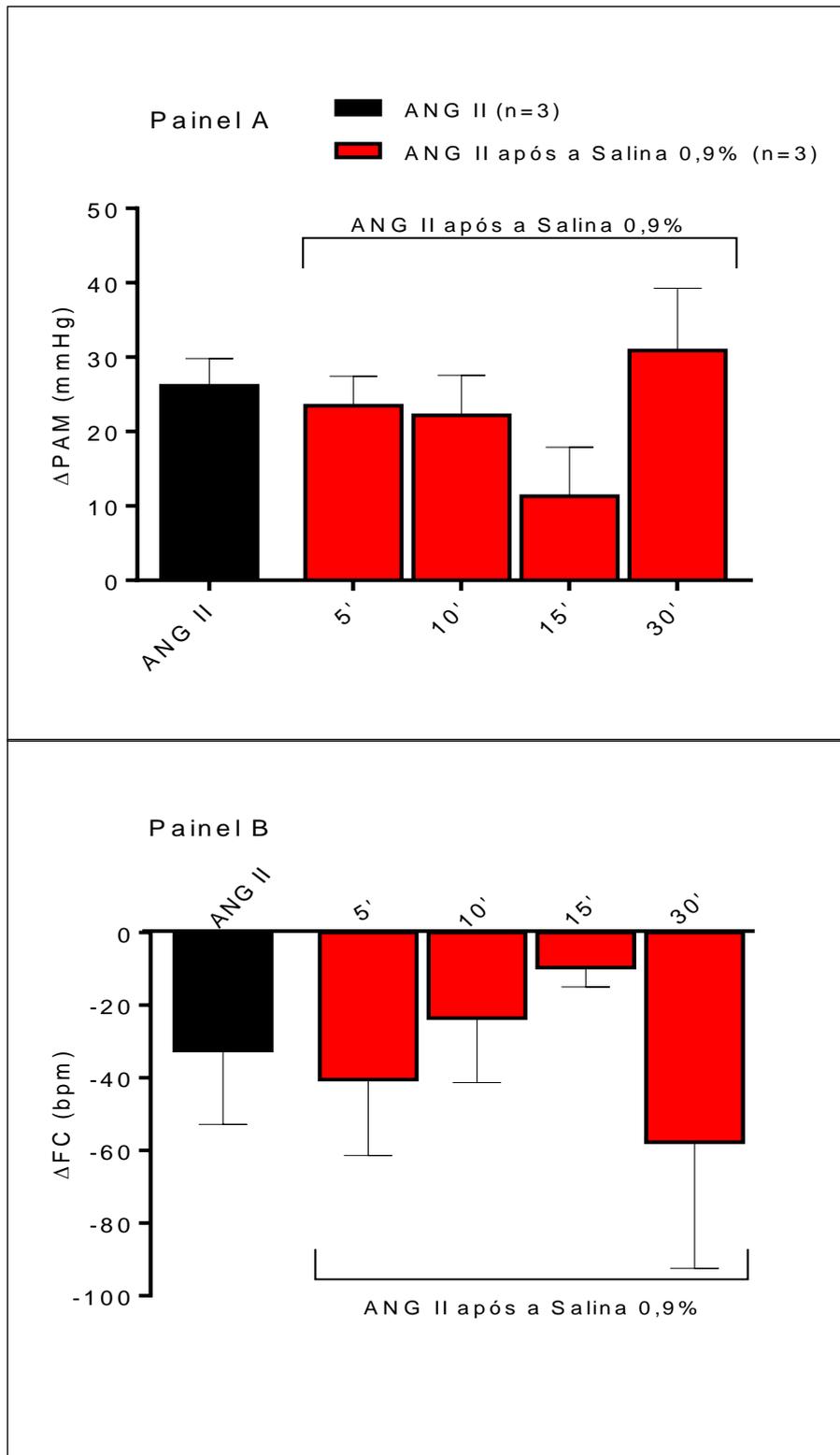


Figura 15: Variação da pressão arterial média [Δ PAM, mmHg (Painel A) e da frequência cardíaca basais [Δ FC, bpm (Painel B) à microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 μ l) antes e aos 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção icv de Salina estéril 0,9% no VL de ratos não anestesiados. Os dados foram expressos como MÉDIAS \pm EPM.

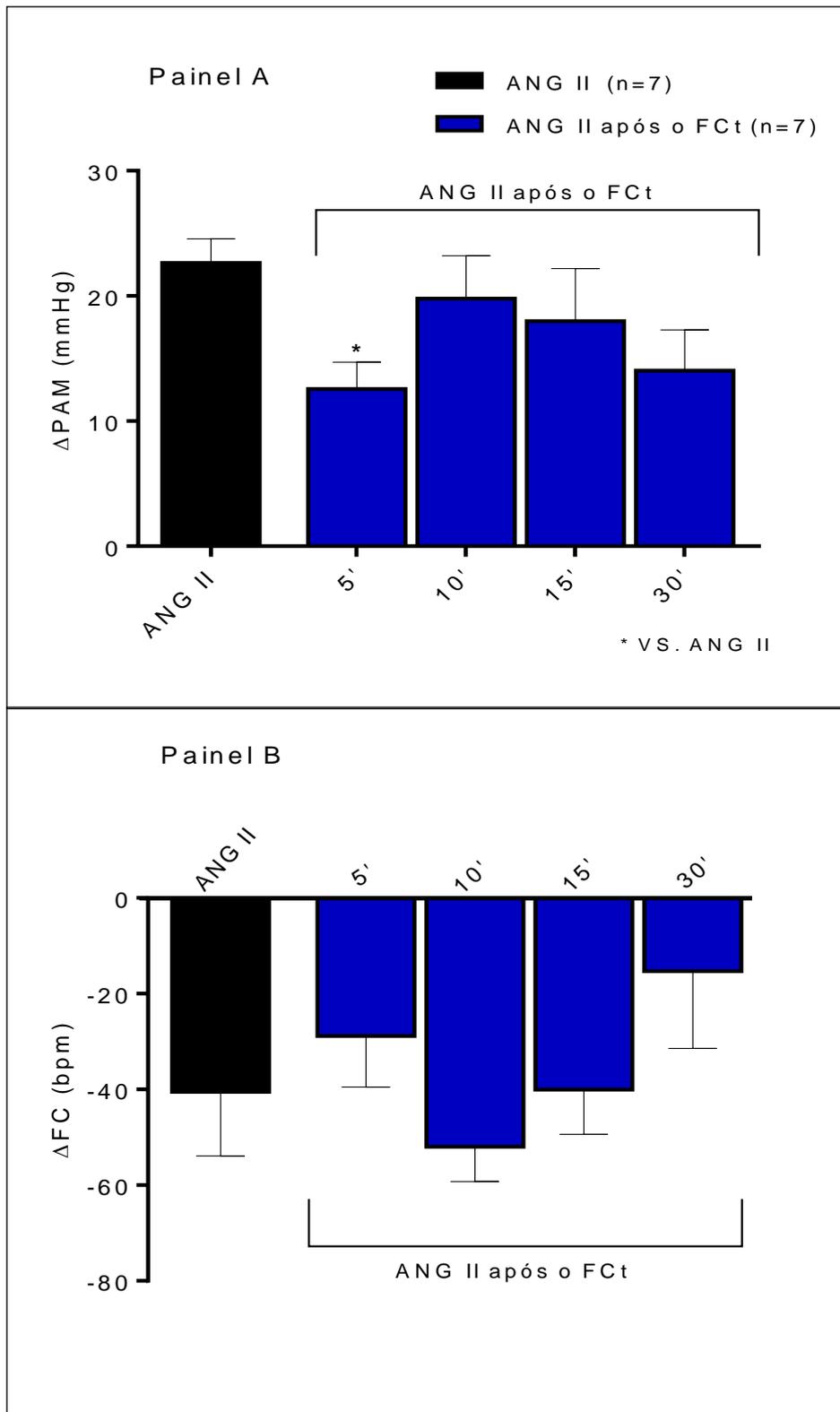


Figura 16: Variação da pressão arterial média [ΔPAM , mmHg (Painel A) e da frequência cardíaca basais [ΔFC , bpm (Painel B) à microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 μ l) antes e aos 5, 10, 15 e 30 minutos após a microinjeção icv de FCt (41 μ g/0.5 μ l) no VL de ratos não anestesiados. Os dados foram expressos como MÉDIAS \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. ANG II.

Tabela 3: Valores da pressão arterial média [PAM, mmHg], e da frequência cardíaca [FC, bpm] basais antes e após a microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl), Salina estéril 0,9% e FCt (41 µg/0.5 µl) e a variação da Pressão arterial média [Δ PAM, mmHg], e da Frequência Cardíaca [Δ FC, bpm] à microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl) antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após a microinjeção icv de Salina estéril 0,9% ou FCt (41 µg/0.5 µl) no VL de ratos não anestesiados. Os dados mostram as MÉDIAS \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. Basal ANG II, # $p < 0,05$ vs. ANG II.

Valores basais da PAM e FC antes e após as microinjeções de ANG II, Salina 0,9% e FCt					
Microinjeções	PAM (mmHg)	FC (bpm)	Microinjeções	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Basal ANG II	118,3 \pm 4,5	357,9 \pm 7,9	Basal ANG II	115,1 \pm 3,5	352,4 \pm 15
ANG II	144,5 \pm 5,7*	325,4 \pm 12,3	ANG II	137,8 \pm 4,9*	311,7 \pm 37,9
Basal Salina 0,9%	129,1 \pm 1,8#	340,3 \pm 12,7	Basal FCt	121,7 \pm 3,6	341,3 \pm 14
Salina 0,9%	131,4 \pm 0,6#	331 \pm 25	FCt	129,6 \pm 3,4	310,4 \pm 16,7

Variações da resposta pressora e da FC à ANG II antes e após a Salina 0,9% ou FCt					
Microinjeções antes e após a Salina 0,9%	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)	Microinjeções antes e após o FCt	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)
ANG II	26 \pm 3,6	-32,5 \pm 20,3	ANG II	22,6 \pm 1,9	-40,5 \pm 13,4
5'	23,4 \pm 3,9	-40,4 \pm 20,9	5'	12,6 \pm 2,1#	-28,8 \pm 10,7
10'	22,2 \pm 5,3	-9,3 \pm 5,3	10'	19,8 \pm 3,4	-51,9 \pm 7,3
15'	11,3 \pm 6,3	-12,3 \pm 8	15'	19,9 \pm 4,2	-40 \pm 9,3
30'	30,9 \pm 8,3	-57,7 \pm 34,	30'	14 \pm 3,2	-15,3 \pm 16,1

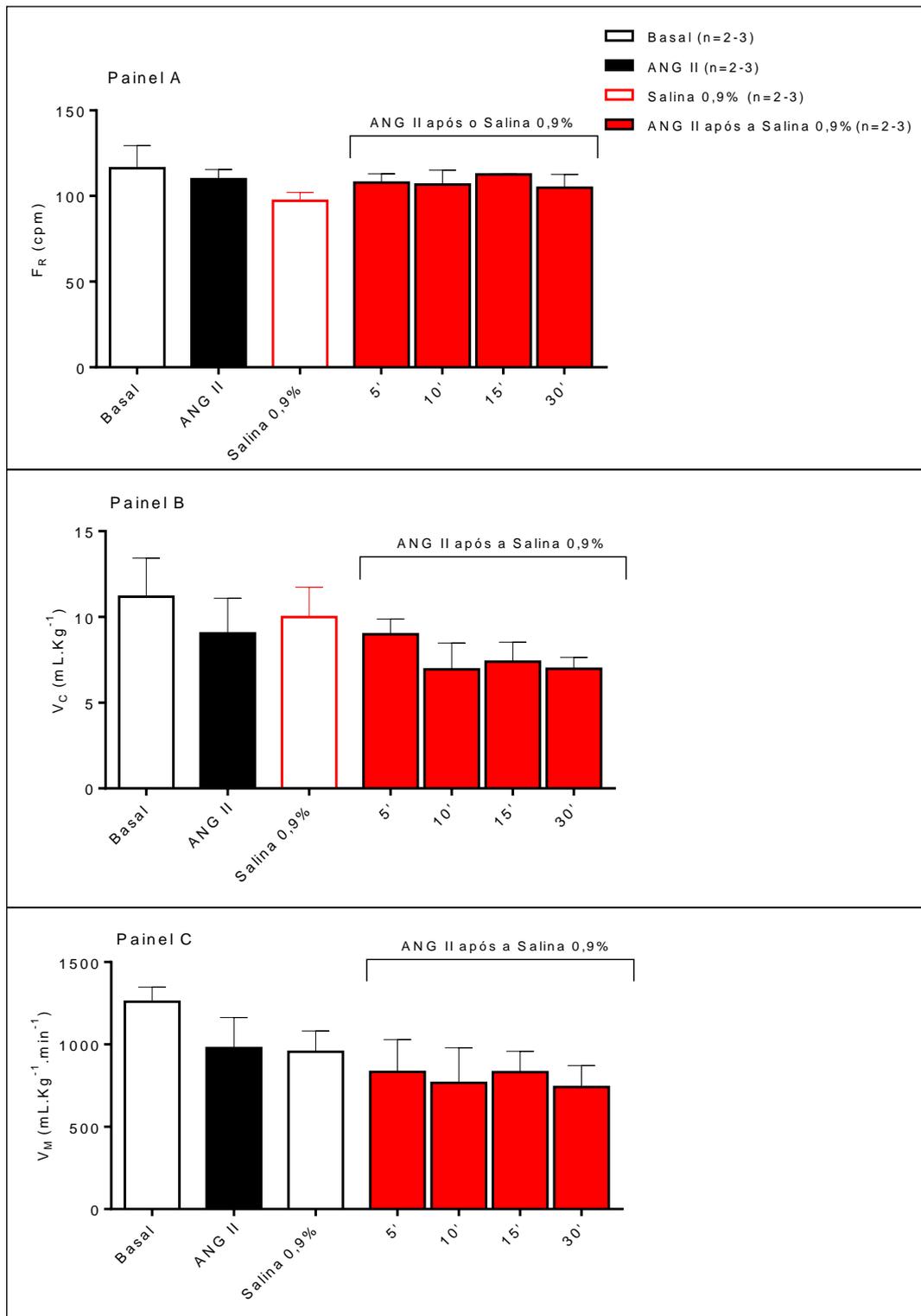


Figura 17: Frequência respiratória [F_R , cpm (Painel A)], volume corrente [V_C , mL.Kg⁻¹.m (Painel B)] e V_M , Ventilação/min. [mL.Kg⁻¹.min⁻¹.m (Painel C)] à microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 μ l), antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após a microinjeção de Salina estéril 0,9% no VL de ratos não anestesiados. Os dados foram expressos como MÉDIAS \pm EPM.

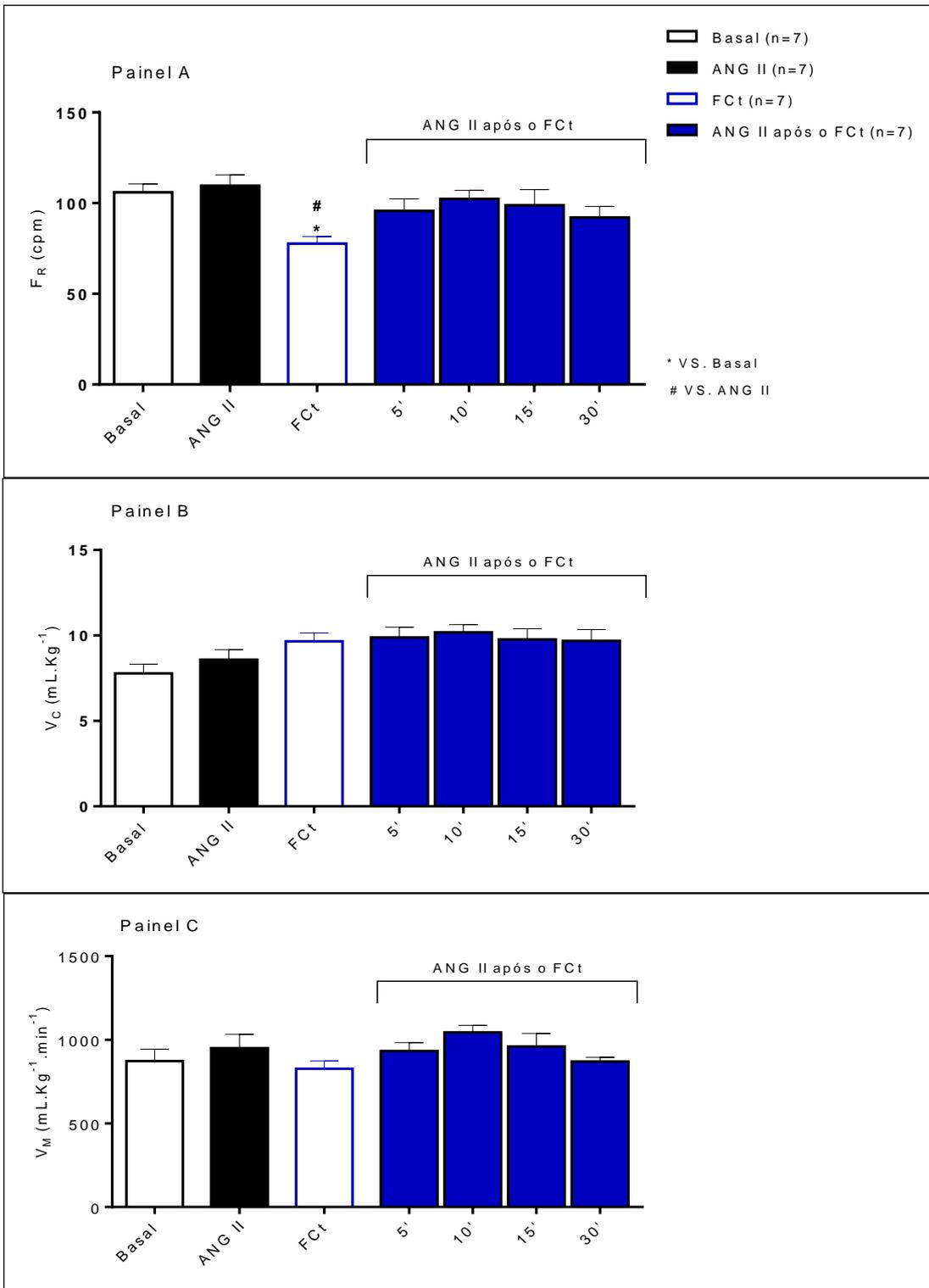


Figura 18: Frequência respiratória [F_R , cpm (Painel A)], volume corrente [V_C , mL.Kg⁻¹m (Painel B)] e V_M , Ventilação/min. [mL.Kg⁻¹.min⁻¹m (Painel C)] à microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 μ l) antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após a microinjeção de FCt (41 μ g/0.5 μ l) no VL de ratos não anestesiados. Os dados foram expressos como MÉDIAS \pm EPM. * $p < 0.05$ vs. Basal, # $p < 0.05$ vs. ANG II.

Tabela 4: Frequência Respiratória [F_R , cpm], Volume Corrente [V_C , mL.Kg⁻¹] e Ventilação [V_M , mL.Kg⁻¹.min⁻¹] à microinjeção de ANG II (50 ng/0.5 µl) antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após a microinjeção de Salina estéril 0,9% ou FCt (41 µg/0.5 µl) no VL de ratos não anestesiados. Os dados mostram as MÉDIAS ± EPM. * $p < 0.05$ vs. Basal, # $p < 0,05$ vs. ANG II.

Valores à microinjeção de ANG II antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após a Salina estéril 0,9%			
Registro	F_R (cpm)	V_C (mL.Kg ⁻¹)	V_M (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)
Basal	116,2 ± 13,2	11,2 ± 2,2	1260 ± 87,3
Ang II	109,8 ± 5,5	9 ± 2,1	978,5 ± 184,3
Salina 0,9%	97,2 ± 4,7	9,9 ± 1,7	955,4 ± 126,8
5'	107,9 ± 5,1	8,9 ± 0,9	832,9 ± 196,1
10'	106,7 ± 8,2	6,9 ± 1,5	767,3 ± 212,3
15'	112,5 ± 0,3	7,4 ± 1,1	832 ± 126
30'	104,8 ± 7,7	6,9 ± 0,6	742,4 ± 128,9

Valores à microinjeção de ANG II antes e aos 5, 10, 15 e 30 min. após o FCt			
Registro	F_R (cpm)	V_C (mL.Kg ⁻¹)	V_M (mL.Kg ⁻¹ .min ⁻¹)
Basal	105,9 ± 4,6	7,8 ± 0,7	873,5 ± 86,7
Ang II	109,6 ± 5,9	8,6 ± 0,7	950,7 ± 98,2
FCt	77,7 ± 3,8*#	9,7 ± 0,6	827,2 ± 57,3
5'	95,6 ± 6,7	9,9 ± 0,7	933,2 ± 59,7
10'	102,3 ± 4,7	10,2 ± 0,5	1044 ± 50,2
15'	98,8 ± 8,7	9,8 ± 0,7	960,2 ± 92,8
30'	92 ± 6,2	9,7 ± 0,8	870,5 ± 31,1

6. DISCUSSÃO

6.1. *Papel da glia astrocítica da lâmina terminal nas respostas neuroendócrinas observadas após a microinjeção de ANG II no VL de ratos não anestesiados*

Corroborando com dados anteriores da literatura, no presente estudo, nós observamos que a microinjeção de icv de ANG II promove aumento significativo na concentração de AVP e OT plasmáticas em ratos não anestesiados (Keil e cols., 1975, Lang e cols., 1981; Davisson e cols., 2000, Reis cols., 2008; 2010). Em adição, estudos *in vitro* observaram que a ANG II promove aumento significativo na amplitude das correntes excitatórias vasopressinérgicas e ocitocinérgicas pós-sinápticas observadas após a estimulação elétrica do OVLT (Stachniak e cols., 2014). Na sequência, nossos resultados mostraram que a microinjeção de FcT no VL não promoveu alterações significativas na concentração de AVP plasmática, entretanto promoveu redução significativa na resposta de aumento na concentração de AVP plasmática observado após a microinjeção de ANG II no VL, demonstrando que as células da glia da lâmina terminal participam da resposta de liberação de AVP plasmática induzida pela ANG II. Nesse contexto, estudos recentes do nosso laboratório observaram que a ANG II promove uma redução significativa na expressão do RNAm para os transportadores de glutamato astrocíticos, bem como reduz a recaptação de glutamato em cultura de astrócitos do hipotálamo, sugerindo que a ANG II poderia atuar promovendo aumento na disponibilidade do glutamato no meio extracelular, o qual por sua vez, atuaria aumentando a excitabilidade dos neurônios magnocelulares hipotalâmicos (Cruz et al., 2013; Ruginsk e cols., 2015). Corroborando com os dados do nosso laboratório, estudos de Fleming e cols., (2011) mostraram que a inibição dos transportadores de glutamato astrocíticos, induz aumento significativo nas correntes excitatórias pós-sinápticas, mediadas pelo agonista glutamatérgico NMDA, em neurônios magnocelulares do SON. Nesse contexto, nós sugerimos que a ANG II na lâmina terminal do hipotálamo promoveria redução na expressão dos transportadores de glutamato astrocíticos, induzindo aumento na disponibilidade do glutamato no meio extracelular, o qual atuaria aumentando a excitabilidade dos neurônios vasopressinérgicos do PVN e/ou SON, facilitando a síntese e/ou liberação plasmática desse neuropeptídeo.

Nossos resultados mostraram que a inibição da atividade das células da glia da lâmina terminal promove aumento significativo na concentração de OT plasmática.

Corroborando com nossos achados, estudos de Di e cols., (2013) mostraram que o FcT promove uma redução significativa nas correntes inibitórias pós-sinápticas evocadas em neurônios do SON. Sabendo-se que mais de 45% de todas as sinapses hipotalâmicas são imunorreativas ao GABA (Decavel e Van den Pol 1990) e que astrócitos podem liberar GABA tonicamente, pelo canal iônico Bestrophin 1 [(Best 1) Lee e cols., 2010] e além disso, considerando os estudos de Ham e cols., (2012), os quais sugerem que em condições basais, os neurônios OTérgicos encontra-se sob inibição GABAérgica, nós sugerimos que em condições basais, os astrócitos hipotalâmicos da lâmina terminal atuam inibindo tonicamente a atividade dos neurônios OTérgicos hipotalâmicos, por uma liberação tônica de GABA e/ou promovendo aumento na recaptação de glutamato do espaço extracelular. Na sequência, nós observamos que a inibição da glia não promove alterações significativas no aumento da OT plasmática observado após a microinjeção de ANG II no VL de ratos não anestesiados.

Estudos de Stachniak e cols., (2014) sugerem que a estimulação dos osmorreceptores da região do OVLT promove a liberação de glutamato no SON, o qual na presença de ANG II promove aumento na frequência de disparos dos neurônios vasopressinérgicos (AVPérgicos). Por outro lado, o mesmo estudo demonstrou que na presença de ANG II no SON, após o estímulo dos osmorreceptores da região do OVLT, houve diminuição na frequência de disparos dos neurônios ocitocinérgicos (OTérgicos), sugerindo que a ANG II modula, por mecanismos distintos, a transmissão sináptica dos neurônios pré-sinápticos oriundos da lâmina terminal aos neurônios AVPérgicos e OTérgicos do SON. Em adição, outro estudo mostrou que a inibição dos receptores GABAérgicos, subtipo GABA_A no PVN ou SON de ratos, promoveu redução significativa na atividade dos neurônios AVPérgicos e aumento na atividade dos neurônios OTérgicos, os autores sugerem que essa diferença na neurotransmissão GABAérgica sobre os neurônios AVPérgicos e OTérgicos do SON está relacionada a expressão dos transportadores de cloreto na membrana celular (Ham e cols., 2012). Os estudos de Stachniak e cols., (2014) e de Ham e cols., (2012) sugerem que os neurônios AVPérgicos e OTérgicos hipotalâmicos são modulados por mecanismos pré e pós-sinápticos distintos, além disso, é interessante ressaltar que os estudos de Ham e cols., (2012) sugerem que em condições basais, os neurônios OTérgicos encontra-se sob inibição GABAérgica. Nesse contexto, Potapenko e cols., (2013) demonstraram o bloqueio dos transportadores de glutamato do SON, promove aumento das correntes inibitórias pós-sinápticas moduladas por GABA. Os autores sugerem que a

excitabilidade dos neurônios magnocelulares do SON é modulada por um balanço dinâmico entre *inputs* pré-sinápticos excitatórios (glutamato) e inibitórios (GABA), os quais são modulados por astrócitos adjacentes, em outras palavras, os estudos de Potapenko e cols., (2013) sugerem a participação dos astrócitos hipotalâmicos na modulação da atividade dos neurônios magnocelulares neurosecretórios.

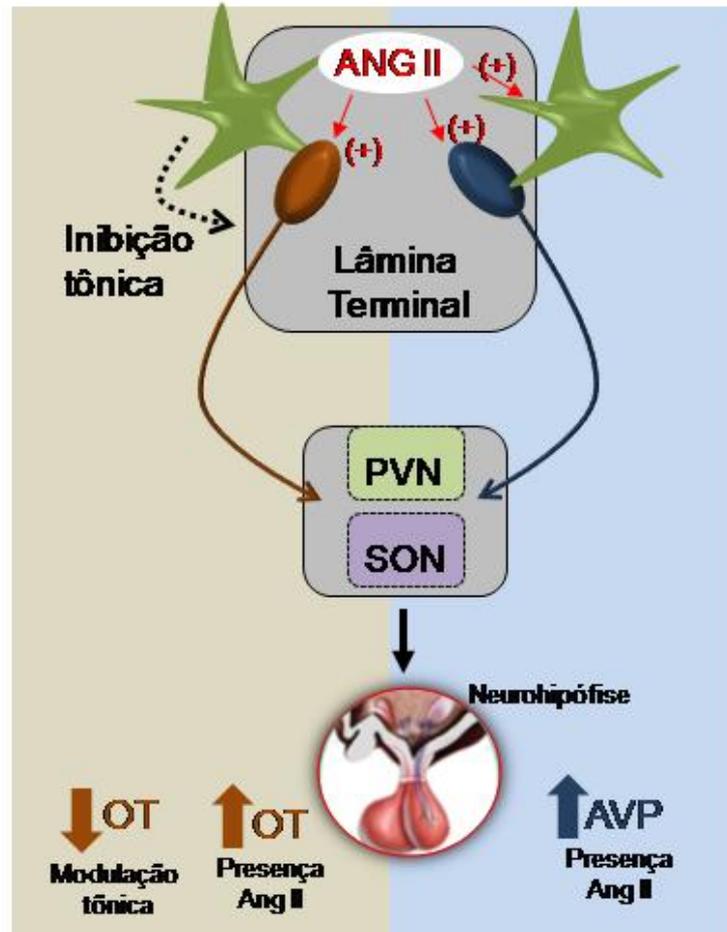


Figura 19: Participação das células da glia da região da lâmina terminal na inibição tônica da liberação de OT plasmática e na modulação da liberação de AVP plasmática induzida pela ANG II no VL. SFO: Órgão Subfornical, MnPO: Núcleo Pré-óptico Mediano, OVLT: Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal, PVN: Núcleo Paraventricular, SON: Núcleo Supraóptico.

Nossos resultados nos permitem sugerir que: a) as células da glia da região da lâmina terminal exercem uma modulação tônica inibitória sobre os neurônios locais com projeções aos neurônios OTérgicos do PVN/SON; b) A ANG II atuando em células da glia da região da lâmina terminal no hipotálamo modula a atividade de neurônios locais com projeções ao PVN/SON induzindo aumento na concentração de AVP plasmática (Figura 19).

6.2. Papel dos astrócitos hipotalâmicos nas respostas comportamentais observadas após a microinjeção de ANG II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados

Corroborando com estudos anteriores da literatura, o presente estudo mostrou que a Ang II no VL de ratos não anestesiados promoveu aumento significativo no comportamento de ingestão de água e sódio (Buggy e Fisher 1974; Beresford e Fitzsimons 1992; Reis e cols., 2008 e 2010; Luca e cols., 2010; Roncari e cols., 2011). Diferentes estudos sugerem que o comportamento de ingestão de água e sódio observados após a privação hídrica ou ANG II no VL, são modulados por receptores AT¹ localizados na região da lâmina terminal (Beresford e Fitzsimons 1992; Roncari e cols., 2011; Matsuda e cols., 2016). O comportamento de ingestão de água e sódio envolve a participação de uma via inibitória modulada por projeções diretas ou indiretas entre o SFO e NPBL (Menani e Johnson 1995; Colombari e cols., 1996; Roncari e cols., 2001). Além disso, a ANG II na região da lâmina terminal parece diminuir a influência da via tônica de modulação da sede e ingestão de sódio, visto que a microinjeção de losartan (antagonista AT¹) no VL diminui a resposta de ingestão de água e sódio induzida pela microinjeção de muscimol (agonista GABA_A) ou methilsergine (inibidor dos receptores serotoninérgicos 5-HT^{1/2}) no LPBN (Menani e Johnson 1995; Roncari e cols., 2001).

Nossos resultados foram os primeiros a mostrar que a inibição da atividade das células da glia da região da LT atenua a ingestão de sódio, sugerindo que as células da glia hipotalâmica estão envolvidas na regulação tônica da modulação de ingestão ao sódio. Estudos de Zielke e cols., (2007) demonstraram que a perfusão de FCt por microdiálise no sistema ventricular aumenta a quantidade intersticial de lactato e diminui os níveis de glutamato e glutamina, uma vez que a inibição do metabolismo glicolítico estimula os astrócitos a entrarem em metabolismo oxidativo. Ainda nesse contexto, estudos eletrofisiológicos de Shimizu e cols., (2007) demonstraram que o lactato, assim como o Na⁺, aumenta a frequência de disparo de neuronios gabaérgicos do SFO, no entanto essa resposta não foi observada em animais *knockout* para canais sensíveis ao sódio em astrócitos (Na_x), sugerindo que os canais Na_x de astrócitos do SFO são importantes para liberar lactato e ativar neurônios inibitórios gabaérgicos locais. Adicionalmente, em estudos comportamentais desse mesmo grupo (Hiyama e cols., 2004) foi observado que animais *knockout* para Na_x perdiam a aversão ao sódio após privação hídrica (48 h). Em conjunto, estes estudos levantam indícios de que o lactato liberado por astrócitos sensíveis ao sódio (que expressam Na_x) aumenta a atividade de interneurônios gabaérgicos locais, os quais podem estar envolvidos na modulação da via

tônica inibitória do comportamento de ingestão de sódio (Iadecola 2007; Shimizu e cols., 2007; Hiyama e Noda 2016).

Na sequência nossos resultados mostraram que a inibição da atividade da glia não promoveu alterações significativas na ingestão de água observada após a ANG II icv, entretanto promoveu uma redução significativa na resposta de ingestão de sódio, sugerindo que as células da glia da lâmina terminal hipotalâmica estão envolvidas, na resposta comportamental de ingestão de sódio observada após a microinjeção de ANG II no VL. Corroborando com nossos resultados, estudos de Matsuda e cols., (2016) demonstraram que camundongos *knockout* para receptor AT^{1a} diminuíam a ingestão de sódio, mas mantinham a ingestão de água em resposta à desidratação (48 h). Os autores sugerem que a ingestão de sódio é completamente e a de água parcialmente dependente da ativação de $AT^{1a}R$. Adicionalmente, para entender a relação entre Na_x e ANG II, Matsuda e cols., (2016) induziram a privação hídrica (48 h) em camundongos *knockout*: Na_x -KO, AT^{1a} -KO e Na_x - AT^{1a} -KO (duplo *knockout*), e observaram que camundongos Na_x -KO apresentavam aumento da ingestão de sódio, em contraste, os animais AT^{1a} -KO e Na_x - AT^{1a} -KO apresentaram abolição dessa resposta, indicando que os sinais de Na_x parecem ser maiores quando sob controle da ingestão de sódio induzido pelo receptor AT^{1a} . Nesse sentido, embora evidências mostrem a presença dos receptores AT^1 de ANG II nos osmorreceptores neuronais na região dos OCV's, a presença de AT^1 em osmorreceptores astrocíticos, bem como o seu papel na modulação neuroendócrina e comportamental do balanço hidroeletrólítico, permanecem por ser elucidadas.

Considerando: I) a presença de receptores do tipo AT^1 em neurônios e astrócitos da região AV3V e do SFO (Raizada e cols., 1987; Gebke e cols., 1998; Fitzsimons 1998; Davisson 2003); II) que os astrócitos da região circumventricular são osmosensores (Iadecola 2007; Shimizu e cols., 2007; Matsuda e cols., 2016); III) e que a ANG II na região da LT diminui a excitabilidade tônica de neurônios inibitórios do NPBL a LT, promovendo aumento na ingestão de água e sódio (Roncani e cols., 2011). Nós sugerimos que a ANG II promove a ativação de células da glia da região da lâmina terminal: a) aumentando a excitabilidade de neurônios que se projetam à porção de interneurônios gabaérgicos inibitórios do LPBN, os quais, por sua vez, diminuem a excitabilidade da via inibitória do LPBN ao CeA e sistema límbico, favorecendo a ingestão de sódio. b) ou diminuindo os mecanismos serotoninérgicos do LPBN (Figura 20).

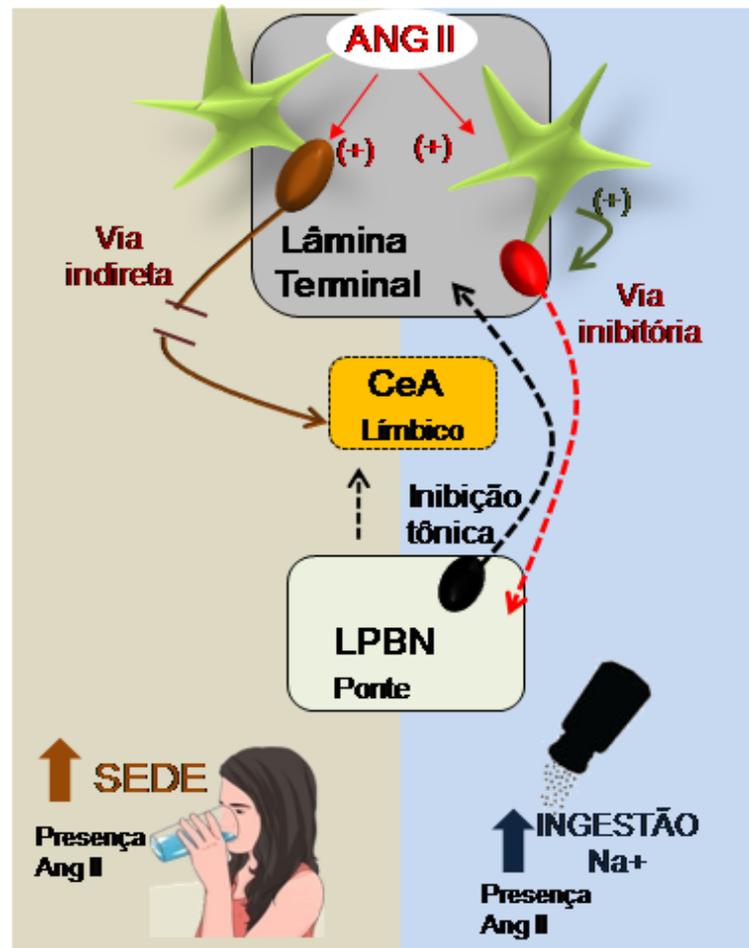


Figura 20: Participação das células da glia da região da lâmina terminal exercendo tanto efeito estimulatório tônico sobre a ingestão de sódio, quanto efeito estimulatório em resposta a ANG II no VL. Por outro lado, a modulação do comportamento de sede induzido pela ANG II parece ser mediada principalmente por neurônios da LT. CeA: Núcleo central da amígdala, LPBN: Núcleo Parabraqueal Lateral.

6.3. Papel dos astrócitos hipotalâmicos nas respostas cardio-respiratórias observadas após a microinjeção de ANG II no ventrículo lateral de ratos não anestesiados

Corroborando com estudos anteriores da literatura, nossos resultados mostraram que a ANG II no VL promove aumento significativo na PAM basal de ratos não anestesiados sem alterações significativas na frequência cardíaca basal (Davisson 2000; Reis e cols., 2010; Yu e cols., 2015). Estudos de Bains e cols., (1992) observaram que a ANG II periférica ativa neurônios do SFO, os quais enviam projeções angiotensinérgicas ao PVN. O mesmo grupo de pesquisadores ainda demonstrou que a Ang II periférica,

atuando em neurônios do SFO, ativa projeções excitatórias aos neurônios pré-simpáticos do PVN parvocelular, promovendo resposta simpatoexcitatória de longa duração, a qual é modulada pela via SFO-PVN-MIL (Bains e Ferguson 1995). Em adição, estudos de Cato e Toney (2005) demonstram que a ANG II ativa neurônios parvocelulares com projeções ao RVLM, o qual possui neurônios com atividade de marco passo que estão envolvidos no controle do tônus simpático (Sun e Guyenet 1988). Em conjunto, esses estudos demonstram que a ANG II periférica induz ao aumento da atividade simpática e da pressão arterial média pela ativação de vias hipotalâmicas que descendem ao centro de controle cardiovascular no bulbo e/ou diretamente à MIL.

Estudos *in vivo* de Marina e cols., (2013) demonstraram que a estimulação optogênica dos astrócitos da região ventral do bulbo promove a propagação de ondas de cálcio mediadas pelo ATP, o qual é liberado em neurônios pré-simpáticos do grupo C1 (catecolaminérgicos) do RVLM, promovendo aumento significativo na atividade simpática renal, frequência cardíaca e pressão arterial. Os estudos de Marina e cols., (2013) sugerem a participação dos astrócitos bulbares na modulação da atividade simpática renal. Em relação à participação dos astrócitos hipotalâmicos na modulação da PAM basal, estudos de Bardgett e cols., (2014) mostraram que o bloqueio dos transportadores de glutamato com o DL-threo-benzyloxyaspartic acid (TBOA) no PVN de ratos anestesiados promove aumento significativo na atividade simpática renal e na PAM basal, sugerindo a participação dos astrócitos da região do PVN na modulação da atividade simpática e PAM basal. Nossos resultados mostraram que a inibição da glia hipotalâmica da região da LT não promove alterações significativas na pressão arterial basal dos animais. É importante destacarmos que no estudo de Bardgett e cols., (2014) foram realizadas microinjeções diretamente na região do PVN, em ratos anestesiados com uretana e utilizou um bloqueador não específico para astrócitos, uma vez que o TBOA inibe não só as subunidades EAAT¹ e EAAT² dos transportadores de glutamato astrocíticos, mas também a EAAT³ a qual pode ser expressa em neurônios. Nesse contexto, acreditamos que estudos adicionais são requeridos para melhor compreendermos o papel dos astrócitos na modulação na pressão arterial média basal.

Na sequência nossos resultados mostraram que a inibição da glia hipotalâmica promove uma redução significativa na resposta pressora observada após a microinjeção de ANG II no VL de ratos não anestesiados. Nosso estudo é o primeiro a demonstrar que os astrócitos hipotalâmicos da LT estão envolvidos na modulação da resposta pressora induzida pelo estímulo angiotensinérgico central. Estudos de Gebke e cols., (1998)

mostraram que a ANG II induz ondas de Ca^{2+} por meio da ativação de receptores AT^1 localizados em astrócitos da região do SFO ou OVLT. Nesse contexto, estudos de Li e Ferguson (1993) mostraram que o estímulo elétrico do SFO promove aumento na excitabilidade dos neurônios do PVN, essa resposta foi atenuada pela prévia microinjeção de losartan (AT^1 antagonista) no PVN. Essa comunicação astrocítica, via ondas de Ca^{2+} , culmina com a liberação do gliotransmissor ATP, o qual modula localmente a excitabilidade neuronal (Erlichman e cols., 2010). Em adição, estudos recentes de Ferreira-Neto e cols., (2015) demonstraram que neurônios hipotalâmicos que se projetam ao RVLM (PVN-RVLM) liberam ATP provocando simpatoexcitação. Nesse contexto, nós sugerimos que a Ang II atuando em células da glia, incluindo os astrócitos hipotalâmicos promoveria localmente aumento nas ondas de cálcio, culminando em aumento na excitabilidade de neurônios da região da LT com projeções aos neurônios pré-simpáticos do PVN os quais atuariam modulando a pressão arterial diretamente ou via projeções ao RVLM (Figura 21).

Esses resultados, também reforçam a participação das populações de neurônios da LT, uma vez que nos demais tempos analisados, a resposta pressora a ANG II se mantém, sugerindo que qualquer possível efeito da inativação de células da glia do hipotálamo sobre a resposta cardiovascular seja, após alguns minutos, compensado.

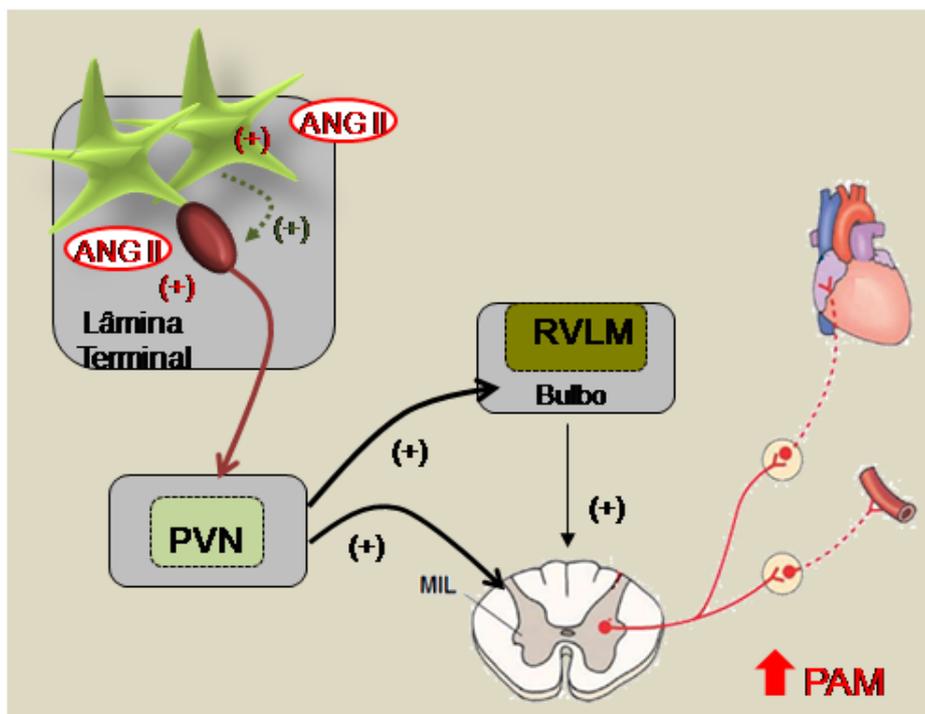


Figura 21: Participação das células da glia e dos neurônios da região da lâmina terminal na modulação das respostas cardiovasculares induzidas pelo estímulo da ANG II no VL. PVN: Núcleo Paraventricular, RVLM: porção rostral ventral do bulbo, MIL: Medula Intermédio Lateral.

Nosso estudo foi o primeiro a observar que a microinjeção de Ang II no VL não promove alterações significativas na frequência respiratória, no volume corrente ou na ventilação minuto de ratos não anestesiados com livre movimentação. Estudos recentes de Zubcevic e cols., (2013) demonstraram que o tratamento com infusão de ANG II no VL (por 7 dias) alterava o padrão de atividade do nervo frênico durante a fase P-I, típica do acoplamento simpático-respiratório, demonstrando que a ativação crônica dos receptores angiotensinérgicos na LT parece participar do acoplamento simpático-respiratório promovendo alteração no padrão respiratório. É importante destacar que a ativação crônica da ANG II nessas regiões hipotalâmicas aumenta a expressão de receptores AT¹, e conseqüentemente, a sensibilidade a ANG II plasmática (Wei e cols., 2009). Nesse sentido, o efeito ventilatório pode ser resultado da alteração da sensibilidade dos receptores AT¹ a ANG II.

Corroborando com os nossos achados, Walker e Jennings (1996) não observaram alterações na ventilação promovidas pela ANG II intravenosa em ratos não anestesiados. Considerando que a ANG II parece exercer efeitos ventilatórios por mecanismos diferentes, nós sugerimos que a ANG II no VL não participa da modulação da atividade respiratória basal em ratos não anestesiados.

Como descrito anteriormente, é sabido que o SFO e o PVN podem influenciar o *drive* respiratório (Ferguson e cols., 1988; Schlenker e cols., 2001; Yeh e cols., 1997) e que essas regiões hipotalâmicas tem projeções para o preBotC, RTN (região ventral do bulbo) e NMF (Yeh e cols., 1997; Swanson e Sawchenko 1983; Kc e cols., 2002), nesse sentido, embora haja diferentes estudos mostrando a participação de astrócitos da região ventral bulbo na modulação da ventilação, especialmente em situações de hipóxia ou hipercapnia (Pasti e cols., 1997; Gourine e cols., 2005; Erlichman e cols., 2010; Huxtable e cols., 2010), nossos resultados mostraram em animais não anestesiados que as células da glia do hipotálamo participam tonicamente da modulação da frequência respiratória basal. Corroborando com estes resultados, estudos recentes sugerem a participação da glia da região ventral do bulbo na ritmogênese respiratória, posto que, tanto a inibição da sua atividade com fluorocitrato (FCt), quanto a inibição da glutamina sintetase (enzima importante para síntese de glutamato sendo sintetizada e liberada por astrócitos) diminuem a atividade ritmica de neurônios da região do pré-Bötzinger (Hülsmann e cols., 2000). Nós sugerimos que as células da glia hipotalâmicas, incluindo os astrócitos hipotalâmicos, estão envolvidas na manutenção da frequência respiratória basal em ratos não anestesiados (Figura 22).

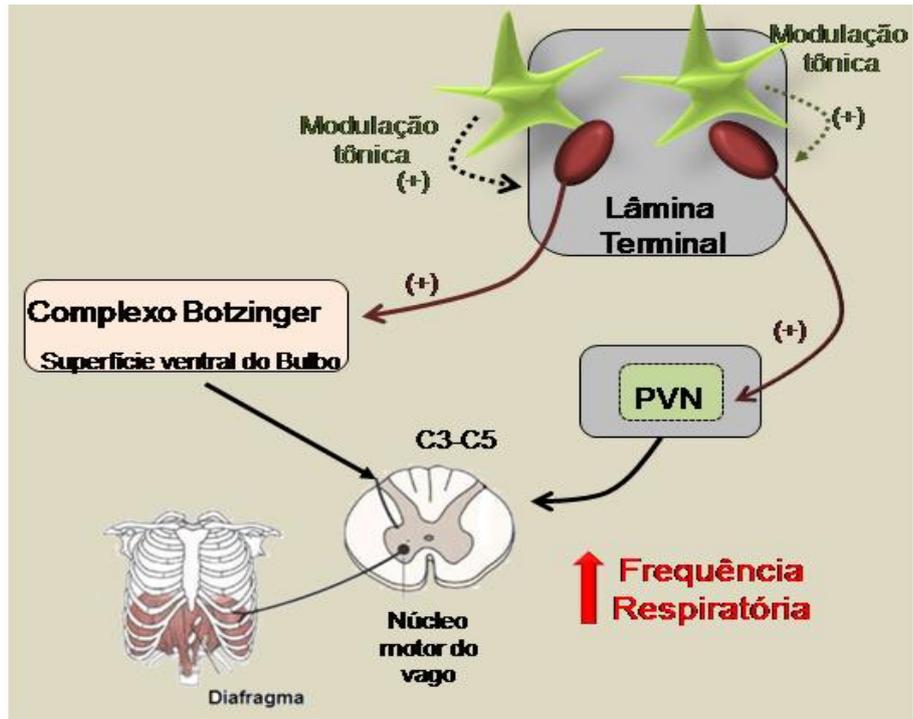


Figura 22: Participação das células da glia da região da lâmina terminal na modulação tônica da atividade rítmica respiratória (F_R) por efeito estimulatório das vias neuronais envolvidas na respiração, cujo efeito não é observado na presença da ANG II no VL. PVN: Núcleo Paraventricular.

7. CONCLUSÕES

Nossos resultados nos permitem concluir que as células da glia da lâmina terminal hipotalâmica estão envolvidas na modulação tônica inibitória da liberação de OT plasmática e na modulação tônica da ingestão de sódio, bem como na modulação da frequência respiratória basal. Além disso, as células da glia da lâmina terminal hipotalâmica estão envolvidas na modulação das respostas neuroendócrinas de liberação de AVP plasmática, comportamental de ingestão de sódio e pressora induzidas pelo estímulo da ANG II no ventrículo lateral.

8. REFERÊNCIAS

- Abbott SB, Stornetta RL, Socolovsky CS, West GH, Guyenet PG. (2009). Photostimulation of channelrhodopsin-2 expressing ventrolateral medullary neurons increases sympathetic nerve activity and blood pressure in rats. **J. Physiol.** 587(23), 5613–5631.
- Abdala AP, Rybak IA, Smith JC, Paton JF. (2009a). Abdominal expiratory activity in the rat brainstem-spinal cord in situ: patterns, origins and implications for respiratory rhythm generation. **J Physiol.** 587(14), 3539-3559.
- Abdala APL, Rybak IA, Smith JC, Zoccal DB, Machado BH, St-John WM, Paton JFR. (2009b). Multiple pontomedullary mechanisms of respiratory rhythmogenesis. **Respiratory Physiology and Neurobiology.** 168(1-2), 19-25.
- Accorsi-Mendonça D, da Silva MP, Souza GM, Lima-Silveira L, Karlen-Amarante M, Amorim MR, Almado CE, Moraes DJ, Machado BH. (2016). Pacemaking Property of RVLM Presympathetic Neurons. **Front Physiol.** 22(7)424.
- Albrecht D, Hellner K, Walther T, Von-Bohlen OVB. (2003). Angiotensin II and amygdala. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** 985, 498-500.
- Alexander IE, Lumbers ER. (1981). The effects of angiotensin on respiratory patterns of anaesthetized dogs. **Respiration Physiology.** 46(3), 261-270.
- Amendt K, Czachurski J, Dembowski K, Seller H. (1979). Bulbospinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. **J.Auton. Nerv. Syst.** 1, 103–107.
- Andersson B, McCann SM. (1955a). Drinking, antidiuresis and milk ejection from electrical stimulation within the hypothalamus of the goat. **Acta Physiol Scand.** 35(2), 191-201.
- Andersson B, McCann SM. (1955b). A further study of polydipsia evoked by hypothalamic stimulation in the goat. **Acta Physiol Scand.** 33(4), 333-346.
- Antunes-Rodrigues J, Picanço-Diniz DLW, Valençã MM, McCann SM. (2005). Controle Neuroendócrino da homeostase de fluidos corporais *in: Neuroendocrinologia Básica e Aplicada*: Antunes-Rodrigues J, Moreira AC, Elias LLK, Castro M. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ.
- Armstrong WE, Smith BN, Tian M. (1994). Electrophysiological characteristics of immunochemically identified rat oxytocin and vasopressin neurones in vitro. **Journal of Physiology.** 5(11), 1931–1958.
- Bains JS, Potyok A, Ferguson AV. (1992). Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ. **Brain Res.** 599, 223–229.
- Bains JS, Ferguson AV. (1995). Paraventricular nucleus neurons projecting to the spinal cord receive excitatory input from the subfornical organ. **Am J Physiol.** 268, 625-633.
- Bardgett ME, Chen QH, Guo Q, Calderon AS, Andrade MA, Toney GM. (2014). Coping with dehydration: sympathetic activation and regulation of glutamatergic transmission in the hypothalamic PVN. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 306(11), 804-813.
-

- Barney CC, Threatte RM, Fregly MJ. (1983) Water deprivation-induced drinking in rats: role of angiotensin II. **Am J Physiol.** 244(2), 244-248.
- Bartlett DJ, Tenney SM. (1970). Control of breathing in experimental anemia. **Respir Physiol.** 10(3), 384-95.
- Beresford MJ, Fitzsimons JT. (1992). Intracerebroventricular angiotensin II-induced thirst and sodium appetite in rat are blocked by the AT1 receptor antagonist, Losartan (DuP 753), but not by the AT2 antagonist, CGP 42112B. **Experimental Physiology.** 77(5), 761–764.
- Biancardi VC, Son SJ, Ahmadi S, Filosa JA, Stern JE. (2014). Circulating angiotensin ii gains access to the hypothalamus and brain stem during hypertension via breakdown of the blood–brain barrier. **Hypertension.** 63(3), 572-579.
- Bickerton RK, Buckley JP. (1961). Evidence for a central mechanism in angiotensin induced hypertension. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.** 106(4), 834-836.
- Bonis JM, Neumueller SE, Krause KL, Pan LG, Hodges MR, Forster HV. (2013). Contributions of the Kölliker-Fuse nucleus to coordination of breathing and swallowing. **Respir Physiol Neurobiol.** 189(1), 10-21.
- Braga VA, Medeiros IA, Ribeiro TP, França-Silva MS, Botelho-Ono MS, Guimarães DD. (2011). Angiotensin-II-induced reactive oxygen species along the SFO-PVN-RVLM pathway: implications in neurogenic hypertension. **Braz J Med Biol Res.** 44(9), 871-876.
- Buggy J, Fisher AE. (1974). Evidence for a dual central role for angiotensin in water and sodium intake. **Nature.** 250(5469), 733-735.
- Buttler L, Ribeiro IM, Ferreira-Neto HC, Antunes VR. (2016). Angiotensin II acting on PVN induces sympathoexcitation and pressor responses via the PI3K-dependent pathway. **Auton Neurosci.** 198, 54-58.
- Cato MJ, Toney GM. (2005). Angiotensin II excites paraventricular nucleus neurons that innervate the rostral ventrolateral medulla: an in vitro patch-clamp study in brain slices. **J Neurophysiol.** 93(1), 403-413.
- Colombari DS, Menani JV, Johnson AK. (1996). Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **Am J Physiol.** 271(6), 1470-1476.
- Costa KM, Moraes DJA, Machado BH. (2013). Acute inhibition of glial cells in the NTS does not affect respiratory and sympathetic activities in rats exposed to chronic intermittent hypoxia. **Brain research.** 1496, 36–48.
- Covian MR, Antunes-Rodrigues J. (1963). Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. **Am. J. Physiol.** 205, 922-926.
- Cuy Y, Kam K, Sherman D, Janczewski WA, Zheng Y, Feldman JL. (2016). Defining preBötzing Complex Rhythm- and Pattern-Generating Neural Microcircuits *in Vivo*. **Neuron.** 91(3), 602-614.
- Cruz JC, Lopes MM, Elias LLK, Antunes-Rodrigues, J. (2013). Angiotensin II change glutamate uptake and GFAP expression in astrocyte culture from hypothalamus. **The FASEB Journal.** 27(1), 694.4.
- Dampney RA. (1994). Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. **Physiol. Rev.** 74, 323–364.
-

- Davisson RL. (2003). Physiological genomic analysis of the brain renin-angiotensin system. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 285(3), 498-511.
- Davisson RL, Oliverio MI, Coffman TM, and Sigmund CD. (2000). Divergent functions of angiotensin II receptor isoforms in the brain. **J. Clin. Invest.** 106, 103–106.
- Decavel C, Van den Pol NA. (1990). GABA: a dominant neurotransmitter in the hypothalamus. **J Comp Neurol.** 302, 1019–1037.
- Deschepper CF. (1994). Angiotensinogen: hormonal regulation and relative importance in the generation of angiotensin II. **Kidney Int.** 46, 561–563.
- Di S, Popescu IR, Tasker JG. (2013). Glial control of endocannabinoid heterosynaptic modulation in hypothalamic magnocellular neuroendocrine cells. **The Journal of Neuroscience.** 33(46), 18331-18342.
- Di S, Tasker JG. (2004). Dehydration-induced synaptic plasticity in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic nucleus. **Endocrinology.** 145(11), 5141 -5149.
- DiGiovanni SR, Nielsen S, Christensen EI, Knepper MA. (1994). Regulation of collecting duct water channel expression by vasopressin in Brattleboro rat. **Proc Natl Acad Sci USA.** 91(19), 8984-8988.
- Drorbaugh JE, Fenn WO. (1955). A barometric method for measuring ventilation in newborn infants. **Pediatrics.** 16(1), 81-87.
- Erlichman JS, Leiter JC, Gourine AV. (2010). ATP, glia and central respiratory control. **Respir Physiol Neurobiol.** 173(3), 305-11.
- Feldman JL, McCrimmon DR. (2008). Neural control of breathing *In: Fundamental Neuroscience.* Squire L, 3^a ed. Elsevier, Burlington, MA.
- Ferguson AV, Beckmann LM, Fisher JT. (1989). Effects of subfornical organ stimulation on respiration in the anesthetized rat. **Can. J. Physiol. Pharmacol.** 67, 1097-1101.
- Ferguson AV e Renaud LP. (1986). Systemic angiotensin acts at subfornical organ to facilitate activity of neurohypophysial neurons. **Am J Physiol.** 251(4-2), 712-717.
- Ferreira-Neto HC, Antunes VR, Stern JE. (2015). ATP stimulates rat hypothalamic sympathetic neurons by enhancing AMPA receptor-mediated currents. **Journal of Neurophysiology.** 114(1), 159-169.
- Fleming TM, Scott V, Naskar K, Joe N, Brown CH, Stern JE. (2011). State-dependent changes in astrocyte regulation of extrasynaptic NMDA receptor signalling in neurosecretory neurons. **J Physiol.** 589(16), 3929-3941.
- Finke R, Gross R, Hackenthal E, Huber J, Kirchheim HR. (1983). Threshold pressure for the pressure-dependent renin release in the autoregulating kidney of conscious dogs. **Pflugers Arch.** 399, 102–110.
- Fitzsimons JT. (1998). Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev.** 78(3), 583-686.
- Fonnum F, Johnsen A, Hassel B. (1997). Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism. **Glia.** 106-113.
-

- Fitts DA, Tjepkes DS, Bright RO. (1990). Salt appetite and lesions of the ventral part of the ventral median preoptic nucleus. **Behavioral Neuroscience**. 104(5), 818-827.
- Fleming TM, Scott V, Naskar K, Joe N, Brown CH, Stern JE. (2011). State-dependent changes in astrocyte regulation of extrasynaptic NMDA receptor signalling in neurosecretory neurons. **J Physiol**. 589(16), 3929–3941.
- Füchtbauer L, Groth-Rasmussen M, Holm TH, Lobner M, Toft-Hansen H, Khorooshi R, Owens T. (2011). Angiotensin II Type 1 receptor (AT1) signaling in astrocytes regulates synaptic degeneration-induced leukocyte entry to the central nervous system. **Brain Behav Immun**. 25(5), 897-904.
- Fulwiler CE, Saper CB. (1984). Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res**. 319, 229–259.
- Ganong WF. (2000). Circumventricular organs: definition and role in the regulation of endocrine and autonomic function. **Clin Exp Pharmacol Physiol**. 27(5-6), 422-427.
- Gebke E, Müller AR, Jurzak M, Gerstberger R. (1998). Angiotensin II-induced calcium signalling in neurons and astrocytes of rat circumventricular organs. **Neuroscience**. 85(2), 509-520.
- Gentil CG, Antunes-Rodrigues J, Negro-Vilar A, Covian MR. Role of amygdaloid complex in sodium chloride and water intake in the rat. **Physiol. Behav**. 3, 981-985.
- Gourine AV, Kasymov V, Marina N, Tang F, Figueiredo MF, Lane S, Teschemacher AG, Spyer KM, Deisseroth K, Kasparov S. (2010). Astrocytes control breathing through pH-dependent release of ATP. **Science**. 329(5991), 571-575.
- Gourine AV, Llaudet E, Dale N, Spyer KM. (2005). Release of ATP in the ventral medulla during hypoxia in rats: role in hypoxic ventilatory response. **J. Neurosci**. 25, 1211–1218.
- Guertzenstein, PG, Silver A. (1974). Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. **J. Physiol**. 242, 489–503.
- Granjeiro EM, Pajolla GP. (2009). Accorsi-Mendonça D, Machado BH. Interaction of purinergic and nitrgergic mechanisms in the caudal nucleus tractus solitarii of rats. **Auton Neurosci**. 151(2), 117-126.
- Gross PM, Blasberg RG, Fenstermacher JD, Patlak CS. (1987). The microcirculation of rat circumventricular organs and pituitary gland. **Brain Res. Bull**. 18, 73-85.
- Haam J, Popescu IR, Morton LA, Halmos KC, Teruyama R, Yoichi Ueta Y, Tasker JG. (2012). GABA is excitatory in adult vasopressinergic neuroendocrine cells. **J Neurosci**. 32(2), 572–582.
- Harrison-Bernard LM. (2009). The renal renin-angiotensin system. **Advances in Physiology Education**. 33(4), 270-274.
- Hartel K, Schnell C, Hulsmann S. (2009). Astrocytic calcium signals induced by neuromodulators via functional metabotropic receptors in the ventral respiratory group of neonatal mice. **GLIA**. 57, 815–827.
- Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A, Fonnum F. (1992). Selective inhibition of glial cell metabolism *in vivo* by fluorocitrate. **Brain Research**. 576, 120–24.
- Hiyama Y, Noda M. (2016). Sodium sensing in the subfornical organ and body-fluid homeostasis. **Neuroscience Research**. 113, 1-11.
-

- Hiyama TY, Watanabe E, Okado H, Noda M. (2004). The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Nax sodium channels for the control of salt-intake behavior. **J. Neurosci.** 24, 9276–9281.
- Hu B, Qiao H, Sun B, Jia R, Fan Y, Wang N, Lu B, Yan JQ. (2015). AT1 receptor blockade in the central nucleus of the amygdala attenuates the effects of muscimol on sodium and water intake. **Neuroscience.** 29(307), 302-310.
- Hülsmann S, Oku Y, Zhang W, Richter DW. (2000). Metabolic coupling between glia and neurons is necessary for maintaining respiratory activity in transverse medullary slices of neonatal mouse. **Eur J Neurosci.** 12(3), 856-62.
- Hunyady L, Catt KJ. (2006). Pleiotropic AT1 receptor signaling pathways mediating physiological and pathogenic actions of angiotensin II. **Mol. Endocrinol.** 953–970.
- Huxtable AG, Zwicker JD, Alvares TS, Ruangkittisakul A, Fang X, Hahn LB, de Chaves EP, Baker GB, Ballanyi K, Funk GD. (2010). Glia contribute to the purinergic modulation of inspiratory rhythm-generating networks. **J Neurosci.** 30(11), 3947-3958.
- Iadecola C. (2007). Astrocytes Take Center Stage in Salt Sensing. **Neuron.** 54(1), 3–5.
- Johnson AK, Gross PM. (1993). Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **FASEB J.** 7: 678–686.
- Johnson AK, de Olmos J, Pastuskovas CV, Zardetto-Smith AM, Vivas L. (1999). The extended amygdala and salt appetite. **Ann N Y Acad Sci.** 29(877), 258-280.
- Johnson AK, Thunhorst RL. (1997). The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front. Neuroendocrinol.** 18, 292-353.
- Johnson AK, Thunhorst RL. (2007). The neuroendocrinology, neurochemistry and molecular biology of thirst and salt appetite. *In: **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology***, editado por Lajtha A, Blaustein JD. New York: Springer.
- Kakar SS, Riel KK, Neill JD. (1992). Differential expression of angiotensin II receptor subtype mRNA's (AT^{1A} and AT^{1B}) in the brain. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 185(2), 688-692.
- Kaufman S. (1984). Role of right atrial receptors in the control of drinking in the rat. **J Physiol.** 349, 389-396.
- Kc P, Haxhiu MA, Tolentino-Silva FP, Wu M, Trouth CO, Mack SO. (2002). Paraventricular vasopressin-containing neurons project to brain stem and spinal cord respiratory-related sites. **Respir Physiol Neurobiol.** 133(1-2), 75-88.
- Keil LC, Summy-Long J, Severs WB. (1975). Release of vasopressin by angiotensin II. **Endocrinology.** 96, 1063-1065.
- Kobashi M, Ichikawa H, Sugimoto T, Adachi A. (1993). Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema, and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. **Neurosci Lett.** 158: 47–50.
-

- Lancien F, Wong M, Arab AA, Mimassi N, Takei Y, Le Mével J-C. (2010). Central ventilatory and cardiovascular actions of angiotensin peptides in trout. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 303: 311–320.
- Lang RE, Rascher W, Heil J, Unger Th. (1981). Wiedemann G, Ganten D. Angiotensin stimulates Oxytocin Release. **Life Sciences.** 29, 1425-1428.
- Lee S, Yoon BE, Berglund K, Oh SJ, Park H, Shin HS, Augustine GJ, Lee CJ. (2010). Channel-mediated tonic GABA release from glia. **Science.** 330(6005), 790-796.
- Leng G, Sabatier N, Caquineau C. (2009). Pulsatility in Neuroendocrine Systems. **Encyclopedia of Neuroscience.** 1225–1232.
- Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C. (1997). Expression of angiotensin type-1 (AT¹) and type-2 (AT²) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. **Front Neuroendocrinol.** 18(4), 383-439.
- Li Z, Ferguson AV. (1993). Subfornical organ efferents to paraventricular nucleus utilize angiotensin as a neurotransmitter. **Am J Physiol.** 265(2), 302-9
- Lind RW. (1986). Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system. **Brain Res.** 384(2), 250-261.
- Lind RW, Swanson LW, Ganten D. (1985). Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. **Neuroendocrinology.** 40, 2–24.
- Ludwig M, Stern J. (2015). Multiple signalling modalities mediated by dendritic exocytosis of oxytocin and vasopressin. **Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.** 370(1672).
- Mack SO, Wu M, Kc P, Haxhiu MA. (1985). Stimulation of the hypothalamic paraventricular nucleus modulates cardiorespiratory responses via oxytocinergic innervation of neurons in pre-Botzinger complex. **J Appl Physiol.** 102(1), 189-99.
- Machado BH, Bonagamba LG. (1992). Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarius increases arterial pressure in conscious rats. **Brain Res.** 576(1), 131-138.
- Marina N, Tang F, Figueiredo M, Mastitskaya S, Kasimov V, Mohamed-Ali V, Roloff E, Teschemacher AG, Gourine AV, Kasparov S. (2013). Purinergic signalling in the rostral ventro-lateral medulla controls sympathetic drive and contributes to the progression of heart failure following myocardial infarction in rats. **Basic Res Cardiol.** 108, 317.
- Matsuda T, Hiyama TY, Niimura F, Matsusaka T, Fukamizu A, Kobayashi K, Kobayashi K, Noda M. (2017). Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. **NATURE NEUROSCIENCE.** 20, 230–241
- McKinley MJ, Allen AM, May CN, McCallen RM, Oldfield BJ, Sly D, Mendelsohn FA. (2001). Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** 28, 990-992.
- McKinley MJ, Badoer E, Vivas L, Oldfield BJ. (1995). Comparison of c-fos expression in the lamina terminalis of conscious rats after intravenous or intracerebroventricular angiotensin. **Brain Res Bull.** 37(2), 131-137.
- McKellar S, Loewy AD. (1981). Organization of some brain stem afferents to the paraventricular nucleus of the hypothalamus in the rat. **Brain Res.** 217(2), 351-357.
-

- Menani JV, De Luca LA Jr, Johnson AK. (2014). Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 306(4), 201-210.
- Menani JV, Johnson AK. (1995). Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am J Physiol.** 269(5), 1044-1049.
- Michelini LC, Bonagamba LG. (1988). Baroreceptor reflex modulation by vasopressin microinjected into the nucleus tractus solitarii of conscious rats. **Hypertension.** 11(2), 175-179.
- Molkov YI, Zoccal DB, Baekey DM, Abdala AP, Machado BH, Dick TE, Paton JF, Rybak IA. (2014). Physiological and pathophysiological interactions between the respiratory central pattern generator and the sympathetic nervous system. **Prog Brain Res.** 212, 1-23.
- Morimoto S, Cassell MD, Sigmund CD. (2002). Glia- and Neuron-specific Expression of the Renin-Angiotensin System in Brain Alters Blood Pressure, Water Intake, and Salt Preference. **The Journal of Biological Chemistry.** 277(36), 33235–33241.
- Morris M, Li P, Callahan MF, Oliverio MI, Coffman TM, Bosch SM, Diz DI. (1999). Neuroendocrine effects of dehydration in mice lacking the angiotensin AT^{1a} receptor. **Hypertension.** 33, 482–486.
- Muir D, Bed S, Clarke DD. (1986). Acetate and fluoroacetate as possible markers for glial metabolism *in vivo*. **Brain Research.** 380, 336-340
- Naskar N, Stern JE. (2013). Astrocytes influence SON and PVN neurosecretory and presympathetic neuronal excitability via activation of an extrasynaptic NMDA/A-type K⁺ channel coupling mechanism. **The FASEB Journal.** 27, 1118, 35.
- Naskar K, Stern JE. (2014). A functional coupling between extrasynaptic NMDA receptors and A-type K⁺ channels under astrocyte control regulates hypothalamic neurosecretory neuronal activity. **J Physiol.** 592, 2813– 2827.
- Noda M, Hiyama TY. (2015). Sodium sensing in the brain. **Pflugers Arch.** 467(3), 465-74.
- Oldfield BJ, McKinley MJ. (1995). Circunventricular organs. *In: The rat nervous system.* PAXINOS G. 2^a ed. San Diego, Academic Press. 391-403.
- Oldfield BJ, Hards DK, McKinley MJ. (1991). Projections from the subfornical organ to the supraoptic nucleus in the rat: Ultrastructural identification of an interposed synapse in the median preoptic nucleus using a combination of neuronal tracers. **Brain Res.** 558, 13–19.
- Olivares EL, Costa-E-Sousa RH, Cavalcante-Lima HR, Lima HR, Cedraz-Mercez PL, Reis LC. (2003). Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. **Braz J Med Biol Res.** 36(12), 1709-1716.
- Olsson M, Annerbrink K, Hedner J, Eriksson E. (2004). Intracerebroventricular administration of the angiotensin II receptor antagonist saralasin reduces respiratory rate and tidal volume variability in freely moving Wistar rats. **Psycho neuroendocrinology.** 29(1), 107-112.
- Ohtake PJ, Jennings DB. (1993). Angiotensin II stimulates respiration in awake dogs and antagonizes baroreceptor inhibition. **Respir Physiol.** 91(2-3), 335-351.
- Pasti L, Volterra A, Pozzan T, Carmignoto G. (1997). Intracellular calcium oscillations in astrocytes: a highly plastic bidirectional form of communication between neurons and astrocytes *in situ*. **J. Neurosci.** 17, 7817– 7830.
-

- Paul M, Mehr AP, Kreutz R. (2006). Physiology of Local Renin-Angiotensin Systems. **Physiological Reviews**. 86(3), 747-803.
- Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum E. (1987). An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate. **J. Neurochem**. 48, 1377-1385.
- Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F. (1988b). The effect of fluorocitrate on transmitter amino acid release from rat striatal slices. **Neurochem. Res**. 13:637-41.
- Paulsen RE, Fonnum F. (1989). Role of glial cells for the basal and Ca²⁺-dependent K⁺-evoked release of transmitter amino acids investigated by microdialysis. **J. Neurochem**. 52, 1823-29.
- Paulsen RE, Odden E, Fonnum E. (1988a). Importance of glutamine for γ -aminobutyric acid synthesis in rat neostriatum in vivo. **J. Neurochem**. 51, 1294-1299.
- Park JB, Jo JY, Zheng H, Patel KP, Stern JE. (2009). Regulation of tonic GABA inhibitory function, presympathetic neuronal activity and sympathetic outflow from the paraventricular nucleus by astroglial GABA transporters. **J Physiol**. 587(19), 4645-60.
- Paxinos G, Watson C. (1996). **The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates**, Compact 3rd Edition CD Rom. Academic Press. San Diego.
- Peters RA. (1957). Mechanisms of the toxicity of the active constituent of *Dichapetalum cynosuroides* and related compounds. **Adv. Enzymol**. 18, 113-159.
- Potapenko ES, Biancardi VC, Zhou Y, Stern JE. (2013). Astrocytes Modulate a Postsynaptic NMDA–GABA^A-Receptor Crosstalk in Hypothalamic Neurosecretory Neurons. **J Neurosci**. 33(2), 631–640.
- Poulain DA, Wakerley JB. (1982). Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. **Neuroscience**. 7(4), 773-808.
- Potter EK, McCloskey DI. (1979). Respiratory stimulation by angiotensin II. **Respir.Physiol**. 36, 367–373.
- Premer C, Lamondin C, Mitzey A, Speth RC, Brownfield MS. (2013). Immunohistochemical localization of and angiotensin ii receptor subtypes in the rat adrenal, pituitary, and brain with a perspective commentary, **International Journal of Hypertension**. 175428, 22.
- Qin M, Huang YX, Wang JJ, Duan L, Cao R, Chen LW, Rao ZR. (2008). Changes in plasticity of rat hypothalamic neurons and astrocytes in humid and hot environment. **Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao**. 28(3), 419-422.
- Raizada MK, Phillips MI, Crews FT, Sumners C. (1987). Distinct angiotensin II receptor in primary cultures of glial cells from rat brain. **Proc Natl Acad Sci USA**. 84(13), 4655-4659.
- Reis WL, Giusti-Paiva A, Ventura RR, Margatho LO, Gomes DA, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J. (2008). Central nitric oxide blocks vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats. **Exp Physiol**. 92.5, 903–911.
- Reis WL, Saad WA, Camargo LA, Elias LL, Antunes-Rodrigues J. (2010). Central nitrgic system regulation of neuroendocrine secretion, fluid intake and blood pressure induced by angiotensin-II. **Behav Brain Funct**. 6(64).
-

- Roncari CF, David RB, Johnson RF, De Paula PM, Colombari DSA, De Luca LA Jr., Johnson AK, Colombari E, Menani JV. (2014). Angiotensinergic and cholinergic receptors of the subfornical organ mediate sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**. 262, 1–8.
- Ross CA, Ruggiero DA, Joh TH, Park DH, Reis DJ. (1984). Rostral ventrolateral medulla: selective projections to the thoracic autonomic cell column from the region containing C1 adrenaline neurons. **J. Comp. Neurol.** 228, 168–185.
- Ruginsk S, Vechiato F, Elias L, Antunes-Rodrigues J, Cruz J. (2015). Angiotensin II Reduces mRNA Expression for Glutamate Transporters and Glutamine Synthetase in Cultured Hypothalamic Astrocytes. **The FASEB Journal**. 29(1), 968.19.
- Saad WA, Antunes-Rodrigues JA, Genti CG, Covian MR. (1972). Interaction between hypothalamus, amygdala and septal area in the control of sodium chloride intake. **Physiol. Behav.** 9, 629-636.
- Saad WA, Camargo LAA, Silva-Nett CR, Antunes-Rodrigues JA, Covian MR. (1981). The control of sodium chloride intake: functional relationship between hypothalamic inhibitory areas and amygdaloid complex stimulating areas. **Brain. Res. Bull.** 6, 197-202.
- Saad WA, de Arruda Camargo LA, Guarda IF, dos Santos TA, Guarda RS, Saad WA, Simões S, Rodrigues JA. (2004). Interaction between supraoptic nucleus and septal area in the control of water, sodium intake and arterial blood pressure induced by injection of angiotensin II. **Pharmacol Biochem Behav.** 77(4), 667-674.
- Saper CB, Swanson LW, Cowan WM. (1976). The efferent connections of the ventromedial nucleus of the hypothalamus of the rat. **Journal of Comparative Neurology**. 169(4), 409–442.
- Schlenker E, Barnes L, Hansen S, Martin D. (2001). Cardiorespiratory and metabolic responses to injection of bicuculline into the hypothalamic paraventricular nucleus (PVN) of conscious rats. **Brain Research**. 895(1–2), 33–40.
- Schnell C, Negm M, Driehaus J, Scheller A, Hülsmann S. (2016). Norepinephrine-induced calcium signaling in astrocytes in the respiratory network of the ventrolateral medulla. **Respir Physiol Neurobiol**. 226, 18-23.
- Schulkin J. **Sodium Hunger: the search for a salty taste**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
- Shimizu H, Watanabe E, Hiyama TY, Nagakura A, Fujikawa A, Okado H, Yanagawa Y, Obata K, Noda M. (2007). Glial Na_x Channels Control Lactate Signaling to Neurons for Brain $[\text{Na}^+]$ Sensing. **Neuron**. 54, 59–72.
- Sly DJ, Colvill L, McKinley MJ, Oldfield BJ. (1999). Identification of neural projections from the forebrain to the kidney, using the virus pseudo-rabies. **J. Auton. Nerv. Syst.** 77, 73–82.
- Smith JC, Feldman JL. (1987). In vitro brainstem-spinal cord preparations for study of motor systems for mammalian respiration and locomotion. **Journal of Neuroscience Methods**. 21(2), 321–333.
- Smith JC, Ellenberger HH, Ballanyi K, Richter DW, Feldman JL. (1991). Pre-Bötzinger complex: a brainstem region that may generate respiratory rhythm in mammals. **Science**. 254(5032), 726-729.
-

- Soares TJ, Coimbra TM, Martins AR, Pereira AG, Carnio EC, Branco LG, Albuquerque-Araujo WI, de Nucci G, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. (1999). Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. **Proc Natl Acad Sci USA.** 96(1), 278-283.
- Spector AC, Norgren R, Grill HJ. (1992). Parabrachial gustatory lesion impair taste aversion learning in rats. **Behav. Neurosci.** 106(1), 147-161.
- Stachniak TJ, Trudel E, Bourque CW. (2014). Cell-Specific Retrograde Signals Mediate Antiparallel Effects of Angiotensin II on Osmoreceptor Afferents to Vasopressin and Oxytocin Neurons. **Cell Reports Report.** 24(8), 355–362.
- Stern JE. (2015). Neuroendocrine-autonomic integration in the paraventricular nucleus: novel roles for dendritically released neuropeptides. **J Neuroendocrinol.** 27(6), 487-497.
- Stern JE. (2001). Electrophysiological and morphological properties of pre-autonomic neurones in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. **J. Physiol.** 537, 161–177
- Stern JE, Armstrong WE. (1996). Changes in the electrical properties of supraoptic nucleus oxytocin and vasopressin neurons during lactation. **J Neurosci.** 16(16), 4861-4871.
- Sun MK, Hackett JT, Guyenet PG. (1988). Sympathoexcitatory neurons of rostral ventrolateral medulla exhibit pacemaker properties in the presence of a glutamate-receptor antagonist. **Brain Res.** 438, 23–40.
- Sawchenko PE, Swanson LW. (1983). The organization of forebrain afferents to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. **J Comp Neurol.** 218(2), 121-144.
- Swanson LW, Kuypers HGJM. (1980a). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labeling methods. **J. Comp.Neurol.** 194, 555-570.
- Swanson LW, Sawchenko PE, Wiegand SJ, Price JL. (1980b). Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. **Brain Research.** 190-195.
- Szerb JC, Issekutz B. (1987). Increase in the stimulation-induced overflow of glutamate by fluoroacetate, a selective inhibitor of the glial tricarboxylic cycle. **Brain Res.** 410, 116-120.
- Tanaka J, Ushigome A, Hori K, Nomura M. (1998). Responses of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats. **Brain Res Bull.** 45(3), 315-318.
- Thunhorst RL, Kirby RF, Johnson AK. (1996). Role of renal nerves in sodium depletion-induced salt appetite. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** 271: 806–812.
- Thunhorst RL, Lewis SJ, Johnson AK. (1994). Effects of sinoaortic baroreceptor denervation on depletion-induced salt appetite. **Am J Physiol.** 267(4): 1043-1049.
- Tiruneh MA. (2012). Angiotensin II Type 1 Receptor Activation in the Subfornical Organ Mediates Sodium-Induced Pressor Responses in Wistar Rats. **Tese de Mestrado.** Faculty of Medicine, University of Ottawa, Canadá.
- Tiruneh MA, Huang BS, Leenen FH. (2013). Role of angiotensin II type 1 receptors in the subfornical organ in the pressor responses to central sodium in rats. **Brain Res.** 1527, 79-86.
-

- Vivas L, Chiaraviglio E. (1992). The effects of reversible lidocaine-induced lesion of the tissue surrounding the anterior ventral wall of the third ventricle on drinking in rats. **Behav Neural Biol.** 57(2), 124-130.
- Walker JK, Jennings DB. (1998). Respiratory effects of pressor and depressor agents in conscious rats. **Can J Physiol Pharmacol.** 76(7-8), 707-714.
- Walker JK, Jennings DB. (1996). Ventilatory effects of angiotensin and vasopressin in conscious rats. **Can J Physiol Pharmacol.** 74(11), 1258-1264.
- Watanabe E, Fujikawa A, Matsunaga H, Yasoshima Y, Sako N, Yamamoto T, Saegusa C, Noda M. (2000). Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **J Neurosci.** 15(20), 7743-7751.
- Watanabe E, Hiyama TY., Shimizu H, Kodama R, Hayashi N, Miyata S, Yanagawa Y, Obata K, Noda M. (2006). Sodium-level-sensitive sodium channel Nax is expressed in glial laminate processes in the sensory circumventricular organs. **Am. J. Physiol.** 290, 568–576.
- Wei SG, Yu Y, Zhang ZH, Felder RB. (2009). Angiotensin II upregulates hypothalamic AT¹ receptor expression in rats via the mitogen-activated protein kinase pathway. **American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology.** 296(5), 1425-1433.
- Westerhaus MJ, Loewy AD. (1999). Sympathetic-related neurons in the pre-optic region of the rat identified by viral transneuronal labeling. **J. Comp. Neurol.** 414, 361–378.
- Wideman Jr RF, Nishimura H, Bottje WG, Glahn RP. (1993). Reduced Renal Arterial Perfusion Pressure Stimulates Renin Release from Domestic Fowl Kidneys. **General and Comparative Endocrinology.** 89(3), 405–414.
- Wilkin LD, Mitchell LD, Ganten D; Johnson AK. (1989). The supraoptic nucleus: Afferents from areas involved in control of body fluid homeostasis. **Neuroscience.** 28, 573–584.
- Yamamoto T, Sasaki S, Fushimi K, Ishibashi K, Yaoita E, Kawasaki K, Marumo F, Kihara I. (1995). Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct cells in Brattleboro rats. **Am J Physiol.** 268(6), 1546-1551.
- Yeh ER, Erokwu B, LaManna JC, Haxhiu MA. (1997). The paraventricular nucleus of the hypothalamus influences respiratory timing and activity in the rat. **Neuroscience Letters.** 63–66.
- Yu R, Dickinson CJ. (1965). Neurogenic effects of angiotensin. **Lancet.** 286(7425), 1276-1277.
- Yu Y, Xue BJ, Wei SG, Zhang ZH, Beltz TG, Guo F, Johnson AK, Felder RB. (2015). Activation of Central PPAR- γ Attenuates Angiotensin II-Induced Hypertension. **Hypertension.** 66, 00-00.
- Zielke HR, Zielke CL, Baab PJ, Tildon JT. (2007). Effect of fluorocitrate on cerebral oxidation of lactate and glucose in freely moving rats. **Journal of Neurochemistry.** 101, 9–16
- Zubicevic J, Santisteban MM, Raizada MK, Baekey DM. (2013). Brain Angiotensin II elevates bone marrow sympathetic drive. Post session (Abstract 181) **In Hypertension**, 63, A181.
-