

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar/UNESP

MICHELE THAÍS FÁVERO

AJUSTES CARDIORRESPIRATÓRIOS EM RATOS SUBMETIDOS A
DIFERENTES TIPOS DE DESIDRATAÇÕES

ARARAQUARA

2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - PIPGCF UFSCar/UNESP

MICHELE THAÍS FÁVERO

AJUSTES CARDIORRESPIRATÓRIOS EM RATOS SUBMETIDOS A
DIFERENTES TIPOS DE DESIDRATAÇÕES

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutora em Ciências Fisiológicas, área de concentração: Fisiologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Patrícia Maria De Paula

ARARAQUARA

2016

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

F273a Fávero, Michele Thaís
Ajustes cardiorrespiratórios em ratos submetidos a diferentes tipos de desidratações / Michele Thaís Fávero. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
107 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2016.

1. Desidratação intracelular . 2. Desidratação extracelular. 3. Desidratação mista. 4. Receptores glutamatérgicos. 5. Núcleo do trato solitário. I. Título.

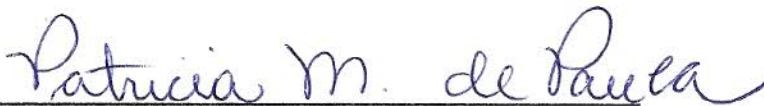


UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

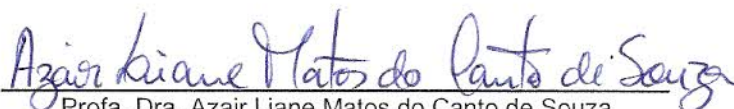
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Michele Thaís Fávero, realizada em 06/09/2016:



Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP



Profa. Dra. Azair Liane Matos do Canto de Souza
UFSCar



Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade
UNESP



Profa. Dra. Regina Célia Vendramini
UNESP



Prof. Dr. João Carlos Callera
UNESP

DADOS CURRICULARES

MICHELE THAÍS FÁVERO

NASCIMENTO	17.09.1984 – Guariba/SP
FILIAÇÃO	Hugo Vanderley Fávero Cleunice Elizabete dos Reis
2012/2016	Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Doutorado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação UFSCar/UNESP).
2010/2012	Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, nível de Mestrado, na Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP (Programa Interinstitucional de Pós-Graduação UFSCar/UNESP).
2004/2007	Curso de Graduação em Fisioterapia Universidade Paulista de Araraquara- UNIP

Dedicatória

Á minha filha Marina, por me manter viva!

Ao meu marido Miguel, por estar ao meu lado sempre!

Aos meus avós, Jacira e José, minha eterna gratidão!

Agradecimentos

Agradeço especialmente a Prof^ª. Dr^ª. Patrícia Maria De Paula, pela orientação e apoio desde meu mestrado.

Ao Professor Dr. Steve Mifflin, pela orientação e dedicação dispensada durante o período que trabalhamos juntos.

Aos demais colaboradores do projeto, Doutor Miguel Furtado Menezes e Doutor Kenta Yamamoto.

À minha querida filha Marina, que trouxe luz e esperança a minha vida.

Ao meu marido Miguel, a você agradeço por estar ao meu lado.

Agradeço a minha tia Grácia, que sempre cuidou de mim e esteve ao meu lado em momentos bons e ruins, obrigada por todo amor e carinho.

Agradeço a minha mãe por todo amor e carinho.

Agradeço aos meus avós Jacira e José Reis, por terem me criado de maneira digna e humilde, e obrigada por todo amor e dedicação, sem vocês eu jamais estaria aqui.

Agradeço aos meus irmãos, amigos, família e colegas pelo apoio e incentivo.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da UNESP – Araraquara pelo auxílio na execução deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia e Anatomia da Universidade Do Norte do Texas-UNT – Fort Worth, Texas, USA, pelo carinho e auxílio na execução deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora: Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de andrade, Profa. Dra. Regina Célia Vendramini, Profa Dra. Azair L.M. Canto de Souza, Prof. Dr. João Carlos Callera; por aceitarem o convite e pela disponibilidade de leitura da tese, muito obrigada.

Ao órgão de fomento CAPES por tornar possível a realização deste trabalho, pela concessão das bolsas no Brasil e no exterior.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	15
RESUMO.....	18
ABSTRACT.....	21
1 INTRODUÇÃO	24
2 OBJETIVOS	31
2.1 Parte 1- Animais não anestesiados submetidos à desidratação intracelular e mista:	31
2.2 Parte 2- Animais anestesiados submetidos à desidratação extracelular:	31
3 MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1 Material e métodos utilizados para os experimentos com animais não anestesiados	32
3.1.1 Animais	32
3.1.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas de aço inoxidável no NTS	32
3.1.3 Injeções no NTS.....	33
3.1.4 Drogas utilizadas.....	34
3.1.5 Canulação da artéria femoral	34
3.1.6 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca	35
3.1.7 Medidas da Ventilação Pulmonar (VE)	35
3.1.8 Determinação do pHa, gases sanguíneos e concentrações plasmáticas de sódio, potássio e bicarbonato.....	37
3.1.9 Determinação da osmolaridade plasmática.....	37
3.1.10 Desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M	39
3.1.11 Desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas) induzida por 24 h de privação hídrica	39
3.1.12 Histologia.....	40
3.1.13 Apresentação dos resultados e análise estatística	40
3.2 Material e métodos utilizados para os experimentos com animais anestesiados.....	41
3.2.1 Animais	41
3.2.2 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	41

3.2.3 Medida da atividade do nervo frênico	41
3.2.4 Medida da atividade do nervo simpático renal	42
3.2.5 Desidratação extracelular induzida por injeção s.c. de furosemida seguida por 24 h de dieta deficiente em sódio	43
3.2.6 Drogas utilizadas.....	43
3.2.7 Procedimentos cirúrgicos e anestesia.....	44
3.2.8 Determinação do pHa, gases sanguíneos e concentrações plasmáticas de sódio, potássio e bicarbonato.....	45
3.2.9 Apresentação dos resultados e análise estatística	45
4-PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS	46
4.1-Protocolos experimentais realizados em ratos não anestesiados	46
4.1.1-Protocolo 1: Efeito da desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais de ratos não anestesiados.	46
4.1.2-Protocolo 2: Determinação da gasometria, das concentrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, osmolaridade e hematócrito de ratos não anestesiados com desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 mL).	47
4.1.3-Protocolo 3: Efeito da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais de ratos não anestesiados.....	48
4.1.4-Protocolo 4: Determinação da gasometria, das concentrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, proteínas totais, osmolaridade e hematócrito de ratos não anestesiados com desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica.	49
4.1.5-Protocolo 5: Efeitos da desidratação mista sobre as respostas cardiorrespiratórias após injeções unilaterais de L-glutamato e NMDA no NTS de ratos não anestesiados.	49
4.2-Protocolo experimental realizado em ratos anestesiados	51
4.2.1-Protocolo: Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos AT1 sobre os parâmetros cardiorrespiratórios e da atividade do nervo simpático renal de ratos com desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida seguida de 24 h de dieta deficiente em sódio.	51
5 RESULTADOS.....	53
5.1 Parte 1- Resultados- Animais não anestesiados.....	53
5.1.1 Efeito da desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais de ratos não anestesiados.....	53

5.1.2	Análise da gasometria e das contrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, osmolaridade e hematócrito de ratos não anestesiados com desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 mL).	55
5.1.3	Efeito da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais de ratos não anestesiados.	57
5.1.4	Medida da ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos não anestesiados após a desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas) induzida por 24 h de privação hídrica.	59
5.1.5	Análise da gasometria e das contrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, proteínas totais, osmolaridade e hematócrito de ratos não anestesiados com desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica.	61
5.1.6	Efeitos da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre as respostas cardiovasculares após injeções unilaterais de L-glutamato e NMDA no NTS antes e após a injeção do antagonista AP5 de ratos não anestesiados.	63
5.1.7	Efeitos da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre as respostas respiratórias após injeções unilaterais de L-glutamato e NMDA no NTS antes e após a injeção do antagonista AP5 de ratos não anestesiados.	67
5.1.8	Efeitos da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre as respostas cardiorrespiratórias após injeções unilaterais do antagonista AP5 de ratos não anestesiados.	72
5.1.9	Histologia.....	74
5.2	Parte 2- Resultados- Animais anestesiados.....	76
5.2.1	Efeito da desidratação extracelular, induzida por 24 h de depleção de sódio, sobre os parâmetros cardiorrespiratórios de ratos anestesiados.	76
5.2.2	Análise da gasometria, concentrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, hematócrito e saturação de oxigênio de ratos anestesiados com desidratação extracelular induzida por 24 h de depleção de sódio.	79
5.2.3	Efeito do bloqueio de receptores AT1 periféricos em ratos anestesiados com desidratação extracelular induzida por 24 h de depleção de sódio.	81
6	DISCUSSÃO	86
7	SUMÁRIO	96
8	CONCLUSÃO	99
9	REFERÊNCIAS.....	100

LISTA DE FIGURAS

Parte 1- Animais não anestesiados

Figura 1: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A), frequência cardíaca (FC, bpm, painel B), volume corrente (VC, mL/Kg, painel C), frequência respiratória (fR, cpm, painel D) e ventilação (VE, mL/min/Kg, painel E) basais em ratos não anestesiados normohidratados e desidratados (pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 12. * diferente do normohidratado.

Figura 2: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A), frequência cardíaca (FC, bpm, painel B), volume corrente (VC, mL/Kg, painel C), frequência respiratória (fR, cpm, painel D) e ventilação (VE, mL/min/Kg, painel E) basais em ratos não anestesiados normohidratados, desidratados (desidratação mista - intracelular e extracelular combinadas, induzida por 24 h de privação hídrica) e reidratados. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 12. * diferente do normohidratado.

Figura 3: Variações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painéis A e A1) e variações da frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painéis B e B1), em resposta à injeção unilateral de L-glutamato (5 nmoL/100 nL) e NMDA (0,01 nmoL/100 nL) antes (painel A e B) e após (painel A1 e B1) do bloqueio de receptores NMDA com AP5 (10 nmoL/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados, desidratados (desidratação mista - intracelular e extracelular combinadas, induzida por 24 h de privação hídrica) e reidratados. Resultados expressos como média \pm EPM, n = 5-7. * diferente da salina; # diferente de normohidratado, + diferente da injeção de NMDA antes do bloqueio com AP5; α diferente da injeção de L-glutamato antes do bloqueio com AP5.

Figura 4: Variações do volume corrente (Δ VC, mL/Kg, painéis A e A1), variações da frequência respiratória (Δ fR, cpm, painéis B e B1) e variações da ventilação (Δ VE, mL/min/Kg, painéis C e C1) em resposta à injeção unilateral de L-glutamato (5 nmoL/100 nL) e NMDA (0,01 nmoL/100 nL) antes (painel A, B e C) e após (painel A1, B1 e C1) o bloqueio de receptores NMDA com AP5 (10 nmoL/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados, desidratados (desidratação mista - intracelular e extracelular combinadas, induzida por 24 h de privação hídrica) e reidratados. Resultados expressos como média \pm EPM, n = 5-7. * diferente da salina; # diferente de normohidratado, + diferente da injeção de NMDA antes do bloqueio com AP5; α diferente da injeção de L-glutamato antes do bloqueio com AP5.

Figura 5: Traçados de um rato representativo do grupo mostrando as alterações respiratórias (Ventilação) e cardiovasculares (pressão arterial pulsátil-PAP, pressão arterial média-PAM e frequência cardíaca-FC), em resposta à injeção unilateral de L-glutamato (5 nmoL/100 nL) e NMDA (0,01 nmoL/100 nL) antes do bloqueio de receptores NMDA com AP5 (10 nmoL/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados (painel A) e desidratados (desidratação mista - intracelular e extracelular combinadas, induzida por 24 h de privação hídrica- painel B).

Figura 6: Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados, mostrando o local da injeção, indicado pela seta, no núcleo do trato solitário (NTS). AP = área postrema e CC = canal central.

Parte 2- Animais anestesiados

Figura 7: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (FC, bpm, painel B) basais em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular

induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 10.

Figura 8: Atividade do nervo frênico (ANF, ciclos por minuto-cpm) basal em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8-10.

Figura 9: Variações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida) em resposta à injeção intravenosa de angiotensina II (ANG II, 50 ng/0,1 mL) e losartan (1 mg/kg/mL). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8-12. * diferente de salina; # diferente do normovolêmico; + diferente de ANG II antes do losartan.

Figura 10: Variações da atividade simpática do nervo renal (Δ RSNA, % do basal) em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida) em resposta à injeção intravenosa de angiotensina II (ANG II, 50 ng/0,1 mL) e losartan (1 mg/kg/mL). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8-12. * diferente de salina; + diferente de ANG II antes do losartan.

Figura 11: Variações da atividade do nervo frênico (Δ ANF, % do basal) em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida) em resposta à injeção intravenosa de angiotensina II (ANG II, 50 ng/0,1 mL) e losartan (1 mg/kg/mL). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 7-10.

LISTA DE TABELAS

Parte 1 - Animais não anestesiados

Tabela 1: Valores de pH arterial (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂, mmHg), pressão parcial de oxigênio (PaO₂, mmHg), concentração plasmática de bicarbonato (HCO₃⁻, mM), hematócrito (Hct, %), concentração plasmática de sódio (P_{Na}⁺, meq/L), potássio (P_K⁺, meq/L) e osmolaridade (P_{osm}, mOsm/kg), de ratos não anestesiados normohidratados e desidratados pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml).

Tabela 2- Ingestão cumulativa de água (mL) e NaCl 0,3 M (mL) por 2 h em ratos não anestesiados, para restabelecer o balanço de sódio após a desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas) induzida por 24 h de privação hídrica.

Tabela 3: Valores de pH arterial (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂, mmHg), pressão parcial de oxigênio (PaO₂, mmHg), concentração plasmática de bicarbonato (HCO₃⁻, mM), hematócrito (Hct, %), concentração plasmática de sódio (P_{Na}⁺, meq/L), potássio (P_K⁺, meq/L), proteínas totais (Pt, g/100 mL) e osmolaridade (P_{osm}, mOsm/kg), de ratos não anestesiados normohidratados, desidratados e reidratados.

Tabela 4: Variações da pressão arterial média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, bpm), volume corrente (VC, mL/kg), frequência respiratória (fR, cpm) e ventilação (VE, mL/min/kg) após a injeção unilateral de AP5 no NTS de ratos normohidratados, desidratados e reidratados (n = 5-7 ratos/grupo).

Parte 2 - Animais anestesiados

Tablela 5: Valores de pH arterial (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂, mmHg), bicarbonato (HCO₃⁻, mM), hematócrito (Hct, %), concentração plasmática de sódio (P_{Na}⁺, meq/L), potássio (P_K⁺, meq/L) e saturação de oxigênio (sO₂) de ratos anestesiados normovolêmicos (tratados com o veículo da furosemida) e depletados de sódio (tratados com o diurético/natriurético furosemida seguido de dieta deficiente em sódio por 24 horas).

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AMPA - α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato;

ANG II – angiotensina II;

AP – área postrema;

AP5 – ácido fosfono valérico;

bpm – batimentos por minutos;

CC – canal central;

cpm – ciclos por minuto;

EPM – erro padrão da média ;

FC – frequência cardíaca;

fR – frequência respiratória;

FURO – furosemida;

g – grama(s);

h – hora(s);

i.c.v. – intracerebroventricular;

i.p. – intraperitoneal;

i.v. – intravenoso;

Kg – quilograma;

L – litro(s);

M – molar;

mEq – miliequivalente;

mg – miligrama(s);

min – minuto(s);

mL – mililitros;

mm – milímetro(s);

mmHg – milímetros de mercúrio;

n – número de ratos;

NaCl – cloreto de sódio;

NMDA - N-metil-D-aspartato;

nL – nanolitro(s);

nmoL – nanomol(es);

NTS – núcleo do trato solitário;

O₂ – oxigênio;

PAM– pressão arterial média;

PAP – pressão arterial pulsátil;

pH – potencial hidrogeniônico;

s.c. – subcutânea;

SNC – sistema nervoso central;

VC – volume corrente;

VE – ventilação pulmonar;

µg – micrograma(s);

µL – microlitro(s);

µm – micrometro(s).

pHa - potencial hidrogeniônico arterial pressão

PaCO₂ - parcial de dióxido de carbono

PaO₂ - pressão parcial de oxigênio

HCO₃⁻ - concentração plasmática de bicarbonato

Hct – hematócrito

P_{Na}⁺ - concentração plasmática de sódio

P_K⁺ - potássio

RESUMO

Fávero, MT. Ajustes cardiorespiratórios em ratos submetidos à diferentes tipos de desidratações.

[Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da Araraquara, UNESP; 2016

Os mamíferos apresentam uma grande capacidade de concentração de urina pelo rim e comportamentos dirigidos à conservação e aquisição de água e sal, devido a atividades controladas por mecanismos envolvendo hormônios e circuitos neurais. A perda de água ou de volume pode ocorrer no compartimento intracelular (desidratação intracelular), do compartimento extracelular (desidratação extracelular) ou de ambos (desidratação absoluta ou mista). Estudo do nosso laboratório mostrou em animais não anestesiados que a desidratação extracelular produzida pela injeção de furosemida seguida da manutenção dos animais com uma dieta deficiente em sódio não altera os parâmetros cardiovasculares basais, mas altera a ventilação basal. Assim, os objetivos do nosso estudo em animais não anestesiados submetidos à desidratação intracelular ou mista foram: 1) caracterizar as respostas cardiorrespiratórias basais; 2) avaliar os parâmetros gasométricos arteriais; 3) avaliar as concentrações plasmáticas de sódio, potássio e osmolaridade plasmática; 4) avaliar as respostas cardiorrespiratórias à ativação de receptores glutamatérgicos NMDA no NTS de ratos submetidos à desidratação mista. Foram utilizados ratos Holtzman com cânulas implantadas no NTS e com cateteres inseridos na aorta abdominal através da artéria e na veia femoral. As medidas de ventilação (VE) foram obtidas pelo método de pletismografia de corpo inteiro. Os protocolos foram realizados em ratos normohidratados (antes da desidratação), desidratados (após a metodologia para induzir a desidratação) e/ou em ratos repletos (2 h após o livre acesso a NaCl 0,3 M e água). A desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 mL), produziu um aumento da pressão arterial média (PAM), sem

modificar a frequência cardíaca (FC), o volume corrente (VC), a frequência respiratória (fR) e a VE. A desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, produziu um aumento da PAM e do VC, sem modificar a FC, a fR e a VE. Nos ratos reidratados a PAM e o VC retornaram aos valores basais. Injeções unilaterais de L-glutamato e do agonista de receptor glutamatérgico NMDA no NTS de ratos normohidratados produziram respostas pressoras e bradicárdicas. Após 24 h de privação hídrica essas respostas pressoras foram reduzidas, assim como a bradicardia produzida por injeção de NMDA no NTS e sem alteração na bradicardia produzida por L-glutamato no NTS. Após a reidratação, as respostas pressoras do L-glutamato e NMDA no NTS permaneceram reduzidas, bem como a bradicardia produzida pela injeção de NMDA no NTS. Além disso, os objetivos do nosso estudo em animais anestesiados submetidos à desidratação extracelular foram: 1) caracterizar as respostas cardiorrespiratórias basais e a atividade do nervo simpático renal (ANSR); 2) avaliar o efeito do bloqueio periférico dos receptores angiotensinérgicos AT1 sobre as respostas cardiorrespiratórias basais e sobre a ANSR; 3) avaliar os parâmetros gasométricos arteriais; 4) avaliar as concentrações plasmáticas de sódio e potássio. A desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético furosemida não alterou a PAM e a FC basais, não alterou a atividade do nervo frênico (ANF) e a ANSR. A desidratação extracelular não alterou a resposta pressora produzida pela injeção intravenosa (iv) de ANG II, nem a queda na ANSR e não promoveu alterações na FC e na ANF. A injeção iv de losartan (antagonista dos receptores AT1, 1 mg/kg de peso corporal) promoveu queda na PAM sem alterar a FC, a ANSR e a ANF. A resposta hipotensora após a injeção iv de losartan foi maior nos animais com desidratação extracelular. A desidratação extracelular não alterou a resposta da ANSR e ANF após o bloqueio com losartan. Os resultados sugerem que alterações na composição e no volume dos líquidos corporais modificam o controle

cardiovascular em animais com desidratação intracelular. Além disso, altera o controle cardiorrespiratório em animais com desidratação mista, bem como a neurotransmissão glutamatérgica no NTS. E ainda, em animais anestesiados com desidratação extracelular não apresentaram alterações cardiorrespiratórias basais e nem na ANSR.

Palavras-chave: Desidratação intracelular, desidratação extracelular, desidratação mista, receptores glutamatérgicos, núcleo do trato solitário.

ABSTRACT

Favero, MT. Cardiorespiratory adjustments in rats submitted to different types of dehydration.

[Tese de Doutorado] Araraquara: Faculdade de Odontologia da Araraquara, UNESP; 2016

Arthropods and vertebrates have a great ability to concentrate urine by the kidney and behaviors directed the conservation and acquisition of water and salt due to activities controlled by mechanisms involving hormones and neural circuits. The loss of water or body volume can occur in the intracellular compartment (intracellular dehydration), the extracellular compartment (extracellular dehydration) or both (absolute or double dehydration). Studies from our laboratory had shown that in unanesthetized animals extracellular dehydration produced by furosemide injection followed by keeping animals with a sodium deficient diet does not alter the basal cardiovascular parameters, but change the basal ventilation. Therefore, the objectives of our study in unanesthetized rats submitted to intracellular dehydration or double dehydration were: 1) to characterize the baseline cardiorespiratory responses; 2) evaluate the arterial blood gas parameters; 3) to evaluate plasma concentrations of sodium, potassium and plasma osmolality; 4) evaluate the cardiorespiratory responses to the activation of glutamate NMDA receptors in the NTS before and after pretreatment with glutamate NMDA receptor antagonist (AP5) of rats submitted to mixed dehydration. Holtzman rats were implanted with cannula in the NTS and catheter inserted in the abdominal aorta via the femoral artery and femoral vein. The ventilation (VE) measurement were obtained by whole body plethysmography method. The protocols was performed in rats euhydrated (before dehydration), dehydrated (following the methodology to induce dehydration) and/or rehydrated rats (2 h after free access to water and 0.3 M NaCl). The intracellular dehydration induced by intragastric overload 2 M NaCl (2 mL) produced an increase

in mean arterial pressure (MAP), without change the heart rate (HR), tidal volume (VT), respiratory rate (fR) and VE. The double dehydration (intracellular and extracellular combined) induced by 24 h of water deprivation, produced an increase in MAP and VT without modifying the HR, fR and VE. In rehydrated rats PAM and VT returned to baseline. Unilateral injections of L-glutamate and NMDA glutamatergic receptor agonist into NTS of euhydrated rats produced pressor responses and bradycardia. After 24 hours of water deprivation these pressor and bradycardic responses produced by NMDA injection in the NTS were reduced, without changing the bradycardia produced by L-glutamate injection in the NTS. After rehydration, the pressor responses to L-glutamate and NMDA receptors in the NTS remained low and bradycardia produced by NMDA injection in the NTS. Furthermore, the objectives of our study in anesthetized animals subjected to extracellular dehydration were: 1) to characterize the baseline cardiorespiratory responses and renal sympathetic nerve activity (RSNA); 2) to evaluate the effect of peripheral blockade of AT1 receptors angiotensinergic on basal cardiorespiratory responses and on RSNA; 3) to evaluate the arterial blood gas parameters; 4) to evaluate plasma concentrations of sodium and potassium. Extracellular dehydration induced by subcutaneous injection of the diuretic furosemide did not affect the basal MAP and HR, phrenic nerve activity (PNA) and RSNA. Extracellular dehydration did not affect the pressor response produced by intravenous (iv) injection of ANG II, decreased ASNR and did not change the HR and PNA. The iv injection of losartan (AT1 receptor antagonist, 1 mg/kg body weight) induced a decrease in MAP without changing HR, and RSNA and PNA. The hypotensive response after iv injection of losartan was greater in dehydrated animals. Extracellular dehydration did not affect the response of RSNA and PNA after losartan administration. The results suggest that changes in the volume and composition of body fluids affect the cardiovascular control in animals with intracellular

dehydration. Furthermore, it affects the cardiorespiratory control in animals with mixed dehydration and glutamatergic neurotransmission in the NTS. Moreover, in anesthetized animals with extracellular dehydration showed no changes in baseline cardiorespiratory responses and RSNA.

Keywords: Intracellular dehydration, extracellular dehydration, mixed dehydration, glutamatergic receptors, nucleus of the solitary tract.

1 INTRODUÇÃO

No ser humano a água constitui cerca de 55 a 65 % do seu peso corporal e varia conforme a idade, sexo e a quantidade de gordura no corpo. O total de água está distribuído entre os compartimentos intracelular e o extracelular (Verbalis, 2003). Estudos mostraram que dois terços do total de água no corpo está no compartimento intracelular e um terço está no compartimento extracelular, sendo que no compartimento extracelular três quartos é de líquido intersticial e um quarto é de líquido intravascular (volume sanguíneo) (Fanestil, 1994).

Os animais perdem água e/ou eletrólitos (principalmente o sódio) constantemente através do suor, respiração e predominantemente pela urina. Portanto, é essencial que haja uma regulação dos mecanismos que controlam o balanço entre a ingestão e a excreção de água e eletrólitos, em especial o sódio, que representa o principal fator osmótico do compartimento extracelular (Verbalis, 2003). Assim, a composição e o volume dos líquidos corporais devem ser regulados dentro de uma faixa estreita para a manutenção adequada da pressão sanguínea para os tecidos.

Os artrópodes e vertebrados possuem uma grande capacidade de concentração de urina pelo rim e comportamentos dirigidos à conservação e aquisição de água e sal, devido a atividades controladas por mecanismos envolvendo hormônios e circuitos neurais. A perda de água ou de volume corporal pode ocorrer do compartimento intracelular (desidratação intracelular), do compartimento extracelular (desidratação extracelular) ou de ambos (desidratação absoluta ou mista). A desidratação seletiva de um ou de outro compartimento ativa mecanismos específicos para corrigir a perda de água ou de volume (Antunes-Rodrigues e cols., 2008).

Ao longo da evolução a desidratação tem sido considerada uma das mais frequentes ameaça a vida e assim constitui-se um desafio potencial para o organismo; e este por sua vez

dispõe de mecanismos comportamentais, humorais e neurais para promover ajustes na ingestão e excreção de água e sódio permitindo assim restabelecer o equilíbrio hidroeletrolítico e a homeostase do organismo (Antunes-Rodrigues e cols., 2008).

Entre os mecanismos comportamentais encontram-se aqueles que levam a ingestão de água e sódio. A ingestão de água ocorre pelo estímulo da sede, que é uma sensação que motiva a procura, a obtenção e o consumo de água, sendo desencadeada pela desidratação extracelular, intracelular e a mista. O apetite ao sódio envolve um comportamento, inato e específico, de ingestão de minerais contendo sódio. Esse comportamento é bem desenvolvido em animais que vivem em ambiente pobre em sódio, ou cuja dieta tem baixo teor desse íon (Stricker e cols., 2008).

A sobrecarga intragástrica de salina hipertônica ou a infusão intravenosa de salina hipertônica podem levar a desidratação intracelular, promovendo uma elevação de aproximadamente 4 a 5% da osmolaridade plasmática e da concentração de sódio (Pereira e cols., 2002). A hiperosmolaridade plasmática vai gerar estímulos para células sensíveis aos níveis de sódio que se encontram periféricamente e centralmente, que são chamadas de osmorreceptores (Kupfermann e cols., 2000). Os osmorreceptores centrais estão situados nos órgãos circunventriculares, tais como órgão subfornical, órgão vascular da lâmina terminal e núcleo pré-óptico mediano (Bourque e Oliet, 1997) e os osmorreceptores periféricos estão localizados na região da veia porta e na circulação hepática, e convertem a concentração de sódio em atividade nervosa hepática aferente, cujos sinais são enviados ao sistema nervoso central (SNC) pelo nervo vago (Haberich, 1968). Os osmorreceptores centrais e periféricos quando ativados pela hiperosmolaridade plasmática irão promover a resposta comportamental de sede (Kraly e cols., 1995; Stricker e cols., 2002). As aferências dos osmorreceptores periféricos são integradas no núcleo do trato solitário (NTS, localizado na superfície dorsal do bulbo) que é a primeira estação sináptica destas aferências

sensoriais no SNC (Adachi, 1984; Ciriello e cols, 1994; Cottle, 1964 e Palkovits e Zaborsky, 1977). O NTS envia projeções para o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), levando a liberação de hormônios como a ocitocina, que induz a perda de sódio (Antunes-Rodrigues e cols., 2004; Huang e cols., 1995; Mckinley e Johnson, 2004) e a vasopressina que promove aumento da pressão arterial nestes animais com desidratação intracelular, desencadeando assim ao comportamento de apetite ao sódio (Hatzinikolaou e cols., 1981).

Situações como diarreia, vômito ou o uso de diuréticos, como a furosemida, podem levar a desidratação extracelular, promovendo a perda de volume do compartimento extracelular juntamente com o íon sódio, caracterizando um estado de hipovolemia e natriurese, sem alterações na osmolaridade, por excretar quantidades equivalentes de água e soluto (Antunes-Rodrigues e cols., 2008). A perda de volume ativa mecanorreceptores localizados nas paredes dos vasos sanguíneos (sensíveis à redução da pressão intravascular) e de receptores de volume e de natremia (localizados no aparelho justaglomerular renal) que liberam renina, levando conseqüentemente à produção de angiotensina II (ANG II) (Antunes-Rodrigues e cols., 2008). Na desidratação extracelular ocorre o decréscimo de 5 a 10% da volemia, e esta hipovolemia ativa o sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), que auxilia no aumento da reabsorção renal de água e sódio e da pressão arterial, e induz sede e o apetite ao sódio (Speilman e Davis, 1974; Haber, 1976).

Neste modelo de desidratação extracelular, o estudo de Jalowiec (1974) mostrou que nas primeiras oito horas após a injeção subcutânea (s.c.) de furosemida o animal já apresenta desidratação extracelular devido a um grande pico de excreção urinária, promovendo uma redução de volume, ativando assim mecanismos compensatórios como o aumento de ANG II circulante que leva ao comportamento de sede nesta primeira fase, mas ainda não ocorre o apetite ao sódio.

O comportamento de apetite ao sódio ocorrerá 24 h após a injeção s.c. de furosemida seguida de 24 h de dieta deficiente em sódio, sendo este um modelo experimental muito utilizado em nosso laboratório para estudo deste comportamento, pois não altera a pressão arterial (Sato e cols., 1996; Menani e cols., 1998; Nozaki e cols., 2002; de Oliveira e cols., 2003; de Oliveira e cols., 2007; Menezes e cols., 2011).

Stricker e cols., 1991 analisaram o apetite tanto de água quanto de sódio em animais com desidratação extracelular e verificaram que neste tipo de desidratação ocorre uma temporalidade para ocorrer os dois comportamentos, sendo que na primeira fase ocorre a sede que dura em torno de 5 h pois neste período está predominando a hipovolemia, este comportamento seria para restaurar o volume, na segunda fase é a fase do apetite ao sódio, que estará bem acentuado 24 h após o estímulo para a desidratação extracelular. E estudos mostraram que 24 h após este tratamento para a desidratação extracelular, o animal apresenta níveis elevados tanto de ANG II quanto de aldosterona, o que leva ao apetite ao sódio (Haber, 1976; Speilman e Davis, 1974).

Estudo de Fávero (2012) mostrou que apesar destes animais tratados com furosemida seguido de 24 h de dieta deficiente em sódio estarem hipovolêmicos e com desidratação extracelular, estes não apresentaram alterações na pressão arterial e frequência cardíaca basais, mas apresentaram um aumento na ventilação basal. Esta hiperventilação foi devido a um aumento no volume corrente sem alterar a frequência respiratória, e mesmo após a oferta de água e sódio hipertônico, tendo os animais recuperado a volemia, os parâmetros respiratórios não voltaram aos níveis normais, sugerindo que a desidratação extracelular não altera os parâmetros cardiovasculares, mas altera os parâmetros respiratórios basais.

Desta forma, surgiram questionamentos em relação às alterações cardiorrespiratórias basais que poderiam também ocorrer em outros modelos de desidratação como a intracelular e a mista.

Além disso, tornou-se necessário estudar mecanismos que estariam mantendo os níveis de pressão arterial basal nesses animais e qual mecanismo estaria sendo ativado para manter um aumento da ventilação basal. Sendo assim, um dos objetivos do nosso trabalho foi registrar a atividade simpática do nervo renal, para analisar a atividade simpática nestes animais e também o registro da atividade do nervo frênico que é o nervo que inerva o músculo diafragma (principal músculo da inspiração), verificando se um aumento da atividade deste nervo seria o mecanismo responsável por manter a hiperventilação nesses animais com desidratação extracelular.

Outro tipo de desidratação que pode ocorrer é a desidratação mista, que pode ser induzida por privação hídrica e o animal perde volume tanto do fluído intracelular quanto do extracelular (De Luca Jr. e cols., 2007). Neste modelo de desidratação também ocorrem mecanismos compensatórios de aumento da liberação de vasopressina e aumento da atividade de osmorreceptores e receptores de volume cardiopulmonares em resposta ao aumento da osmolaridade e diminuição do volume plasmático (Brizze e cols., 1988; Brooks e cols., 2005) para restaurar o balanço hidroeletrólítico. O núcleo supra-óptico do hipotálamo controla a liberação da vasopressina e o PVN regula a atividade simpática e conseqüentemente o volume sanguíneo e a pressão arterial via projeções para a região rostroventrolateral do bulbo e/ou coluna intermédia lateral (Antunes-Rodrigues e cols., 2004; Colombari e cols., 2011; Stocker e cols., 2006). Além disso, estudos mostraram que o NTS é a principal área integradora de sinais aferentes sensoriais no SNC e possui uma grande variedade de neurotransmissores/neuromoduladores (Van Giersbergen e cols., 1992; Dampney, 1994; Lawrence e Jarrott, 1996).

Um importante neurotransmissor presente no NTS é o aminoácido excitatório L-glutamato que é liberado principalmente pelas aferências sensoriais barorreceptoras e quimiorreceptoras (Talman e cols., 1980; Talman, 1989; Vardhan e cols., 1993; Zhang e Mifflin, 1993; Haibara e cols., 1995).

O L-glutamato medeia as principais neurotransmissões excitatórias no SNC e atua nos receptores glutamatérgicos. Esses receptores são divididos em receptores ionotrópicos e metabotrópicos (Nakanishi e cols., 1998). Os receptores glutamatérgicos ionotrópicos são canais iônicos dependentes de ligantes e são subdivididos em NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropionato e cainato). Os receptores glutamatérgicos metabotrópicos são modulados pela produção de segundos mensageiros via proteína G (Nakanishi e cols., 1998).

Estudos da literatura mostraram que a ativação dos receptores glutamatérgicos do PVN aumenta a atividade nervosa simpática e o bloqueio destes receptores promove uma maior queda da pressão arterial em animais com desidratação mista (induzida por 48 h de privação hídrica) quando comparado com animais normohidratados (Freeman e Brooks, 2007). Além disso, Bardgett e cols., 2014 demonstraram que a recaptação de L-glutamato pelas células da glia do PVN está diminuída e a excitabilidade dos receptores NMDA do PVN está bastante aumentada em animais com desidratação mista, sugerindo que a hiperatividade simpática nestes animais desidratados é devido a estas alterações. Também foi demonstrado que a expressão dos receptores NMDA no PVN aumenta durante a desidratação intracelular (Decavel e Curras, 1997,) e que as correntes iônicas destes receptores também estão aumentadas durante a desidratação mista (Fleming e cols., 2011). O conjunto destes resultados sugere que a neurotransmissão glutamatérgica do PVN está exacerbada após diferentes modelos de desidratação e esta exacerbção se deve principalmente à alterações no número ou permeabilidade dos receptores glutamatérgicos do tipo NMDA. Corroborando com estes resultados, estudo de nosso laboratório (Favero, 2012) mostrou que os animais com desidratação extracelular (tratados com furosemida seguido de 24 h de dieta deficiente em sódio) tiveram uma queda na resposta pressora e na hiperventilação promovida pela injeção de L-glutamato no NTS, sugerindo que as alterações

neuroendócrinas que ocorrem neste modelo de desidratação modificam as respostas cardiorespiratórias produzidas pela ativação dos receptores glutamatérgicos do NTS. Além disso, Braga e cols. (2006) mostraram que podem ocorrer diferentes padrões respiratórios após a ativação dos diferentes tipos receptores glutamatérgicos, por exemplo, na preparação *in situ* a ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos produziu redução na frequência de disparos do nervo frênico, e a ativação de receptores glutamatérgicos metabotrópicos produziu aumento da frequência de disparos do nervo frênico, sugerindo que a ativação glutamatérgica altera os parâmetros respiratórios. Porém, nenhum desses trabalhos elucidou as respostas cardiorespiratórias de ativação glutamatérgica no NTS de ratos com desidratação extracelular, intracelular e mista.

Desta forma, torna-se muito interessante investigar se a neurotransmissão glutamatérgica no NTS e os parâmetros cardiorespiratórios estão alterados na desidratação mista (induzida por 24 h privação hídrica).

2 OBJETIVOS

2.1 Parte 1- Animais não anestesiados submetidos à desidratação intracelular e mista:

- 1) Caracterizar as respostas cardiorrespiratórias basais;
- 2) Avaliar os parâmetros gasométricos arteriais [potencial hidrogeniônico arterial (pHa), pressão parcial de dióxido de carbono (PaCO₂) e pressão parcial de oxigênio (PaO₂)];
- 3) Avaliar as concentrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato (HCO₃⁻), proteínas totais (pt); e a osmolaridade plasmática e o hematócrito (Hct);
- 4) Avaliar as respostas cardiorrespiratórias à ativação de receptores glutamatérgicos NMDA no NTS (somente desidratação mista);
- 5) Avaliar o efeito do pré-tratamento com antagonista de receptores glutamatérgicos NMDA (AP5) no NTS sobre as respostas cardiorrespiratórias promovidas pela injeção unilateral de NMDA e L-glutamato no NTS (somente desidratação mista);

2.2 Parte 2- Animais anestesiados submetidos à desidratação extracelular:

- 6) Caracterizar as respostas cardiorrespiratórias basais e a atividade simpática renal;
- 7) Avaliar o efeito do bloqueio periférico dos receptores angiotensinérgicos AT1 sobre as respostas cardiorrespiratórias basais e sobre a atividade simpática renal;
- 8) Avaliar os parâmetros gasométricos arteriais (pHa, PaCO₂);
- 9) Avaliar as concentrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato (HCO₃⁻), hematócrito (Hct) e saturação de O₂.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material e métodos utilizados para os experimentos com animais não anestesiados

3.1.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com peso entre 290-300 g, fornecidos pelo Biotério do Campus de Araraquara, UNESP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável, com livre acesso a ração Bio Base (Águas Frias, SC, Brasil), água e NaCl 0,3 M (quando necessário) e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro-escuro de 12 h no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), UNESP. Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados e autorizados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal - CEEA (Proc. CEEA nº 16/2012) da FOAr, UNESP.

3.1.2 Cirurgia estereotáxica para implante de cânulas de aço inoxidável no NTS

Para o implante das cânulas cerebrais, os ratos foram anestesiados com cloridrato de cetamina (80 mg/kg de peso corporal, Cristália, Itapira, SP, Brasil) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal, Agener União, Embu-Guaçu, SP, Brasil) intraperitonealmente (i.p.) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). A seguir foi injetado o anestésico local lidocaína com vasoconstrictor (s.c.) na região do escalpo a ser aberta, reduzindo assim o sangramento. Após a assepsia da pele com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal na pele e tecido subcutâneo, expondo-se a região da calota craniana, a qual foi

posteriormente irrigada com solução fisiológica e água oxigenada. O ponto de introdução da cânula guia foi determinado utilizando-se as coordenadas estereotáticas do atlas de Paxinos e Watson (2004) em relação ao bregma. As coordenadas utilizadas para o implante das cânulas-guias em direção ao NTS foram: ântero-posterior = 14,5 mm caudal ao bregma; lateral = \pm 0,5 mm à linha média e dorso-ventral = 7,5 mm abaixo do osso. Neste ponto foi feita a trepanação da calota craniana com o auxílio de uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação. Por esse orifício foram introduzidas as cânulas de 15 mm de comprimento, sendo que a extremidade inferior desta ficou 1 mm acima da superfície dorsal do tronco cerebral. As cânulas-guias foram fixadas ao crânio do animal através de resina acrílica e de pequenos parafusos de aço inoxidável, previamente colocados na calota craniana. Após a completa fixação das cânulas, a torre do estereotático foi removida e para evitar obstrução das cânulas-guias, foi introduzido nas mesmas um mandril (oclusor de 15 mm de comprimento) também de aço inoxidável, o qual foi mantido dentro das cânulas até a realização dos experimentos. O procedimento cirúrgico não excedeu 40 min. Após a cirurgia cerebral, os animais receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de pentabiótico veterinário – pequeno porte (benzilpenicilina 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda) e uma injeção s.c. de analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,1 ml/rato). Os animais ficaram em observação e recuperação durante 7 dias, e tiveram, neste período, livre acesso a água e ração, e neste período eram manipulados diariamente pela experimentadora.

3.1.3 Injeções no NTS

As drogas foram manualmente injetadas unilateralmente no NTS em um volume de 0,1 μ L, utilizando-se uma seringa Hamilton (5 μ L, Hamilton, Reno, NV, EUA) conectada com um

tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no NTS pela cânula guia previamente fixada nesta região. A cânula injetora foi 1,2 mm mais longa do que as cânulas-guias a fim de que as injeções atingissem diretamente o NTS.

3.1.4 Drogas utilizadas

- L-glutamato (Sigma Chem., St Louis, MO, USA), agonista glutamatérgico, que foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado no NTS na dose de 5 nmoL/100 nL.
- NMDA (Tocris, Elisville, MO, USA), agonista glutamatérgico, que foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado no NTS na dose 0,01 nmoL/100 nL.
- AP5 (Research Biochemicals Internationals – RBI, Natick, MA, USA), antagonista de receptores NMDA, que foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado no NTS na dose 10 nmoL/100 nL.
- Solução de NaCl, que foi dissolvida em água de torneira e administrada intragastricamente na dose de 2 M/2 mL por rato.

As doses utilizadas em animais não anestesiados foram retiradas de dados da literatura (Frigerio e cols; 2000, Antunes e cols; 2004, Almado e Machado; 2005).

3.1.5 Canulação da artéria femoral

Um dia antes dos experimentos foi realizada a canulação da artéria femoral. As cânulas utilizadas foram confeccionadas previamente com um tubo de polietileno PE-10 (Clay Adams, Parsipanny, NJ) de 3,5 cm, soldado a outro tubo de polietileno PE-50 de 15 cm. Antes de ser implantada, a cânula foi preenchida com solução fisiológica e obstruída na extremidade livre do

PE-50 com pino de metal. Sob anestesia pela cetamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal), a cânula arterial foi introduzida na aorta abdominal, através da artéria femoral. Uma vez implantada, a cânula foi dirigida subcutaneamente, com auxílio de um trocáter, para a região escapular do rato, onde foi exteriorizada e fixada com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial pulsátil (PAP) e cálculo da pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

3.1.6 Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

Os registros da PAP, PAM e FC foram realizados em ratos não anestesiados e com livre movimentação no dia seguinte ao da canulação da artéria femoral. A cânula arterial, previamente heparinizada (250 UI/ml), foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db, Dover, NH, EUA) acoplado a um sistema computadorizado de registro (modelo Powerlab 16/30SP, ADInstruments, Castle Hill, NSW, Australia).

3.1.7 Medidas da Ventilação Pulmonar (VE)

As medidas de VE foram obtidas por pletismografia de corpo inteiro (Bartlett e Tenney, 1970). Este método é baseado no princípio de que um animal, dentro de uma câmara vedada, terá seu volume de ar corrente inspirado aquecido, da temperatura da câmara à temperatura corporal e saturado com vapor de água; enquanto na expiração, seu volume de ar corrente será esfriado até a temperatura da câmara, havendo perda de vapor de água. Estas situações de aquecer e umidecer o ar inspirado e de esfriar e desidratar o ar expirado são acompanhadas por pequenas mudanças de pressão, que podem ser detectadas por um transdutor diferencial de pressão. A câmara de acrílico, onde o animal é colocado e pode se mover livremente tem conexão com um transdutor diferencial

de pressão e com outra câmara de referência, a qual evita artefatos de medida provocados pela variação de pressão dentro do laboratório, como a abertura de portas. Além disto, a câmara é equipada com um termômetro e uma seringa para calibração.

Durante as medidas de ventilação, o fluxo é interrompido e a câmara selada por curtos períodos de tempo (~ 2 min) e as oscilações na temperatura do ar causadas pela respiração podem ser medidas como oscilações na pressão. Os sinais detectados pelo transdutor diferencial de pressão são coletados por um registrador o qual está conectado a um conversor analógico-digital. Isto permite a digitalização dos sinais em um microcomputador, utilizando um programa de aquisição de dados. Os dados são analisados através de um programa de cálculos, permitindo a obtenção da frequência respiratória (fR) e da amplitude do sinal (PT). O volume corrente (VC) é calculado através da fórmula abaixo (Bartlett e Tenney, 1970). A calibração do volume é feita antes e durante cada experimento por injeção na câmara de uma quantidade conhecida de ar (1 mL) usando uma seringa graduada. A VE é calculada multiplicando o VC pela fR. Segundo Bartlett e Tenney (1970) medidas diretas de VE por pneumotacografia resultam em valores bastante próximos daqueles obtidos por pletismografia.

$$VC = \frac{PT}{PK} \times VK \times \frac{TC}{TR} \times \frac{(PB - PC)}{(PB-PC) - \frac{TC}{Tb} \times (PB-PR)}$$

Definição dos símbolos da equação:

VC: Volume de ar corrente.

VK: Volume de ar injetado na câmara do animal para calibração.

PT: Deflexão de pressão associada com cada volume de ar corrente.

PK: Deflexão de pressão associada ao volume injetado para calibração.

Tb: Temperatura corporal (em Kelvin)

TC: Temperatura do ar dentro da câmara do animal.

PB: Pressão barométrica.

PR: pressão de vapor de água a temperatura corporal.

PC: pressão de vapor de água na camara do animal.

TR: temperatura ambiente.

3.1.8 Determinação do pHa, gases sanguíneos e concentrações plasmáticas de sódio, potássio e bicarbonato.

As amostras de sangue foram coletadas via artéria femoral de ratos submetidos aos diferentes modelos de desidratação (intracelular e mista). As medidas foram feitas usando um analisador de gases portátil I-STAT e cartuchos EG7+ (Heska, Waukesha, MI). O volume de sangue arterial a cada coleta foi de aproximadamente 100 microlitros e a amostra foi analisada imediatamente após a coleta. Os parâmetros analisados foram: potencial hidrogeniônico arterial (pHa), pressão parcial de dióxido de carbono (P_{aCO_2}), pressão parcial de oxigênio (P_{aO_2}), concentração plasmática de bicarbonato (HCO_3^-), hematócrito (Hct), concentração plasmática de sódio (P_{Na^+}) e potássio (P_{K^+}).

3.1.9 Determinação da osmolaridade plasmática

Para a determinação da osmolaridade plasmática foi necessário um volume de 1,5 mL de sangue arterial que foi coletado via artéria femoral de ratos submetidos aos diferentes modelos de desidratação (intracelular e mista).

As amostras forão coletadas em tubos de vidro contendo o anticoagulante EDTA sódico (2 mg/mL de sangue) para obtenção do plasma. Todas as amostras forão centrifugadas por 10 minutos a 3000 rpm (rotações por minuto). A determinação da osmolaridade foi obtida através da diminuição do ponto de congelamento, em um osmômetro Modelo 3250 (Advanced Instruments, Norwood, MA, EUA). A concentração plasmática de proteínas totais foi determinada por refratometria (determinação do índice de refração), utilizando-se refratômetro ATAGO.

3.1.10 Desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M

Os ratos foram submetidos à inserção de uma sonda de polietileno orofaríngea que foi até o estômago para a administração intragástrica de NaCl 2 M (2 mL), sendo que esse procedimento produz elevação de 4% da osmolalidade e da concentração de sódio plasmáticos. Esse forte estímulo reduz a atividade da renina plasmática, mas não altera o volume plasmático, indicando que o volume do compartimento extracelular não é alterado por este procedimento (Pereira e cols, 2002). A sobrecarga foi administrada em animais não anestesiados e com pequena contenção de movimentos. Os animais que foram utilizados para o estudo da desidratação intracelular, além de água, tiveram à disposição NaCl 0,3 M, desde 6 dias antes do início dos experimentos.

3.1.11 Desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas) induzida por 24 h de privação hídrica

Os ratos foram submetidos a 24 h de privação hídrica, feita pela retirada dos bebedouros de água 24 h antes do experimento, seguido da manutenção dos ratos por 24 h com ração normal. A privação hídrica leva a um déficit de água nos dois compartimentos intra e extracelular (De Luca Jr. e cols., 2007), de modo que ocorre uma combinação da ativação dos sistemas renina-angiotensina e de osmorreceptores centrais (Fitzsimons, 1985; Johnson e Edwards, 1990), e também induz a secreção de vasopressina, bem como um aumento significativo da osmolaridade plasmática e da atividade da renina plasmática (Fitzsimons, 1985; Johnson e Edwards, 1990; De Luca Jr e cols., 2002).

3.1.12 Histologia

Ao final dos experimentos, os ratos receberam injeção de 100 nL de solução de azul de Evans 2% unilateralmente no NTS para confirmar o local de injeção. Em seguida, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal) e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração (ventrículo esquerdo) de solução de formalina 10% (40 ml). A seguir, os encéfalos foram retirados e fixados em formalina 10% por 2-4 dias. Cortes transversais (50 μ m de espessura) foram feitos no ponto de injeção do NTS com auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâminas, foram corados pelo método Giemsa. A análise microscópica da localização do sítio de injeção foi feita em microscópio óptico. Somente os ratos nos quais o local da injeção estava situado corretamente no NTS intermediário e caudal foram utilizados para a análise estatística dos dados.

3.1.13 Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados de cada animal submetido aos protocolos experimentais foram tabelados. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados pelo teste t de Student ou pela análise de variância de uma ou duas vias (ANOVA) associadas ao pós-teste Student-Newman-Keuls, conforme o mais apropriado, assumindo-se como significante $p < 0,05$.

3.2 Material e métodos utilizados para os experimentos com animais anestesiados.

3.2.1 Animais

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley com peso entre 300-400g, fornecidos pelo biotério da Universidade do Norte do Texas (UNT), do campus de ciências da saúde (HSC) em Fort Worth, Texas, EUA. Os animais foram mantidos em caixas individuais de acrílico, com livre acesso a ração normal em sódio (LabDiet® JL Rat and Mouse/Irr 6F) e água e permaneceram em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade $\pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de $50 \pm 10\%$), com ciclo claro/escuro de 12 h. Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados e autorizados pelo Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

3.2.2 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

Para o registro das variáveis cardiovasculares, os animais foram submetidos à canulação da artéria femoral com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para registro da PAP. A cânula da artéria femoral foi conectada a um transdutor de pressão (Physiological Pressure Transducer mod. MLT844, ADInstruments) acoplado a um pré-amplificador (Bridge Bio Amplifier mod. ML221, ADInstruments) e ao sistema de registro computadorizado Cambridge Electronic Design (CED-1401) de 8 canais. Os animais tiveram a veia femoral canulada com tubo de polietileno (PE-10 conectado a um PE-50) para a infusão de drogas sistêmicas.

3.2.3 Medida da atividade do nervo frênico

Por meio de um modelo de abertura dorsolateral, o nervo frênico direito foi exposto e isolado da divisão ventral do quinto ramo do plexo cervical. O nervo foi cortado distalmente e colocado em par de fios de aço inoxidável revestido de teflon (AS632, Cooner Wire, CA, EUA)

bipolar em forma de gancho. A atividade do nervo frênico foi filtrada de 100 a 3000 Hz. O nervo e eletrodos foram fixados com cola de silicone (Kwik-Sil, World Precision Instruments, FL, EUA).

O eletrodo bipolar em que o nervo foi colocado estava conectado a um conversor analógico-digital (modelo CED-1401) da Cambridge Electronics Design (CED, Cambridge, UK) de 8 canais. Este aparelho possui filtro passa-baixo, ligação AC-DC (corrente direta-alternada), filtro de corte, permite variação do ganho e possibilita correção da linha de base. A partir deste aparelho, o sinal foi copiado para um sistema de aquisição de dados versão 6 do Spike 2 software (CED). Os resultados foram gravados em DVD e posteriormente analisados.

3.2.4 Medida da atividade do nervo simpático renal

Por meio de uma abertura da cavidade abdominal, o nervo simpático renal foi exposto e colocado em um par de fios de aço inoxidável revestido de teflon (AS632, Cooner Wire, CA, EUA) em formatos de gancho para gravar a atividade do nervo simpático renal. O nervo e eletrodos foram fixados com cola de silicone (Kwik-Sil, World Precision Instruments, FL, EUA). A atividade do nervo simpático renal foi filtrada de 100 a 3000 Hz. O eletrodo bipolar em que o nervo foi colocado estava conectado a um conversor analógico-digital (modelo CED-1401) da Cambridge Electronics Design (CED, Cambridge, UK) de 8 canais. Este aparelho possui filtro passa-baixo, ligação AC-DC (corrente direta-alternada), filtro de corte, permite variação do ganho e possibilita correção da linha de base. A partir deste aparelho, o sinal foi copiado para um sistema de aquisição de dados versão 6 do Spike 2 software (CED). Os resultados foram gravados em DVD e posteriormente analisados.

3.2.5 Desidratação extracelular induzida por injeção s.c. de furosemida seguida por 24 h de dieta deficiente em sódio

Os ratos foram divididos em dois grupos experimentais:

- 1) grupo com desidratação extracelular: foi injetado uma única dose do diurético/natriurético furosemida (20 mg/kg de peso corporal, s.c.), 1 mL/rato, seguido da manutenção dos ratos por 24 h com ração deficiente em sódio (588N Low Sodium/ Low Chloride PD-<http://www.testdiet.com> - 0.03% de sódio e 0.4% de potássio) e água *ad libitum*.
- 2) grupo normovolêmico: foi injetado o veículo da furosemida (salina tamponada, s.c.), 1 ml/rato, seguido da manutenção dos ratos por 24 h com ração normal em sódio (LabDiet® JL Rat and Mouse/Irr 6F-0.3% de sódio e 0.66% de potássio) e água *ad libitum*.

3.2.6 Drogas utilizadas

- Furosemida (Sigma Chem., St Louis, MO, USA), diurético/natriurético, que foi dissolvido em salina tamponada, foi administrada subcutaneamente na dose de 20 mg/Kg de peso corporal.
- Losartan (Tocris, Elisville, MO, USA), antagonista de receptores de angiotensina II do tipo AT1, que foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado intravenosamente na dose de 1 mg/kg de peso corporal.
- Angiotensina (Sigma Chem., St Louis, MO, USA), que foi dissolvida salina isotônica estéril e administrada intravenosamente na dose 50 ng/0,1 mL.
- Hexametônio (Sigma Chem., St Louis, MO, USA), bloqueador ganglionar, que foi dissolvido em salina isotônica estéril e administrado intravenosamente na dose de 10 mg/kg de peso corporal.

- Salina tamponada (veículo da furosemida) foi administrada subcutaneamente, na dose de 1 ml/rato, nos experimentos controle.

As doses utilizadas em animais anestesiados foram retiradas de dados da literatura (Lauar e cols., 2010, Menezes e cols., 2011, Yamamoto e cols., 2014).

3.2.7 Procedimentos cirúrgicos e anestesia

Inicialmente os animais foram anestesiados com isoflurano 5% em 100% de oxigênio. Posteriormente foram traqueostomizados e colocados em ventilação artificial com 1,5 - 2,0% de isoflurano em 100% de oxigênio para continuação dos procedimentos cirúrgicos. Em todos os experimentos foram realizados os seguintes procedimentos cirúrgicos:

- 1) canulação da artéria femoral para registro de PAP e canulação da veia femoral para administração de drogas;
- 2) localização e exposição do nervo simpático renal de acordo com Yamamoto e cols., 2013;
- 3) localização e exposição do nervo frênico via posição dorsolateral de acordo com Takakura e cols., 2011;
- 4) vagotomia bilateral para evitar a influência da ventilação na atividade do nervo frênico.

Os animais foram ventilados com 100% de oxigênio durante todo o período experimental. Os animais receberam uma sonda retal para monitorização da temperatura corpórea e a temperatura foi mantida em 37°C, utilizando-se um colchão com resistência interna para aquecimento. O índice de CO₂-expirado foi monitorado durante todo o experimento por meio de um capnômetro (Columbus Instruments, Ohio, USA). O nível da anestesia foi sempre monitorado testando-se a ausência de efeitos no reflexo de retirada, ausência de variações na pressão arterial e na atividade do nervo simpático renal e do nervo frênico após o pinçamento da pata do animal.

Satisfeitos esses critérios, o relaxante muscular (Gallamine triethiodide Flaxedil 5 mg/kg/hora) foi administrado endovenosamente.

3.2.8 Determinação do pHa, gases sanguíneos e concentrações plasmáticas de sódio, potássio e bicarbonato

As amostras de sangue foram coletadas via artéria femoral de ratos do grupo com desidratação extracelular (24 h após a injeção s.c. de furosemida) e do grupo normovolêmico (24 h após a injeção s.c. de salina tamponada). As medidas foram feitas usando um analisador de gases portátil I-STAT e cartuchos CG8+ (Heska, Waukesha, MI). O volume de sangue arterial a cada coleta foi de aproximadamente 100 microlitros e a amostra foi analisada imediatamente após a coleta. Os parâmetros analisados foram: potencial hidrogeniônico arterial (pHa), pressão parcial de dióxido de carbono (P_{aCO_2}), concentração plasmática de bicarbonato (HCO_3^-), hematócrito (Hct), concentração plasmática de sódio (P_{Na^+}), potássio (P_{K^+}) e saturação de oxigênio (sO_2).

3.2.9 Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados de cada animal submetido aos protocolos experimentais foram tabelados. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e analisados pela análise de variância de uma via (ANOVA) associada ao pós-teste de Student-Newman-Keuls, assumindo-se como significante $p < 0,05$.

4-PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS

4.1-Protocolos experimentais realizados em ratos não anestesiados

4.1.1-Protocolo 1: Efeito da desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais de ratos não anestesiados.

Neste protocolo experimental avaliamos o efeito da desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais em ratos não anestesiados. Desta forma, este protocolo foi realizado em duas condições diferentes, no mesmo grupo de ratos: normohidratado (livre acesso a ração e água) e desidratado (desidratação intracelular).

No dia anterior ao experimento, os ratos foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria femoral. No dia seguinte, cada rato foi colocado individualmente na câmara de pletismografia com livre movimentação. A câmara foi ventilada com ar atmosférico (21% O₂) e o rato permaneceu por um período exploratório que pode variar entre 30 a 60 min, até que o rato ficasse calmo e os parâmetros cardiorrespiratórios se estabilizassem. Após este período, as medidas basais de PAM, FC e VE foram efetuadas. Durante a execução dos experimentos, os ratos não tiveram acesso à ração. Após o registro dos parâmetros cardiorrespiratórios nos animais normohidratados, os animais receberam a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 mL/rato) e após 1 hora foram realizadas novamente as medidas de PAM, FC e VE, agora nos animais com desidratação intracelular.

4.1.2-Protocolo 2: Determinação da gasometria, das concentrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, osmolaridade e hematócrito de ratos não anestesiados com desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 mL).

Para determinação do pH_a , $PaCO_2$, PaO_2 , concentrações plasmáticas de bicarbonato (HCO_3^-), sódio (P_{Na^+}) e potássio (P_{K^+}), proteínas totais (pt), hematócrito (Hct) e osmolaridade, os animais submetidos ao protocolo 1, tiveram amostras de sangue arterial coletadas em duas situações diferentes: normohidratado (livre acesso a ração e água) e desidratado (após a desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M). Após cada coleta de sangue foi realizada uma reposição de volume com solução de salina estéril.

4.1.3-Protocolo 3: Efeito da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais de ratos não anestesiados.

Neste protocolo experimental avaliamos o efeito da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais em ratos não anestesiados. Desta forma, este protocolo foi realizado em três condições diferentes, no mesmo grupo de ratos: normohidratado (livre acesso a ração e água), desidratado (desidratação mista) e reidratado (animal teve acesso por duas horas a água e NaCl 0,3 M para ingestão).

No dia anterior ao experimento, os ratos foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria femoral. No dia seguinte, cada rato foi colocado individualmente na câmara de pletismografia com livre movimentação. A câmara foi ventilada com ar atmosférico (21% O₂) e o rato permaneceu por um período exploratório que pode variar entre 30 a 60 min, até que o rato ficasse calmo e os parâmetros cardiorrespiratórios se estabilizassem. Após este período, as medidas basais de PAM, FC e VE foram efetuadas. Durante a execução dos experimentos, os ratos não tiveram acesso à ração. Após o registro dos parâmetros cardiorrespiratórios nos animais normohidratados, os animais voltaram para as gaiolas individuais sem os bebedouros de água por 24 h, com a manutenção dos ratos por 24 h com ração normal. No dia seguinte, os parâmetros cardiorrespiratórios basais foram registrados novamente nos animais desidratados. Após os registros e com o objetivo de restaurar a volemia e o balanço hidroeletrólítico, os ratos foram colocados em gaiolas individuais e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M em buretas graduadas (divisão de 0,1 ml). A ingestão cumulativa de água e sódio foi medida durante 2 h aos

30, 60, 90 e 120 min. Após as 2 h de ingestão, foram realizados novamente os registros cardiorrespiratórios nos animais reidratados.

4.1.4-Protocolo 4: Determinação da gasometria, das concentrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, proteínas totais, osmolaridade e hematócrito de ratos não anestesiados com desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica.

Para determinação do pH_a , $PaCO_2$, PaO_2 , concentrações plasmáticas de bicarbonato (HCO_3^-), sódio (P_{Na^+}) e potássio (P_{K^+}), proteínas totais (pt), hematócrito (Hct) e osmolaridade, os animais submetidos ao protocolo 3, tiveram amostras de sangue arterial coletadas em três diferentes situações: normohidratado (livre acesso a ração e água), desidratado (após 24 h de privação hídrica) e reidratado (após duas horas de ingestão). A cada coleta de sangue foi realizada uma reposição de volume com solução de salina estéril.

4.1.5-Protocolo 5: Efeitos da desidratação mista sobre as respostas cardiorrespiratórias após injeções unilaterais de L-glutamato e NMDA no NTS de ratos não anestesiados.

Neste protocolo experimental avaliamos o efeito da injeção de L-glutamato (5 nmoL/100 nL) e NMDA (0,01 nmol/100 nl) antes e após a injeção de AP5 (antagonista de receptores NMDA) no NTS de ratos não anestesiados em três condições diferentes: normohidratado (livre acesso a ração e água), desidratado (desidratação mista, induzida por 24 h de privação hídrica) e reidratado (animal teve acesso por duas horas a água e NaCl 0,3 M para ingestão). As cânulas guias para injeções no NTS foram implantadas 7 dias antes da realização deste protocolo. No dia anterior ao experimento, os ratos foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria femoral. No dia seguinte, cada rato foi colocado individualmente na câmara de pletismografia com livre movimentação. A câmara foi ventilada com ar atmosférico (21% O_2) e o animal permaneceu em

um período exploratório que variou entre 30 a 60 min, até que o animal ficasse calmo e os parâmetros cardiorrespiratórios se estabilizassem. Após este período, as medidas basais de PAM, FC e VE foram efetuadas. Em seguida, foi feita a injeção unilateral de L-glutamato (5 nmol/100 nL) no NTS como critério funcional de localização do sítio de injeção a ser estudado. Este critério foi adotado uma vez que o padrão de respostas cardiovasculares à injeção de L-glutamato no NTS (hipertensão e bradicardia) já está bem caracterizado por estudos anteriores (Colombari e cols., 1994 e Machado e Bonagamba, 1992). Uma vez localizado o sítio sensível à injeção de L-glutamato e após o retorno da PAM e FC aos seus valores basais, foi dado um intervalo mínimo de 30 minutos, para então realizarmos a injeção unilateral de L-glutamato (5 nmoL/100 nL) e NMDA (0,01 nmoL/100 nL) no NTS, com intervalo de 20 min entre as mesmas. Após este período, foi feita a injeção unilateral de AP5 (10 nmoL/100 nL) no NTS. NMDA foi novamente injetado no NTS ipsilateral aos 5 e 30 min após AP5 e o L-glutamato aos 15 min após AP5 e as respostas comparadas com o controle (antes da injeção unilateral do AP5 no NTS).

4.2-Protocolo experimental realizado em ratos anestesiados

4.2.1-Protocolo: Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos AT1 sobre os parâmetros cardiorrespiratórios e da atividade do nervo simpático renal de ratos com desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida seguida de 24 h de dieta deficiente em sódio.

Neste protocolo experimental avaliamos o efeito da desidratação extracelular induzida pela injeção s.c. do diurético/natriurético furosemida (20 mg/kg de peso corporal, s.c.) sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais e da atividade simpática renal em ratos anestesiados. Este protocolo foi realizado em 2 grupos diferentes de ratos:

- 1) Grupo com desidratação extracelular: um dia antes dos experimentos os animais receberam injeção s.c. de 1 mL de furosemida e permaneceram por 24 h com ração deficiente em sódio (588N Low Sodium/ Low Chloride PD-<http://www.testdiet.com> - 0.03% de sódio e 0.4% de potássio) e água *ad libitum*;
- 2) Grupo normovolêmico: um dia antes dos experimentos os animais receberam injeção s.c. de 1 mL do veículo da furosemida (salina tamponada) e permaneceram por 24 h com ração normal em sódio (LabDiet® JL Rat and Mouse/Irr 6F-0.3% de sódio e 0.66% de potássio) e água *ad libitum*.

No dia dos experimentos, os animais de ambos os grupos foram anestesiados com isoflurano (1,5 a 2%), traqueostomizados, vagotomizados, ventilados artificialmente (100% O₂). A artéria e veia femoral foram canuladas (para registro de PAP e infusão de drogas), o nervo simpático renal foi dissecado (para registro da atividade simpática) e o nervo frênico foi dissecado (para registro da atividade respiratória). Antes do início do experimento, foi realizada a retirada de

amostras do sangue arterial destes animais para a análise gasométrica. Após 10 minutos, foi injetado i.v. a ANG II e após os registros retornarem a valores basais, foi injetado losartan (antagonista de receptores AT1 da ANG II). Após 10 min, repetimos a injeção de ANG II a fim de avaliar o bloqueio dos receptores AT1 periféricos.

Ao final dos experimentos realizamos o bloqueio ganglionar com a injeção i.v. de hexametônio (60 mg/kg de peso corporal) para avaliar a atividade simpática renal.

5 RESULTADOS

5.1 Parte 1- Resultados- Animais não anestesiados

5.1.1 Efeito da desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais de ratos não anestesiados.

A desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 mL) produziu um aumento da PAM (121 ± 3 mmHg, vs. normohidratado: 110 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) sem modificar a FC (388 ± 9 bpm, vs. normohidratado: 369 ± 7 bpm), o VC ($6 \pm 0,2$ mL/kg, vs. normohidratado: $5 \pm 0,3$ mL/kg), a fR (99 ± 5 cpm, vs. normohidratado: 98 ± 3 cpm) e a VE (603 ± 42 mL/min/kg, vs. normohidratado: 532 ± 32 mL/min/kg).

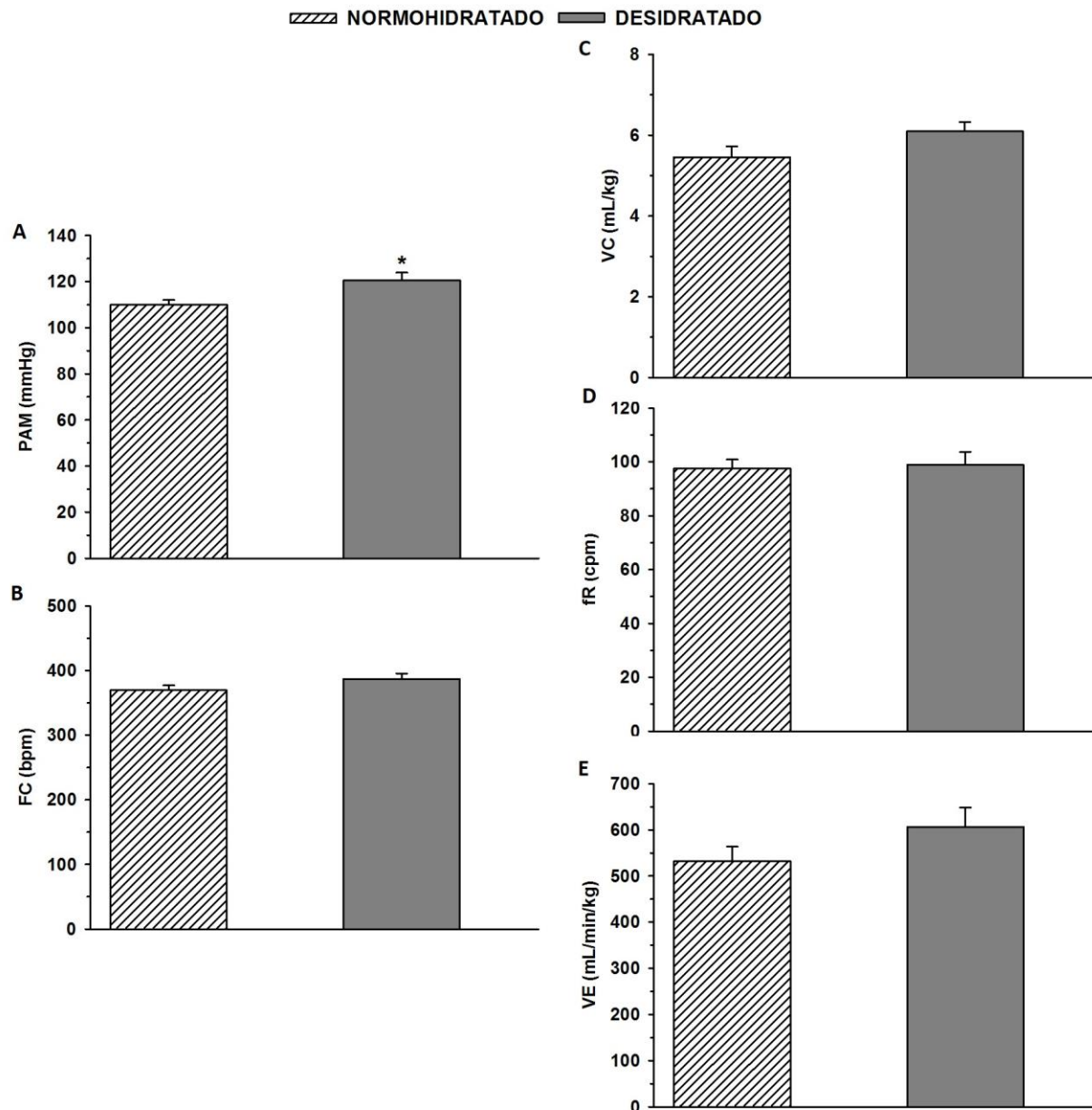


Figura 1: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A), frequência cardíaca (FC, bpm, painel B), volume corrente (VC, mL/Kg, painel C), frequência respiratória (fR, cpm, painel D) e ventilação (VE, mL/min/Kg, painel E) basais em ratos não anestesiados normohidratados e desidratados (pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 12. * diferente do normohidratado.

5.1.2 Análise da gasometria e das contrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, osmolaridade e hematócrito de ratos não anestesiados com desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 mL).

A tabela 1 mostra que os ratos não anestesiados com desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml) tiveram uma queda na concentração de bicarbonato ($29,7 \pm 0,5$ mM, vs. normohidratados: $33,0 \pm 1,0$ mM, $p < 0,05$) e K^+ plasmático ($3,5 \pm 0,1$ meq/L, vs. normohidratados: $4,2 \pm 0,1$ meq/L, $p < 0,05$), e um aumento no Na^+ ($146,0 \pm 0,8$ meq/L, vs. normohidratados: $141,8 \pm 0,3$ meq/L, $p < 0,05$) e na osmolaridade plasmática ($328,5 \pm 3,5$ mOsm/kg, vs. normohidratados: $316,9 \pm 2,7$ mOsm/kg, $p < 0,05$), sem modificação do pHa ($7,48 \pm 0,008$, vs. normohidratados: $7,49 \pm 0,014$), da pressão parcial de gás carbônico ($39,8 \pm 1,1$ mmHg, vs. normohidratados: $43,2 \pm 2,4$ mmHg), da pressão parcial de oxigênio ($72,6 \pm 0,9$ mmHg, vs. normohidratados: $68,8 \pm 2,9$ mmHg) e do hematócrito ($39,1 \pm 2,4$ %, vs. normohidratados: $41,5 \pm 2,1$ %) quando comparados com os ratos não anestesiados normohidratados.

Tabela 1: Valores de pH arterial (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂, mmHg), pressão parcial de oxigênio (PaO₂, mmHg), concentração plasmática de bicarbonato (HCO₃⁻, mM), hematócrito (Hct, %), concentração plasmática de sódio (P_{Na}⁺, meq/L), potássio (P_K⁺, meq/L) e osmolaridade (P_{osm}, mOsm/kg), de ratos não anestesiados normohidratados e desidratados pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 mL).

	Normohidratados	Desidratados
pHa	7,49 ± 0,014	7,48 ± 0,008
PaCO ₂	43,2 ± 2,4	39,8 ± 1,1
PaO ₂	68,8 ± 2,9	72,6 ± 0,9
HCO ₃ ⁻	33,0 ± 1,0	29,7 ± 0,5*
Hct	41,5 ± 2,1	39,1 ± 2,4
P _{Na} ⁺	141,8 ± 0,3	146,0 ± 0,8*
P _K ⁺	4,2 ± 0,08	3,5 ± 0,08*
P _{Osm}	316,9 ± 2,7	328,5 ± 3,5*

Valores expressos pela média ± EPM, n = 8-12 ratos/grupo. *diferente do normohidratado.

5.1.3 Efeito da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre os parâmetros cardiorrespiratórios basais de ratos não anestesiados.

A desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, produziu um aumento da PAM (112 ± 2 mmHg, vs. normohidratado: 105 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) e do VC ($5 \pm 0,2$ mL/kg, vs. normohidratado: $4 \pm 0,1$ mL/kg, $p < 0,05$), sem modificar a FC (389 ± 4 bpm, vs. normohidratado: 396 ± 5 bpm), a fR (78 ± 2 cpm, vs. normohidratado: 81 ± 3 cpm) e a VE (388 ± 25 mL/min/kg, vs. normohidratado: 334 ± 19 mL/min/kg). Nos ratos não anestesiados reidratados a PAM (106 ± 2 mmHg) e o VC ($4 \pm 0,2$ mL/kg) retornaram aos valores basais.

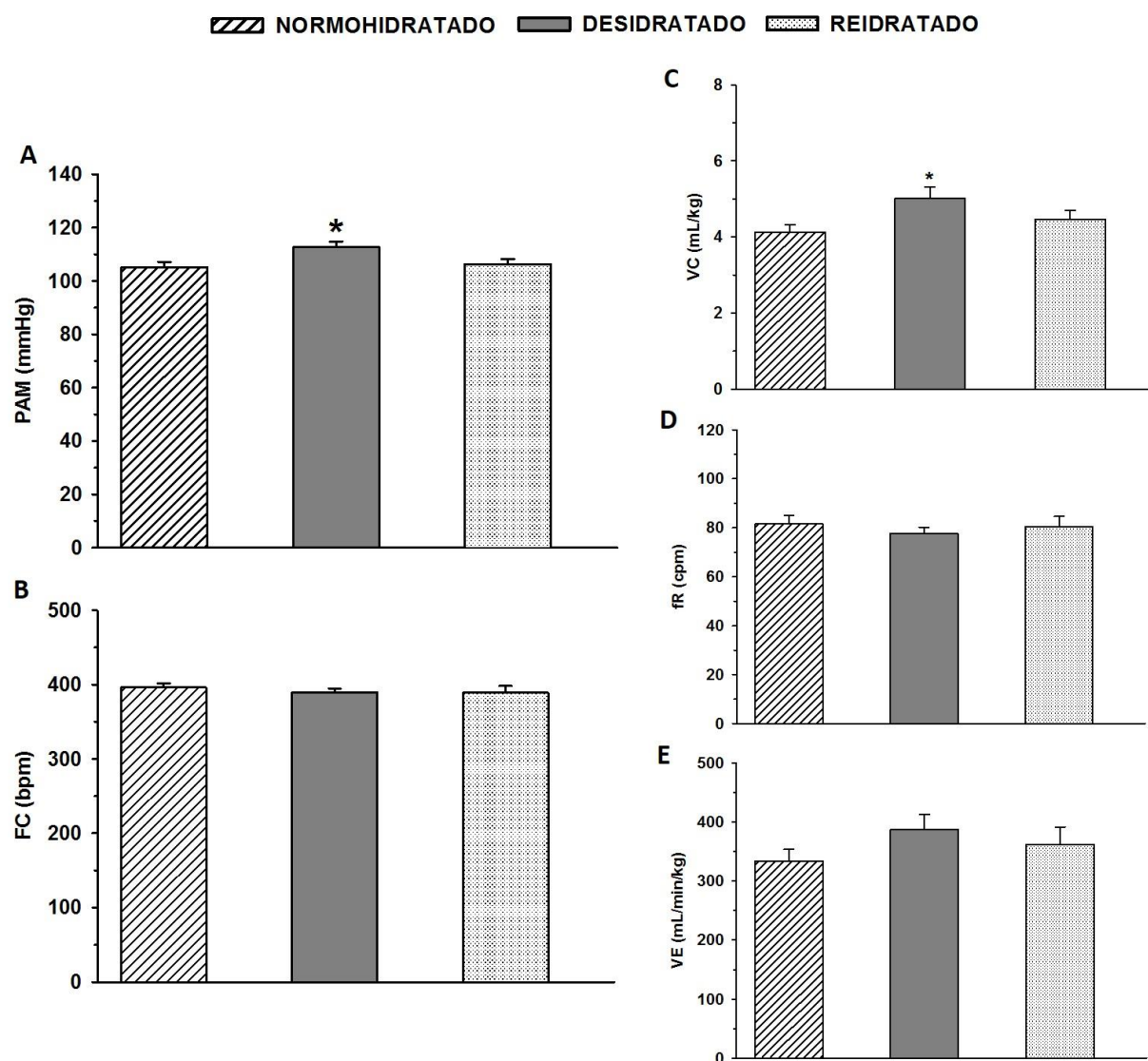


Figura 2: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A), frequência cardíaca (FC, bpm, painel B), volume corrente (VC, mL/Kg, painel C), frequência respiratória (fR, cpm, painel D) e ventilação (VE, mL/min/Kg, painel E) basais em ratos não anestesiados normohidratados, desidratados (desidratação mista - intracelular e extracelular combinadas, induzida por 24 h de privação hídrica) e reidratados. Resultados expressos como média \pm EPM. n = 12. * diferente do normohidratado.

5.1.4 Medida da ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos não anestesiados após a desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas) induzida por 24 h de privação hídrica.

A ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos não anestesiados por duas horas foi realizada para restabelecer a volemia de água e sódio após a desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica (tabela 2).

Tabela 2- Ingestão cumulativa de água (mL) e NaCl 0,3 M (mL) por 2 h em ratos não anestesiados, após a desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas) induzida por 24 h de privação hídrica.

	Tempo			
	30	60	90	120 min
Água	7,0 ± 0,5	7,9 ± 0,7	8,7 ± 0,7	14,9 ± 1,5
NaCl 0,3 M	1,8 ± 0,6	2,4 ± 0,7	3,4 ± 0,8	4,3 ± 0,9

Valores expressos pela média ± EPM. n = 12 ratos/grupo.

5.1.5 Análise da gasometria e das contrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, proteínas totais, osmolaridade e hematócrito de ratos não anestesiados com desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica e após a reidratação.

A tabela 3 mostra que os ratos não anestesiados com desidratação mista tiveram uma queda na pressão parcial de gás carbônico ($35,2 \pm 1,1$ mmHg, vs. normohidratados: $40,7 \pm 1,7$ mmHg, $p < 0,05$) e na concentração de bicarbonato plasmático ($27,7 \pm 0,6$ mM, vs. normohidratados: $32,7 \pm 1$ mM, $p < 0,05$), um aumento de proteínas totais plasmáticas ($7,7 \pm 0,3$ g/100 mL, vs. normohidratados: $7,0 \pm 0,3$ g/100 mL, $p < 0,05$) e da osmolaridade plasmática ($298,1 \pm 2,3$ mOsm/kg, vs. normohidratados: $293,1 \pm 1,4$ mOsm/kg, $p < 0,05$), sem modificação do pHa ($7,50 \pm 0,012$, vs. normohidratados: $7,51 \pm 0,015$), do hematócrito ($37,3 \pm 0,8$ %, vs. normohidratados: $39 \pm 0,9$ %), do Na^+ ($145,3 \pm 1,2$ meq/L, vs. normohidratados: $143,6 \pm 1,1$ meq/L) e K^+ plasmáticos ($4,1 \pm 0,1$ meq/L, vs. normohidratados: $4,0 \pm 0,1$ meq/L), quando comparados com os ratos normohidratados. Os ratos reidratados restabeleceram a concentração de proteínas totais ($6,9 \pm 0,3$ g/100 mL) e osmolaridade ($291,5 \pm 1,9$ mOsm/kg) pois retornaram aos valores basais, mas tiveram uma queda do pHa ($7,47 \pm 0,011$, vs. normohidratados: $7,51 \pm 0,015$), na concentração plasmática de bicarbonato ($25,9 \pm 0,8$ mM, vs. normohidratados: $32,7 \pm 1$ mM, $p < 0,05$) e no hematócrito ($30,2 \pm 0,7$ %, vs. normohidratados: $39 \pm 0,9$ %), quando comparados com os ratos normohidratados.

Tabela 3: Valores de pH arterial (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂, mmHg), pressão parcial de oxigênio (PaO₂, mmHg), concentração plasmática de bicarbonato (HCO₃⁻, mM), hematócrito (Hct, %), concentração plasmática de sódio (P_{Na}⁺, meq/L), potássio (P_K⁺, meq/L), proteínas totais (Pt, g/100 mL) e osmolaridade (P_{osm}, mOsm/kg), de ratos não anestesiados normohidratados, desidratados e reidratados.

	Normohidratados	Desidratados	Reidratados
pHa	7,51 ± 0,015	7,50 ± 0,012	7,47 ± 0,011*#
PaCO ₂	40,7 ± 1,7	35,2 ± 1,1*	35,2 ± 1,7*
PaO ₂	70,2 ± 2,8	67,7 ± 2,0	68,7 ± 2,1
HCO ₃ ⁻	32,7 ± 1,0	27,7 ± 0,6*	25,9 ± 0,8*#
Hct	39 ± 0,9	37,3 ± 0,8	30,2 ± 0,7*#
P _{Na} ⁺	143,6 ± 1,1	145,3 ± 1,2	142,1 ± 1,1#
P _K ⁺	4,0 ± 0,1	4,1 ± 0,1	4,0 ± 0,08
Pt	7,0 ± 0,3	7,7 ± 0,3*	6,9 ± 0,3#
P _{Osm}	293,1 ± 1,4	298,1 ± 2,3*	291,5 ± 1,9#

Valores expressos pela média ± EPM, n = 8-12 ratos/grupo. *diferente do normohidratado, # diferente do desidratado.

5.1.6 Efeitos da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre as respostas cardiovasculares após injeções unilaterais de L-glutamato e NMDA no NTS antes e após a injeção do antagonista AP5 de ratos não anestesiados.

Injeções unilaterais de L-glutamato (5 nmoL/100 nL), antes da injeção de AP5 (antagonista de receptores NMDA) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados produziram resposta pressora (29 ± 5 mmHg, vs. salina: 2 ± 2 mmHg, figura 3A, $p < 0,05$) e bradicardia (-153 ± 21 bpm, vs. salina: -9 ± 7 bpm, figura 3B, $p < 0,05$). A desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica reduziu a resposta pressora (15 ± 3 mmHg, vs. normohidratado: 29 ± 5 mmHg, figura 3A, $p < 0,05$) e não modificou a bradicardia (-119 ± 31 bpm, vs. normohidratado: -153 ± 21 bpm, figura 3B) produzida pela injeção unilateral de L-glutamato no NTS. Após a reidratação, a resposta pressora do L-glutamato injetado no NTS permaneceu reduzida (11 ± 4 mmHg, figura 3A, $p < 0,05$) e não modificou a bradicardia (-95 ± 32 bpm, figura 3B).

Injeções unilaterais de NMDA (0,01 nmoL/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados produziram resposta pressora (19 ± 2 mmHg, vs. salina: 2 ± 2 mmHg, figura 3A, $p < 0,05$) e bradicardia (-161 ± 23 bpm, vs. salina: -9 ± 7 bpm, figura 3B, $p < 0,05$). A desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica reduziu a resposta pressora (8 ± 2 mmHg, vs. normohidratado: 19 ± 2 mmHg, figura 3A, $p < 0,05$) e a bradicardia (-83 ± 31 bpm, vs. normohidratado: -161 ± 23 bpm, figura 3B, $p < 0,05$) produzida pela injeção unilateral de NMDA no NTS. Após a reidratação, a resposta pressora do NMDA injetado no NTS permaneceu reduzida (8 ± 4 mmHg, figura 3A) assim como a bradicardia (-38 ± 32 bpm, figura 3B).

Os painéis A1 e B1 da figura 3 mostram as variações nos parâmetros cardiovasculares promovidos pela injeção unilateral de NMDA (0,01 nmoL/100 nL, 5 e 30 minutos após o bloqueio com AP5) e (L-glutamato 5 nmoL/100 nL, 15 minutos após o bloqueio com AP5) no NTS de ratos não anestesiados. O painel A1 da figura 2 mostra que a resposta pressora após a injeção unilateral de NMDA no NTS de ratos não anestesiados foi atenuada aos 5 e 30 minutos após a injeção do antagonista AP5 no NTS, nos animais normohidratados ($3 \pm 0,6$ e 3 ± 1 mmHg, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: 19 ± 2 mmHg, $p < 0,05$), desidratados (3 ± 1 e $0,3 \pm 0,2$ mmHg, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: 8 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) e reidratados (1 ± 1 e $1 \pm 0,5$ mmHg, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: 8 ± 4 mmHg, $p < 0,05$). A figura 3, painel B1 mostra que bradicardia promovida pela injeção unilateral de NMDA no NTS de ratos não anestesiados também foi atenuada aos 5 e 30 minutos após a injeção de AP5 no NTS nos animais normohidratados (8 ± 5 e 4 ± 5 bpm, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: -161 ± 23 bpm, $p < 0,05$), desidratados (7 ± 4 e 2 ± 3 bpm, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: -83 ± 31 bpm, $p < 0,05$) e reidratados (2 ± 4 e $0,4 \pm 1$ bpm, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: -38 ± 32 bpm, $p < 0,05$).

A figura 3, painel A1 mostra que a resposta pressora após a injeção unilateral de L-glutamato no NTS de ratos não anestesiados não foi alterada aos 15 minutos após a injeção do antagonista AP5 no NTS, nos animais normohidratados (24 ± 4 mmHg, vs. L-glutamato antes da injeção de AP5: 29 ± 5 mmHg), desidratados (11 ± 3 mmHg, vs. L-glutamato antes da injeção de AP5: 15 ± 3 mmHg) e reidratados (10 ± 1 mmHg, vs. L-glutamato antes da injeção de AP5: 11 ± 4 mmHg). A figura 3, painel B1 mostra que bradicardia promovida pela injeção unilateral de L-glutamato no NTS de ratos não anestesiados foi atenuada aos 15 minutos após a injeção de AP5 no NTS somente nos animais normohidratados (-55 ± 15 bpm, vs. L-glutamato antes da injeção

de AP5: -153 ± 21 bpm, $p < 0,05$), e não foi modificada nos animais desidratados (-69 ± 17 bpm, vs. L-glutamato antes da injeção de AP5: -119 ± 31 bpm) e nem nos animais reidratados (-69 ± 22 bpm, vs. L-glutamato antes da injeção de AP5: -95 ± 32 bpm).

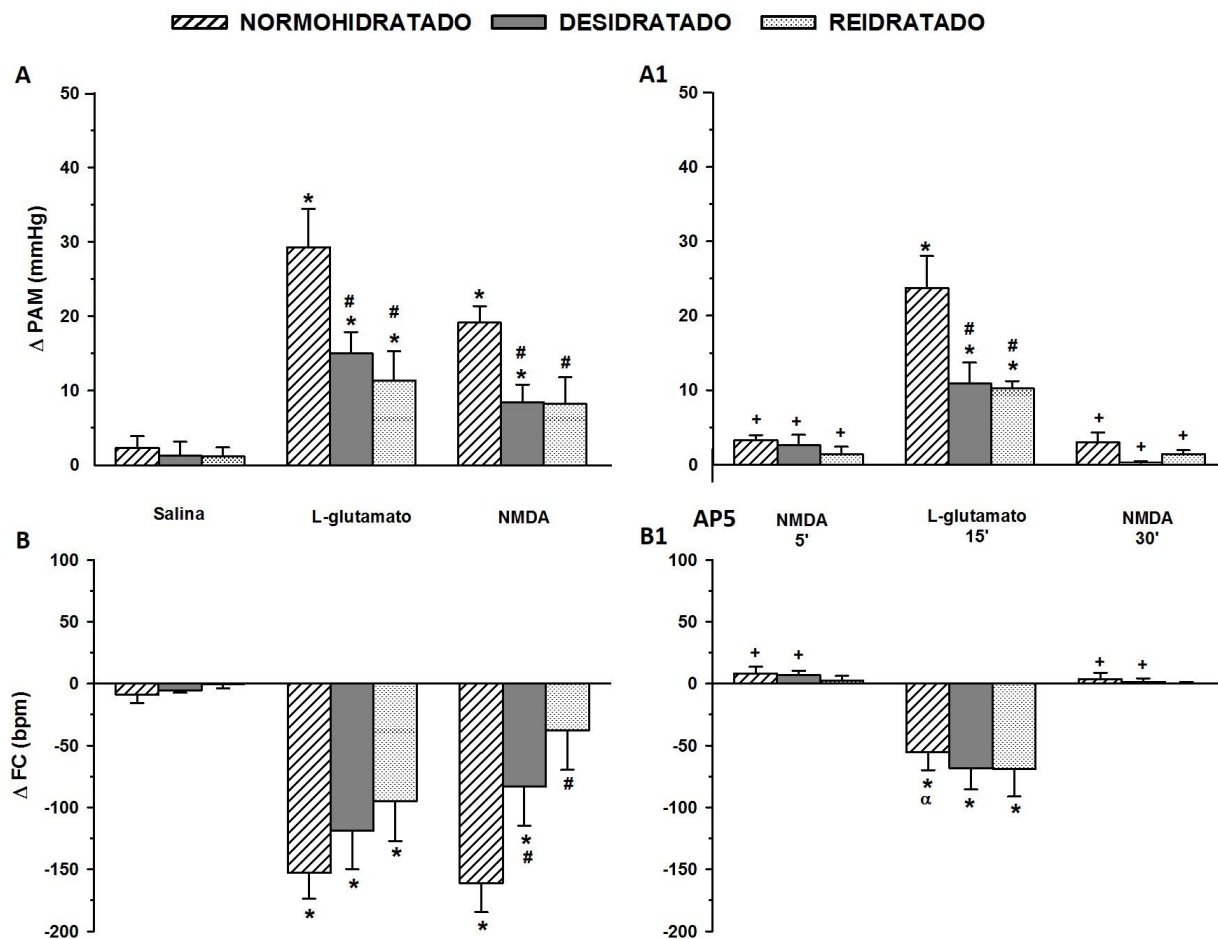


Figura 3: Variações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painéis A e A1) e variações da frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painéis B e B1), em resposta à injeção unilateral de L-glutamato (5 nmol/100 nL) e NMDA (0,01 nmol/100 nL) antes (painel A e B) e após (painel A1 e B1) do bloqueio de receptores NMDA com AP5 (10 nmol/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados, desidratados (desidratação mista - intracelular e extracelular combinadas, induzida por 24 h de privação hídrica) e reidratados. Resultados expressos como média \pm EPM, n = 5-7. * diferente da salina; # diferente de normohidratado, + diferente da injeção de NMDA antes do bloqueio com AP5; α diferente da injeção de L-glutamato antes do bloqueio com AP5.

5.1.7 Efeitos da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre as respostas respiratórias após injeções unilaterais de L-glutamato e NMDA no NTS antes e após a injeção do antagonista AP5 de ratos não anestesiados.

Injeções unilaterais de L-glutamato (5 nmoL/100 nL) antes do bloqueio de receptores NMDA com AP5 (10 nmoL/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados produziram hiperventilação (310 ± 60 mL/min/kg, vs. salina: -6 ± 15 mL/min/kg, figura 4C, $p < 0,05$), sendo que essa hiperventilação foi devido a um aumento do volume corrente (5 ± 1 mL/kg, vs. salina: $0,2 \pm 0,3$ mL/kg, figura 4A, $p < 0,05$), sem alterar a frequência respiratória (-12 ± 10 cpm, vs. salina: -4 ± 5 cpm, figura 4B). A desidratação mista induzida por 24 h de privação não modificou a hiperventilação (251 ± 82 mL/min/kg, vs. normohidratado: 310 ± 60 mL/min/kg, figura 4C) produzida pela injeção unilateral de L-glutamato no NTS. Após a reidratação, a hiperventilação (163 ± 93 mL/min/kg, figura 4C) não foi alterada.

Injeções unilaterais de NMDA (0,01 nmoL/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados não alterou a ventilação (58 ± 54 mL/min/kg, vs. salina: 6 ± 15 mL/min/kg, figura 4C), devido a um aumento do volume corrente ($4 \pm 0,6$ ml/kg, vs. salina: $0,2 \pm 0,3$ ml/kg, figura 4^a, $p < 0,05$) e uma queda na frequência respiratória (-44 ± 5 cpm, vs. salina: -4 ± 5 cpm, figura 4B, $p < 0,05$). A desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica também não alterou a ventilação (34 ± 15 mL/min/kg, vs. normohidratado: 58 ± 54 mL/min/kg, figura 4C) produzida pela injeção unilateral de NMDA no NTS. Após a reidratação, a injeção do NMDA no NTS não alterou a ventilação (75 ± 52 mL/min/kg, figura 4C).

Os painéis A1, B1 e C1 da figura 4, mostram os parâmetros respiratórios promovidos pela injeção unilateral de NMDA (0,01 nmoL/100 nL, 5 e 30 minutos após o bloqueio com AP5) e L-glutamato (5 nmoL/100 nL, 15 minutos após o bloqueio com AP5) no NTS de ratos não anestesiados. A figura 4, painéis A1 e B1 mostram o aumento do volume corrente e a queda da frequência respiratória, respectivamente, promovidas pela injeção unilateral de NMDA no NTS que foram atenuadas aos 5 e 30 minutos após a injeção de AP5 no NTS nos animais normohidratados (VC: $0,5 \pm 0,2$ e $0,3 \pm 0,2$ mL/kg, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: $4 \pm 0,6$ mL/kg, $p < 0,05$) e (fR: -10 ± 4 e -5 ± 3 cpm, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: -44 ± 5 cpm, $p < 0,05$), nos animais desidratados (VC: $0,2 \pm 0,2$ e $0,1 \pm 0,1$ mL/kg, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: $2 \pm 0,4$ mL/kg, $p < 0,05$) e (fR: 1 ± 4 e 3 ± 2 cpm, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: -22 ± 6 cpm, $p < 0,05$) e nos animais reidratados (VC: $-0,3 \pm 0,3$ e $0,1 \pm 0,1$ mL/kg, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: $1,5 \pm 0,6$ mL/kg, $p < 0,05$) e (fR: -3 ± 4 e -1 ± 2 cpm, respectivamente, vs. NMDA antes da injeção de AP5: -14 ± 10 cpm, $p < 0,05$), sem alterar a ventilação.

O painel C1 da figura 4 mostra que a hiperventilação após a injeção unilateral de L-glutamato no NTS foi atenuada aos 15 minutos após a injeção do antagonista AP5 no NTS somente nos animais normohidratados (144 ± 34 mL/min/kg, vs. L-glutamato antes da injeção de AP5: 310 ± 60 mL/min/kg, $p < 0,05$) e não foi modificada nos animais desidratados (124 ± 40 mL/min/kg, vs. L-glutamato antes da injeção de AP5: 251 ± 82 mL/min/kg) e nem nos animais reidratados (116 ± 66 mL/min/kg, vs. L-glutamato antes da injeção de AP5: 163 ± 93 mL/min/kg).

A figura 5 apresenta um traçado típico de um rato representativo do grupo mostrando as alterações respiratórias (Ventilação) e cardiovasculares (pressão arterial pulsátil-PAP, pressão arterial média-PAM e frequência cardíaca-FC) em resposta à injeção unilateral de L-glutamato (5

nmol/100 nL) e NMDA (0,01 nmol/100 nL) antes do bloqueio de receptores NMDA com AP5 (10 nmol/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados e desidratados (desidratação mista - intracelular e extracelular combinadas, induzida por 24 h de privação hídrica).

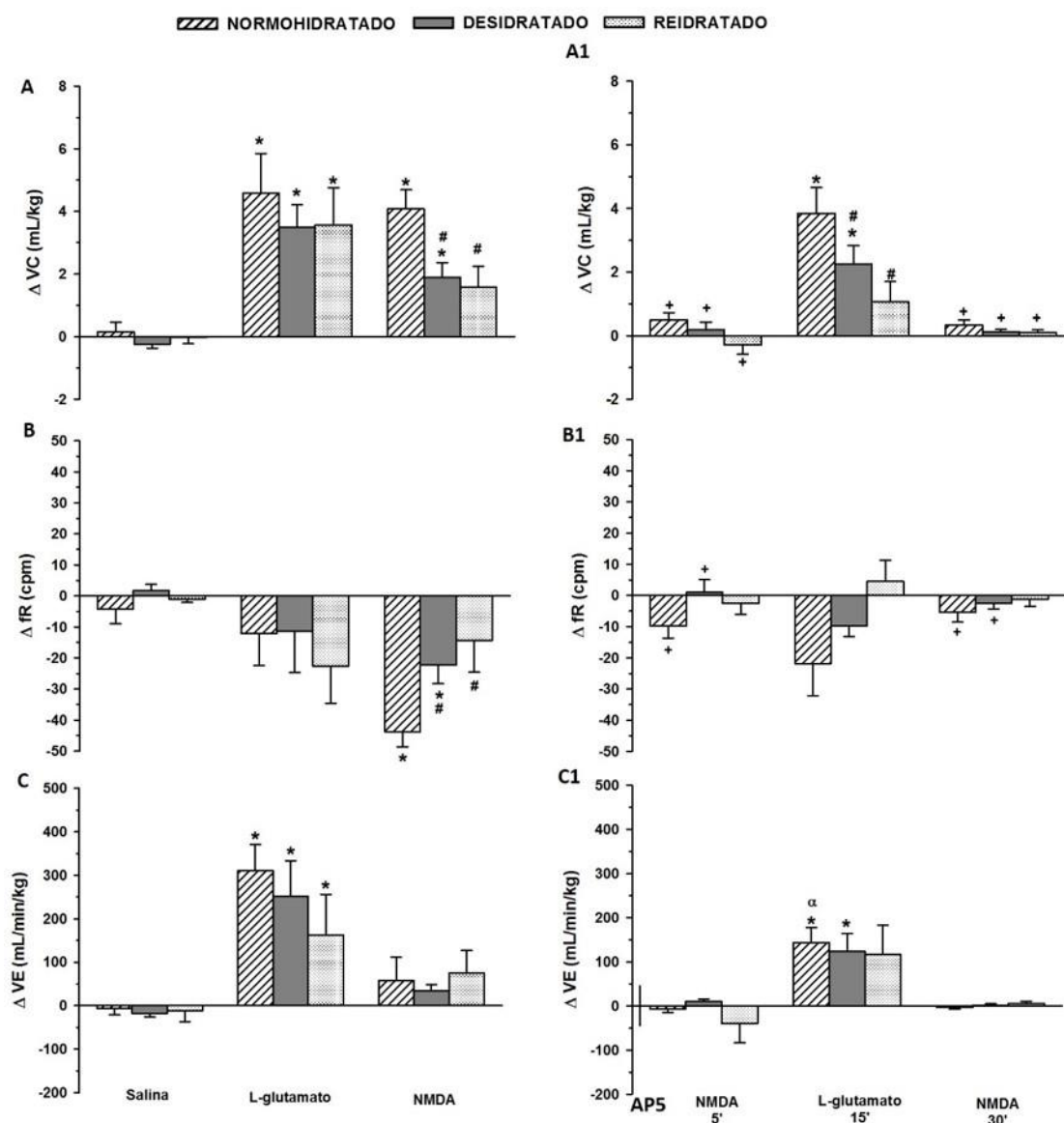


Figura 4: Variações do volume corrente (ΔVC , mL/Kg, painéis A e A1), variações da frequência respiratória (ΔfR , cpm, painéis B e B1) e variações da ventilação (ΔVE , mL/min/Kg, painéis C e C1) em resposta à injeção unilateral de L-glutamato (5 nmoL/100 nL) e NMDA (0,01 nmoL/100 nL) antes (painel A, B e C) e após (painel A1, B1 e C1) o bloqueio de receptores NMDA com AP5 (10 nmoL/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados, desidratados (desidratação mista - intracelular e extracelular combinadas, induzida por 24 h de privação hídrica) e reidratados.. Resultados expressos como média \pm EPM, n = 5-7. * diferente da salina; # diferente de normohidratado, + diferente da injeção de NMDA antes do bloqueio com AP5; α diferente da injeção de L-glutamato antes do bloqueio com AP5.

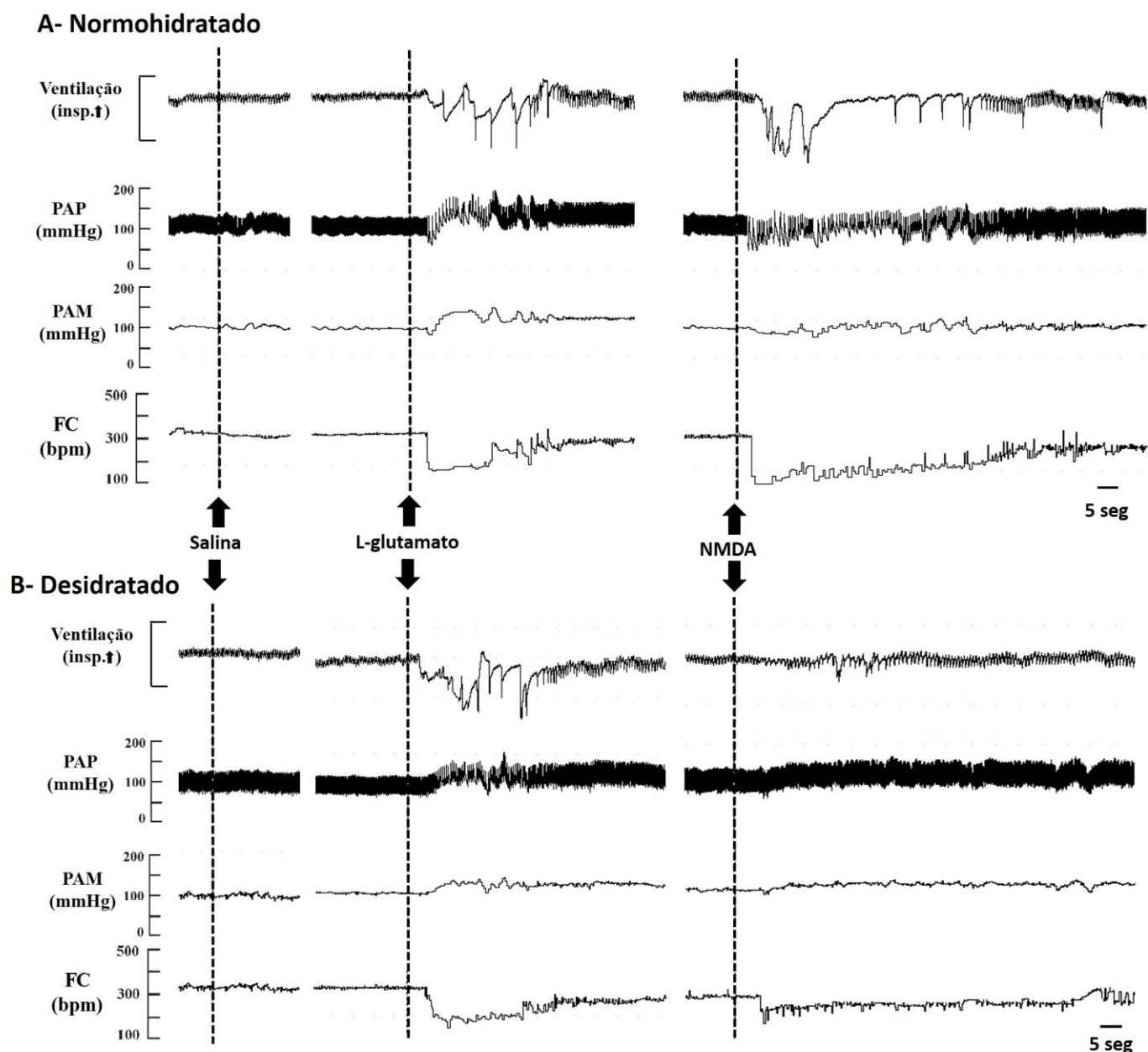


Figura 5: Traçados de um rato representativo do grupo mostrando as alterações respiratórias (Ventilação) e cardiovasculares (pressão arterial pulsátil-PAP, pressão arterial média-PAM e frequência cardíaca-FC) em resposta à injeção unilateral de L-glutamato (5 nmoL/100 nL) e NMDA (0,01 nmoL/100 nL) antes do bloqueio de receptores NMDA com AP5 (10 nmoL/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados normohidratados (painel A) e desidratados (desidratação mista - intracelular e extracelular combinadas, induzida por 24 h de privação hídrica- painel B).

5.1.8 Efeitos da desidratação mista (intracelular e extracelular combinadas), induzida por 24 h de privação hídrica, sobre as respostas cardiorrespiratórias após injeções unilaterais do antagonista AP5 de ratos não anestesiados.

A injeção unilateral do antagonista dos receptores NMDA (AP5, 10 nmol/100 nL) no NTS de ratos não anestesiados não alterou os parâmetros cardiorrespiratórios basais em animais normohidratados, desidratados e reidratados (tabela 4).

Tabela 4: Variações da pressão arterial média (PAM, mmHg), frequência cardíaca (FC, bpm), volume corrente (VC, mL/kg), frequência respiratória (fR, cpm) e ventilação (VE, mL/min/kg) após a injeção unilateral de AP5 no NTS de ratos normohidratados, desidratados e reidratados (n = 5-7 ratos/grupo).

	Normohidratados	Desidratados	Reidratados
PAM	3 ± 2	5 ± 3	$-1 \pm 0,7$
FC	-3 ± 4	-1 ± 7	4 ± 6
VC	$0,06 \pm 0,2$	$0,1 \pm 0,2$	$0,2 \pm 0,3$
fR	$0,3 \pm 5$	-3 ± 4	-2 ± 7
VE	$1,5 \pm 9$	-4 ± 30	-4 ± 11

5.1.9 Histologia

A figura 6 é uma fotomicrografia de uma secção coronal do tronco encefálico de um rato representativo dos grupos testados, mostrando o local da injeção unilateral no NTS. Os pontos de injeção foram localizados principalmente na porção intermediário e caudal do NTS (vide Barraco e cols. 1992) para definições dos subnúcleos do NTS.

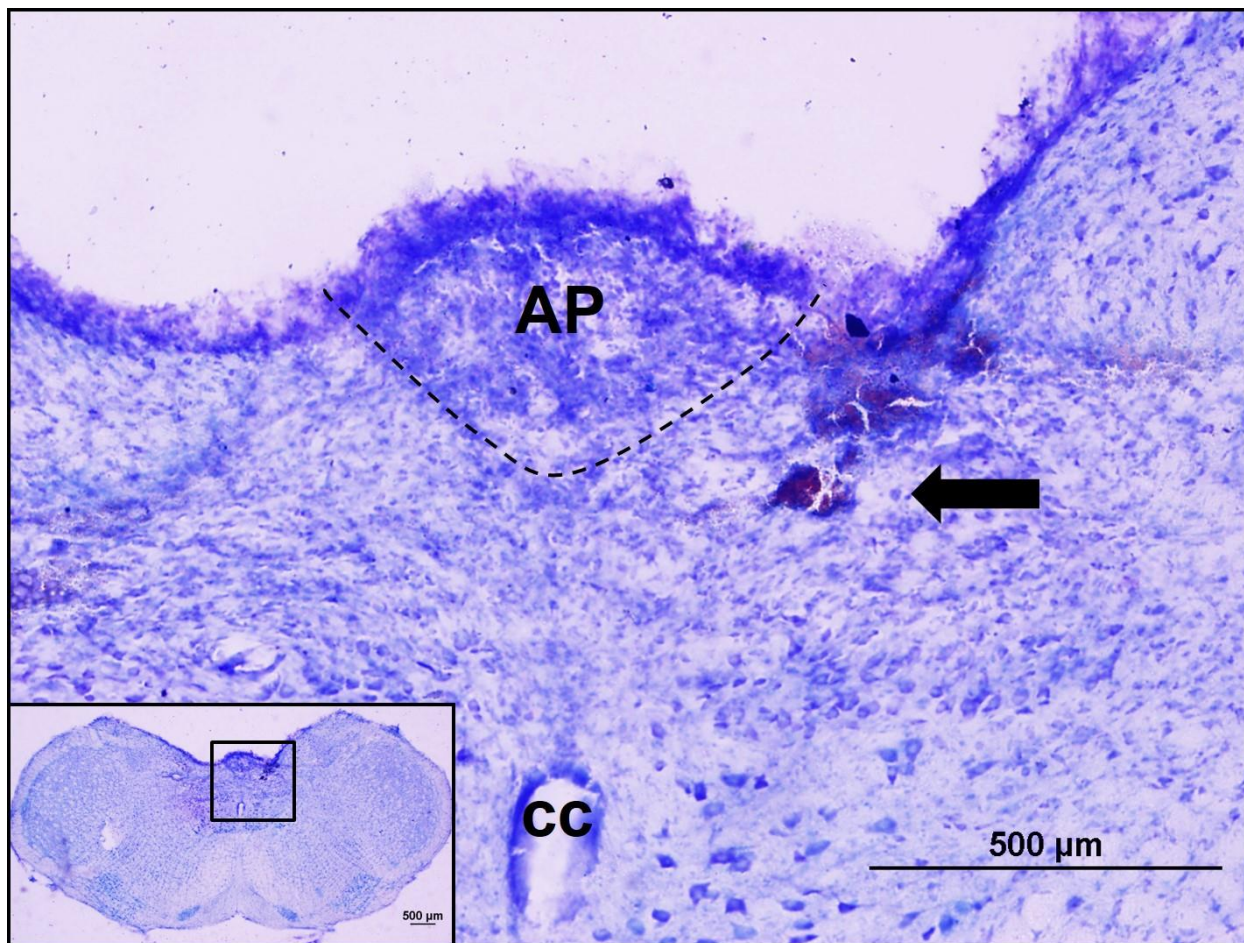


Figura 6: Fotomicrografia de um corte coronal do encéfalo de um rato representativo dos grupos testados, mostrando o local da injeção, indicado pela seta, no núcleo do trato solitário (NTS). AP = área postrema e CC = canal central.

5.2 Parte 2- Resultados- Animais anestesiados

5.2.1 Efeito da desidratação extracelular, induzida por 24 h de depleção de sódio, sobre os parâmetros cardiorrespiratórios de ratos anestesiados.

A desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida não alterou a PAM basal (104 ± 4 mmHg, vs. normovolêmicos: 94 ± 4 mmHg) e a FC (341 ± 9 bpm, vs. normovolêmicos: 348 ± 22 bpm) (figura 7) em ratos anestesiados. A atividade do nervo frênico foi similar entre os ratos depletados de sódio (28 ± 2 cpm) e normovolêmicos (29 ± 4 cpm) (figura 8).

A injeção intravenosa do bloqueador ganglionar hexametônio produziu queda na PAM na mesma intensidade entre os grupos com desidratação extracelular e normovolêmico (47 ± 5 mmHg, vs. normovolêmico: 44 ± 4 mmHg).

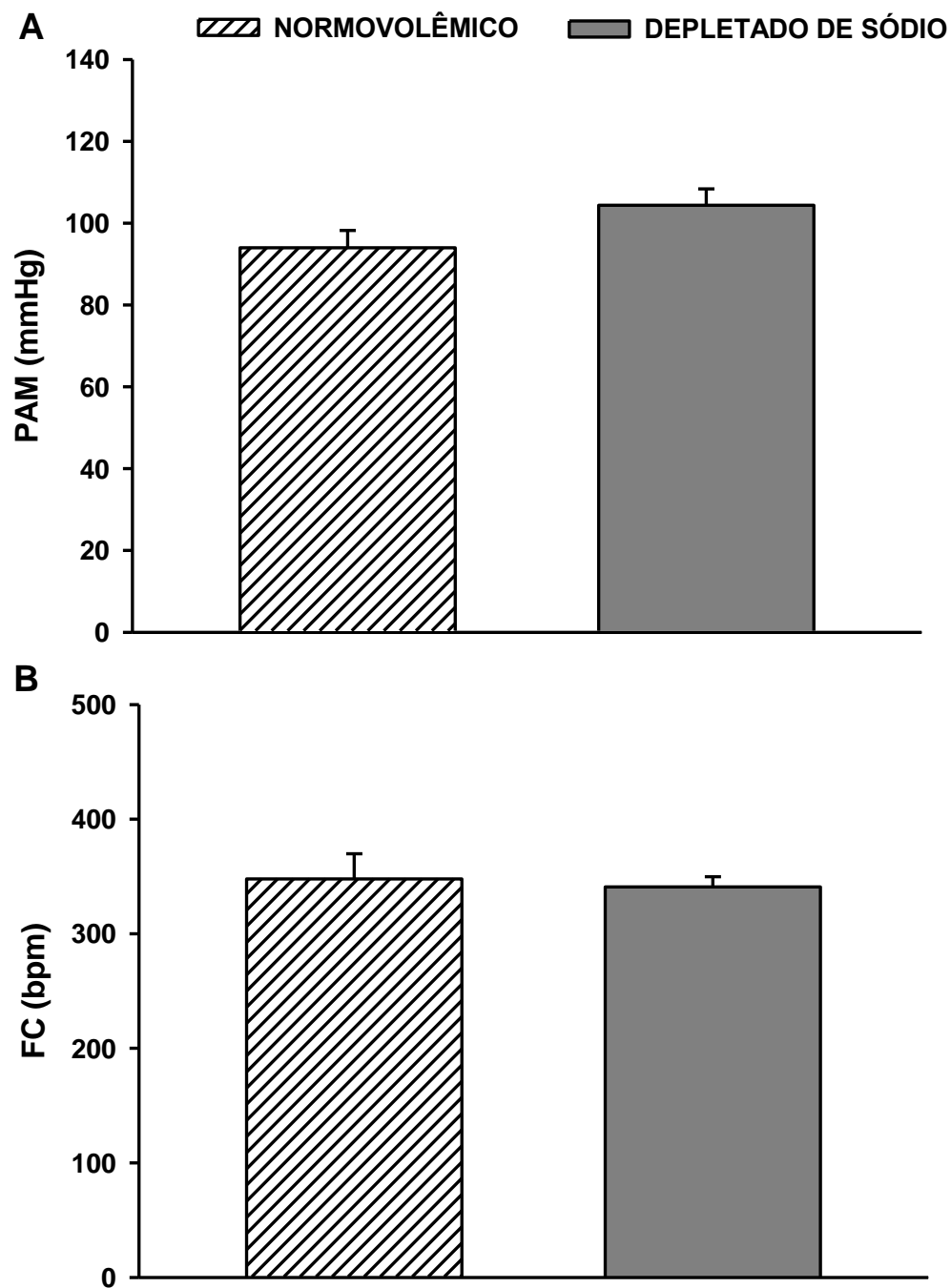


Figura 7: Pressão arterial média (PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (FC, bpm, painel B) basais em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 10.

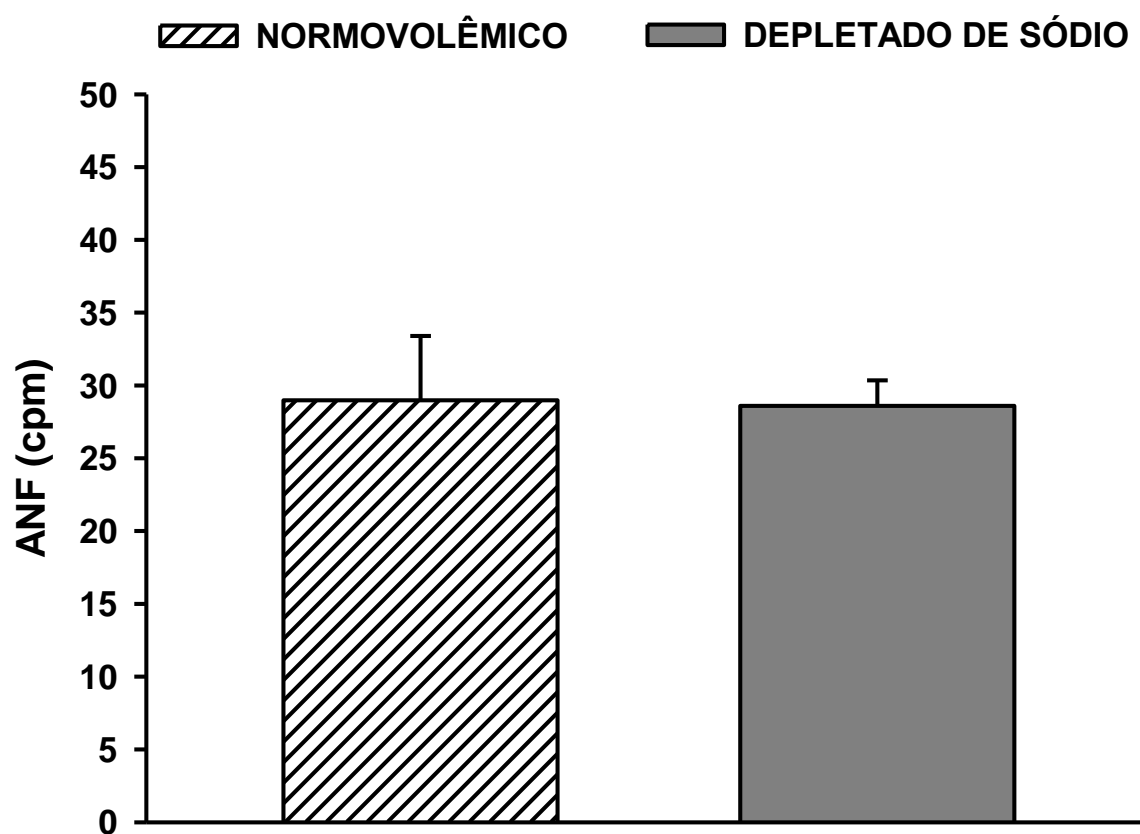


Figura 8: Atividade do nervo frênico (ANF, ciclos por minuto-cpm) basal em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8-10.

5.2.2 Análise da gasometria, concentrações plasmáticas de sódio, potássio, bicarbonato, hematócrito e saturação de oxigênio de ratos anestesiados com desidratação extracelular induzida por 24 h de depleção de sódio.

A tabela 5 mostra que os ratos anestesiados com desidratação extracelular tiveram um aumento no pHa ($7,49 \pm 0,01$, vs. normovolêmico: $7,40 \pm 0,006$, $p < 0,05$), no bicarbonato ($34,3 \pm 0,6$ mM, vs. normovolêmico: $32,5 \pm 0,3$ mM, $p < 0,05$) e no hematócrito ($42,4 \pm 0,5$ %, vs. normovolêmico: $38,9 \pm 0,8$ %, $p < 0,05$) e uma queda na pressão parcial de gás carbônico ($44,8 \pm 1,5$ mmHg, vs. normovolêmico: $51,6 \pm 1,0$ mmHg, $p < 0,05$), na concentração plasmática de Na^+ ($132 \pm 0,6$ meq/L, vs. normovolêmico: $135 \pm 0,2$ meq/L) e K^+ ($3,9 \pm 0,1$ meq/L, vs. normovolêmico: $4,3 \pm 0,1$ meq/L), sem alterar a saturação de oxigênio.

Tablela 5: Valores de pH arterial (pHa), pressão parcial de gás carbônico (PaCO₂, mmHg), bicarbonato (HCO₃⁻, mM), hematócrito (Hct, %), concentração plasmática de sódio (P_{Na}⁺, meq/L), potássio (P_K⁺, meq/L) e saturação de oxigênio (sO₂) de ratos anestesiados normovolêmicos (tratados com o veículo da furosemida) e depletados de sódio (tratados com o diurético/natriurético furosemida seguido de dieta deficiente em sódio por 24 horas).

	Normovolêmicos	Depletados de sódio
pHa	7,40 ± 0,006	7,49 ± 0,01*
PaCO ₂	51,6 ± 1,0	44,8 ± 1,5*
HCO ₃ ⁻	32,5 ± 0,3	34,3 ± 0,6*
Hct	38,9 ± 0,8	42,4 ± 0,5*
P _{Na} ⁺	135,1 ± 0,2	132 ± 0,6*
P _K ⁺	4,3 ± 0,1	3,9 ± 0,1*
sO ₂	100%	100%

Valores expressos pela média ± EPM, n=10-11 ratos/grupo.*diferente do normovolêmico.

5.2.3 Efeito do bloqueio de receptores AT1 periféricos em ratos anestesiados com desidratação extracelular induzida por 24 h de depleção de sódio.

A injeção intravenosa de angiotensina II (ANG II, 50 ng/0,1 mL) em ratos anestesiados produziu resposta pressora (43 ± 3 mmHg; vs. salina: 3 ± 1 mmHg, figura 9A, $p < 0,05$) e queda na atividade simpática do nervo renal (ASNR, -42 ± 6 %; vs. salina: -2 ± 2 %, figura 10, $p < 0,05$) e não alterou a frequência cardíaca (-3 ± 2 bpm; vs. salina: -2 ± 2 bpm, figura 9B), nem a atividade do nervo frênico (ANF, -3 ± 1 %; vs. salina: -2 ± 2 %, figura 11). A desidratação extracelular não alterou a resposta pressora produzida pela injeção intravenosa de ANG II (37 ± 4 mmHg; vs. normovolêmicos: 43 ± 3 mmHg, figura 9A, $p < 0,05$), nem a queda na ASNR (-37 ± 4 %; vs. normovolêmicos: 42 ± 6 %, figura 10, $p < 0,05$) e não promoveu alterações na FC (-3 ± 3 bpm; vs. normovolêmicos: -3 ± 2 bpm, figura 9B) e na ANF ($0,2 \pm 1$ %; vs. normovolêmicos: -3 ± 1 mmHg %, figura 11).

A injeção intravenosa de losartan (antagonista dos receptores AT1 da angiotensina II, 1 mg/kg de peso corporal) promoveu queda na PAM (-23 ± 2 mmHg; vs. salina: 3 ± 1 mmHg, figura 9A, $p < 0,05$) sem alterar a FC (-3 ± 2 bpm; vs. salina: -2 ± 2 bpm, figura 9B), a ASNR (20 ± 5 %; vs. salina: -2 ± 2 %, figura 10) e a ANF (1 ± 1 %; vs. salina: -2 ± 2 %, figura 11). A resposta hipotensora após a injeção intravenosa de losartan foi maior após a desidratação extracelular induzida por 24 h de depleção de sódio (-35 ± 3 mmHg; vs. normovolêmico: -23 ± 2 mmHg, figura 9A, $p < 0,05$), e ocorreu uma queda da FC (-10 ± 2 bpm; vs. normovolêmico: -3 ± 2 bpm, figura 9B, $p < 0,05$) quando comparado aos ratos normovolêmicos. A desidratação extracelular não alterou a resposta da ASNR e ANF após o bloqueio dos receptores AT1 de angiotensina com losartan.

A figura 9A mostra que dez minutos após o bloqueio de receptores AT1 em ratos anestesiados normovolêmicos a resposta pressora após a injeção iv de ANG II foi reduzida (4 ± 2 mmHg; vs. ANG II antes de losartan: 43 ± 3 mmHg, figura 9A, $p < 0,05$) assim como a queda na ASNR (4 ± 7 %; vs. ANG II antes de losartan: -42 ± 6 %, figura 10, $p < 0,05$), sem alterar a FC (2 ± 3 bpm; vs. ANG II antes de losartan: -3 ± 2 bpm, figura 9B) e a ANF (1 ± 2 %; vs. ANG II antes de losartan: -3 ± 1 %, figura 11). Após a desidratação extracelular a resposta pressora da ANG II se manteve atenuada (10 ± 1 mmHg; vs. normovolêmico: 4 ± 2 mmHg, figura 9A, $p < 0,05$) assim como a ASNR (-10 ± 2 %; vs. normovolêmico: 4 ± 7 %, figura 10, $p < 0,05$) sem alterar a FC (-2 ± 2 bpm; vs. normovolêmico: 2 ± 3 bpm, figura 9B) e a ANF ($-0,1 \pm 1$ %; vs. normovolêmico: 1 ± 2 %, figura 11).

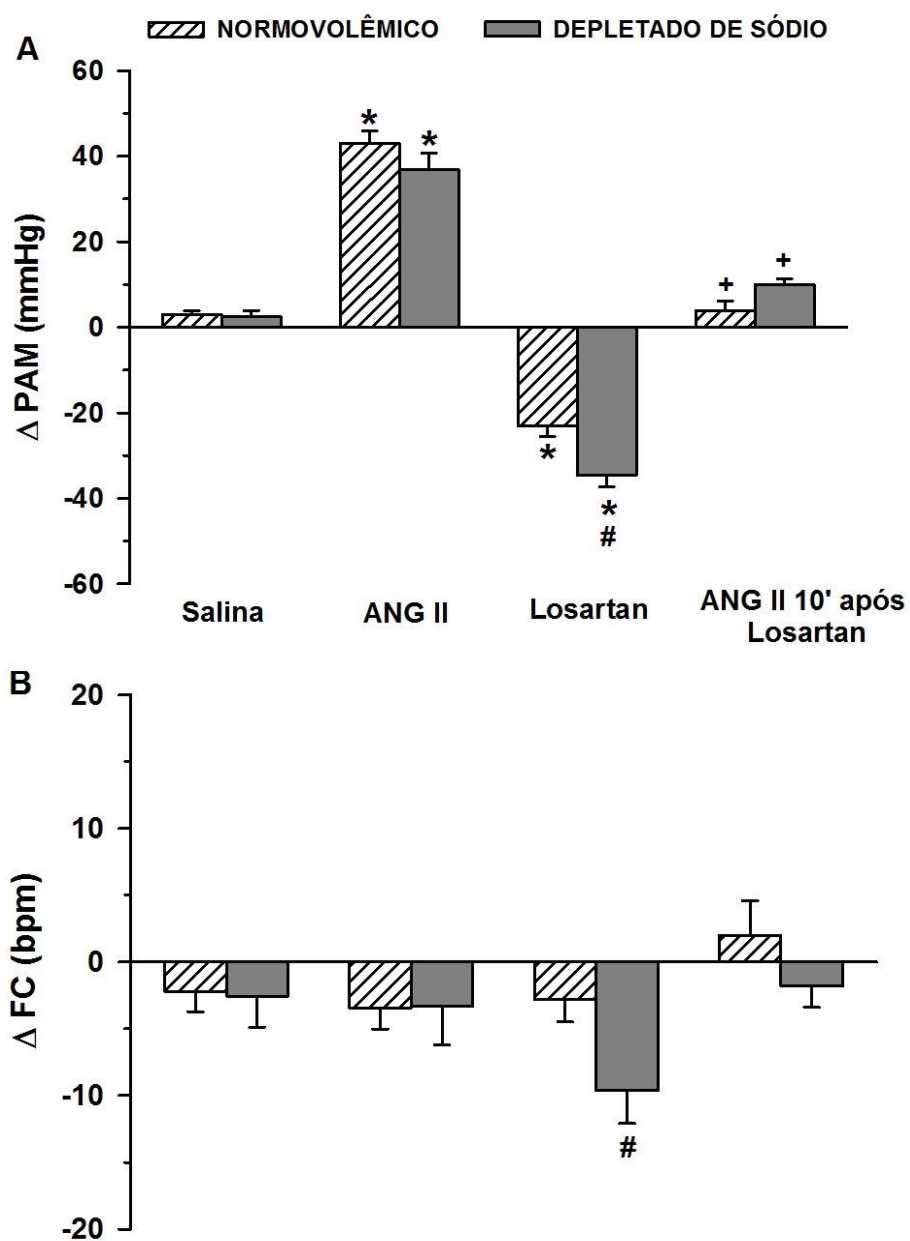


Figura 9: Variações da pressão arterial média (Δ PAM, mmHg, painel A) e frequência cardíaca (Δ FC, bpm, painel B) em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida) em resposta à injeção intravenosa de angiotensina II (ANG II, 50 ng/0,1 mL) e losartan (1 mg/kg/mL). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8-12. * diferente de salina; # diferente do normovolêmico; + diferente de ANG II antes do losartan.

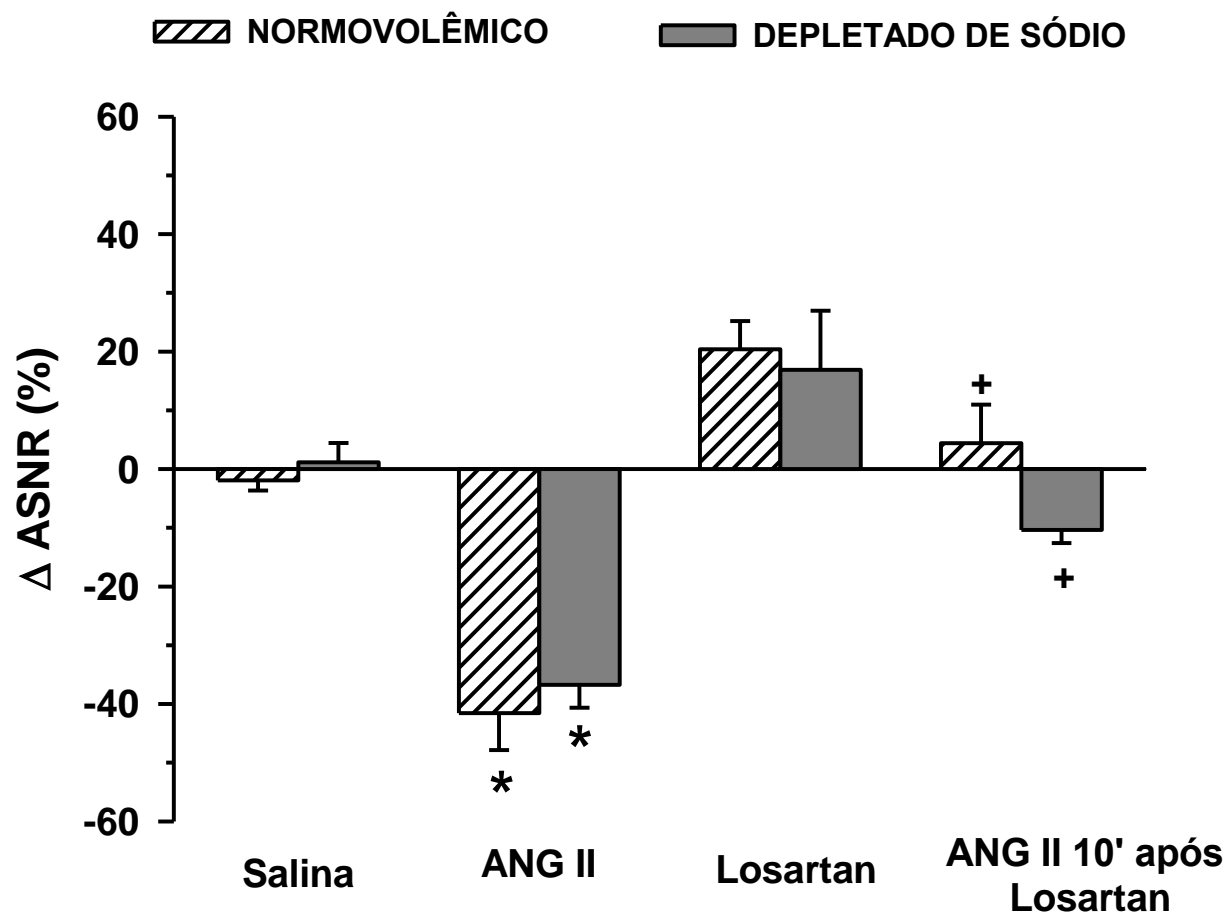


Figura 10: Variações da atividade simpática do nervo renal (Δ ASNR, % do basal) em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida) em resposta à injeção intravenosa de angiotensina II (ANG II, 50 ng/0,1 mL) e losartan (1 mg/kg/mL). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 8-12. * diferente de salina; + diferente de ANG II antes do losartan.

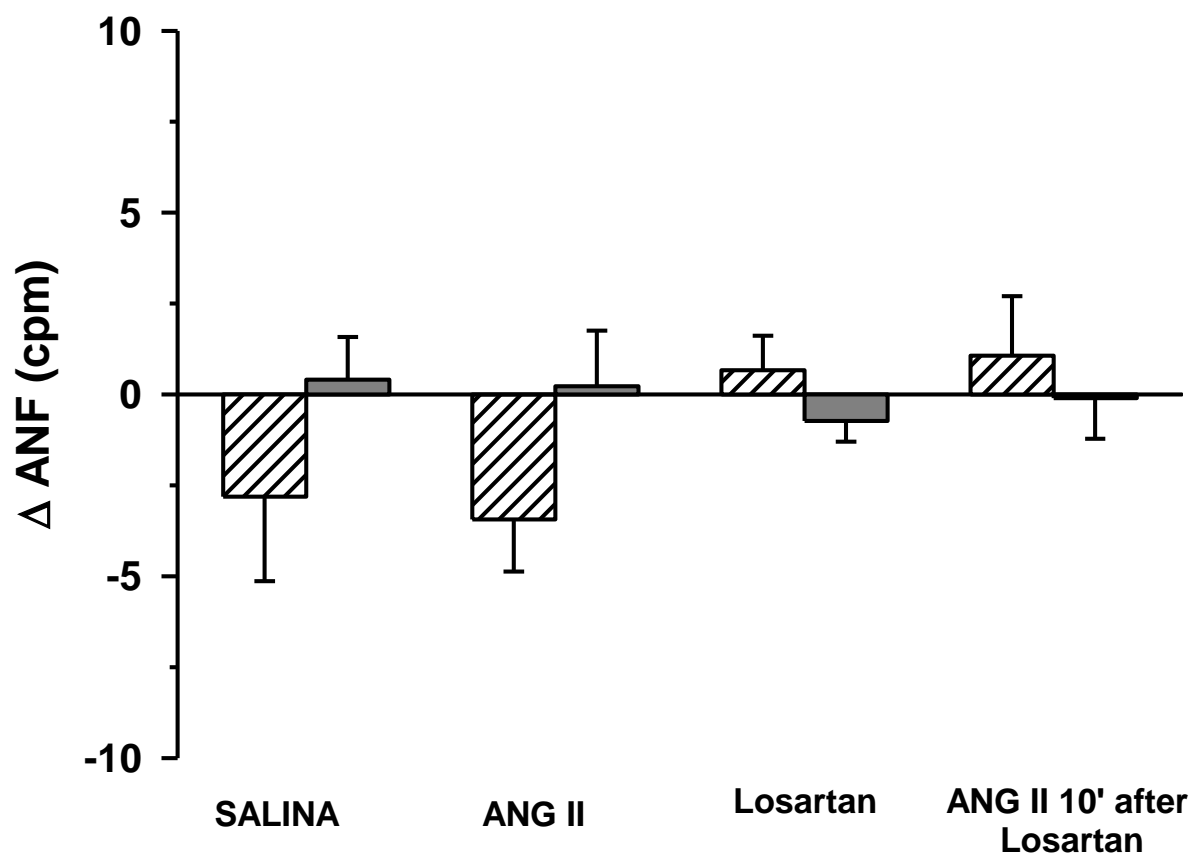


Figura 11: Variações da atividade do nervo frênico (Δ ANF, % do basal) em ratos anestesiados normovolêmicos e depletados de sódio (desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida) em resposta à injeção intravenosa de angiotensina II (ANG II, 50 ng/0,1 mL) e losartan (1 mg/kg/mL). Resultados expressos como média \pm EPM. n = 7-10.

6 DISCUSSÃO

Nossos resultados mostraram que a desidratação intracelular induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M promove um aumento na PAM sem alterar a FC e a VE. Pereira e cols. (2002) mostraram que animais com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M tiveram um aumento da concentração de sódio e osmolaridade em 5% e uma redução da atividade da renina plasmática em 50%, sugerindo que esse aumento da osmolaridade ativa os osmorreceptores centrais localizados em áreas prosencefálicas, como o núcleo supraóptico e a região antero-ventral do 3º ventrículo (AV3V), induzindo a sede, bem como respostas hormonais (liberação de vasopressina e ocitocina), renais (antidiurese e natriurese) e cardiovasculares (hipertensão e ativação simpática). Neste sentido, estudo de Garcia-Estan e cols., (1989), que também estudaram a desidratação intracelular induzida por infusão de NaCl 1,5 M também observaram um aumento da pressão arterial, que foi reduzida após a administração intravenosa do antagonista de vasopressina e de hexametônio (bloqueador ganglionar), sugerindo que esta hipertensão ocorre em consequência do aumento da resistência periférica total devido ao efeito vasoconstritor da vasopressina e ao aumento da atividade simpática. Blanch e cols. (2013) também mostraram que a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M em animais com lesão no NTS comissural produz uma resposta pressora que foi abolida com o pré-tratamento com o antagonista de vasopressina, sugerindo também que esta resposta pressora é dependente de vasopressina. Outro estudo (Akins e Bealer, 1990) sugere que as histaminas endógenas do encéfalo também contribuem para a resposta pressora em animais com desidratação intracelular induzida por infusão de salina hipertônica (NaCl 2,5 M). Neste estudo os autores mostraram que a resposta pressora foi abolida de maneira dose-dependente após a injeção intracerebroventricular de antagonista de histamina.

Assim, o conjunto destes resultados mostra que os parâmetros cardiovasculares já foram bastante estudados em animais com desidratação intracelular, mas com relação aos parâmetros respiratórios, nosso trabalho foi o primeiro a registrar essas medidas. Nossos resultados mostraram que não ocorreram alterações significativas no VC, fR e VE dos animais com desidratação intracelular. Estes resultados diferem dos achados prévios de Favero (2012), onde mostramos que a desidratação extracelular induzida pela administração de furosemida (s.c.) seguida de 24 h de dieta deficiente em sódio promoveu um aumento na VE, e esta hiperventilação foi devida a um aumento no VC sem alterar a fR. Assim, esses resultados nos mostram que as alterações respiratórias ocorrem na desidratação extracelular (modelo em que ocorre uma elevação dos níveis de ANG II), mas não na desidratação intracelular (modelo em que ocorre uma elevação dos níveis de vasopressina), sugerindo que a ANG II poderia estar levando a esta hiperventilação, porém mais estudos serão necessários para elucidar essa questão.

Nossos resultados também mostraram que nestes animais com desidratação intracelular ocorreu uma queda na concentração de bicarbonato e na concentração de potássio plasmático e um aumento na concentração de sódio e na osmolaridade plasmática, sem alterar os gases sanguíneos e o hematócrito. Esses resultados corroboram com Pereira e cols., 2002, que mostraram que a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M produz queda na concentração de potássio plasmático e um aumento na concentração de sódio e na osmolaridade, e também uma diminuição da atividade da renina plasmática, promovendo assim a ingestão tanto de água quanto de salina isotônica nesses animais. Uma possível explicação para que esses animais com desidratação intracelular não apresentem alterações nos parâmetros ventilatórios foi devido aos valores normais dos gases sanguíneos. Estudos da literatura (Nattie e Li, 2009) mostram que alterações na

ventilação ocorrem devido a alterações nos gases sanguíneos, então nestes animais como não ocorreram alterações nos gases sanguíneos também não observamos alterações na ventilação.

Nossos resultados também mostraram que os animais com desidratação mista, induzida por 24 h de privação hídrica, apresentaram um aumento da PAM e do VC, sem modificar a FC, a fR e a VE. Após a reidratação destes animais, a PAM e o VC retornaram aos valores basais. Estudo de Scrogin e cols. (2002) também mostrou que 48 h de privação hídrica (desidratação mista) promove um aumento da PAM e da osmolaridade, no entanto, outro trabalho do mesmo laboratório (Freeman e Brooks, 2007), utilizando o mesmo modelo de desidratação mista (privação hídrica de 48 h), mostrou que a PAM não se alterava e que a manutenção da PAM é devido a um aumento da ativação de receptores glutamatérgicos ionotrópicos do PVN, pois a injeção de kinurênico (antagonista de receptor glutamatérgico ionotrópico) no PVN diminui rapidamente a pressão arterial em relação aos ratos normohidratados. Assim, o mecanismo envolvido para o aumento da pressão arterial nesses animais com desidratação mista ocorre devido a um aumento da neurotransmissão glutamatérgica do PVN para o RVL.

Estudo de Holbein e Toney (2013) em animais anestesiados submetidos também a 48 h de privação hídrica mostraram que esses animais não apresentavam alterações na PAM, apesar de apresentarem um aumento da atividade simpática splâncnica, e também não observaram alterações na amplitude de disparo do nervo frênico, ou seja, não há diferença na ventilação desses animais, o que corrobora com nossos achados onde não verificamos diferença na ventilação devido a um balanço entre o aumento do VC e a tendência de queda da fR.

Nossos resultados mostraram que a desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica promoveu um aumento das proteínas totais e da osmolaridade (o que indica a eficácia do

método para induzir a desidratação mista) e também uma queda na pressão parcial de gás carbônico e na concentração de bicarbonato plasmático, sem alterar o pHa, a pressão parcial de oxigênio, hematócrito e concentrações de sódio e potássio plasmáticos. A reidratação foi capaz de reestabelecer a concentração de proteínas totais e a osmolaridade, mas diminuiu o hematócrito, mostrando que ao ingerir água e solução sódio hipertônica, por 2 h, este animal foi capaz de recuperar sua volemia e a osmolaridade (Antunes-Rodrigues e cols., 2008). No entanto, a diminuição do hematócrito após a reidratação pode ser devido ao excesso de ingestão de água por estes animais e a transferência deste excesso de líquido para o lúmen do intestino levando a esta diminuição (Pereira e cols., 2002).

De acordo com dados da literatura nossos resultados mostraram também que injeções unilaterais de L-glutamato e do agonista de receptor glutamatérgico NMDA no NTS de ratos não anestesiados normohidratados produziram respostas pressoras e bradicardias. Após 24 h de privação hídrica, as respostas pressoras produzidas pelas injeções unilaterais de L-glutamato e de NMDA no NTS foram reduzidas, assim como a bradicardia produzida por injeção de NMDA no NTS e sem alteração na bradicardia produzida por L-glutamato no NTS. Após a reidratação, as respostas pressoras do L-glutamato e NMDA no NTS permaneceram reduzidas, bem como a bradicardia produzida pela injeção de NMDA no NTS. Esses resultados sugerem que a desidratação mista altera as respostas cardiovasculares à ativação dos receptores glutamatérgicos do NTS com L-glutamato e NMDA. Estudos de Bardgett e cols. (2014) mostraram que animais com desidratação mista (48 h de privação hídrica) apresentaram alteração da recaptação de glutamato no PVN, pois a injeção do bloqueador do transportador de glutamato no PVN atenuou as respostas simpatoexcitatórias promovidas por glutamato nesses animais, mostrando que uma menor recaptação de glutamato leva a alterações nas respostas a ativação glutamatérgica no PVN

de animais com desidratação mista. Sendo assim, nossos animais com desidratação mista também poderiam apresentar essas alterações na recaptção de glutamato no NTS, o que poderia justificar a redução das respostas pressoras e bradicárdicas à ativação dos receptores glutamatérgicos do NTS destes animais. Além disso, estudo imunistoquímico (Decavel e Curras, 1997) mostrou que a manutenção de animais com NaCl 2% promove um aumento da osmolaridade, similar ao que ocorre na desidratação mista, ocorrendo um aumento da densidade de receptores NMDA no PVN. Este trabalho sugere que os receptores glutamatérgicos NMDA do PVN estão envolvidos na regulação do balanço hidroeletrólítico e podem representar uma resposta fisiológica adaptativa a ativação de áreas como o PVN em situações de desidratação (Decavel e Curras, 1997). Desta forma, nossos resultados de diminuição da resposta pressora poderiam ser explicados devido a uma diminuição da expressão de receptores glutamatérgicos no NTS, no entanto, estudos anatômicos e imunistoquímico serão necessários para a comprovação desta hipótese.

Nosso estudo anterior (Favero, 2012) também mostrou alterações na neurotransmissão glutamatérgica de animais com desidratação extracelular induzida pela injeção subcutânea de furosemida seguida de 24 h de dieta deficiente em sódio, foi observado uma redução da resposta pressora produzida pela ativação glutamatérgica no NTS, o mesmo ocorreu neste trabalho, com a desidratação mista, onde a ativação de receptores glutamatérgicos com o L-glutamato, ou a injeção do NMDA tiveram uma resposta pressora diminuída em animais desidratados.

A injeção de AP5 (antagonista de receptores NMDA) no NTS de animais normohidratados, desidratados e reidratados não promoveu alterações nos parâmetros cardiorrespiratórios mas foi capaz de bloquear as alterações cardiorrespiratórias promovidas pela injeção de NMDA no NTS. Diferentes dos nossos resultados, Bardgett e cols., 2014, mostraram que em animais com desidratação mista (privação hídrica de 48 h) e anestesiados a injeção de

AP5 no PVN reduziu a atividade simpática renal e a pressão arterial e não teve efeito em animais eu hidratados. Holbein e Toney (2015) também mostrou que em animais anestesiados que receberam infusão de salina hipertônica intracarótida que leva a uma desidratação intracelular apresentaram um aumento da pressão arterial, da atividade simpática splâncnica, da atividade do nervo frênico e da osmolaridade e que o bloqueio de receptores NMDA com AP5 no PVN atenua essas respostas sem alterar o aumento da osmolaridade nesses animais.

Nossos resultados mostraram ainda que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA com o antagonista, AP5, atenuou as respostas cardiovasculares promovidas pela injeção de NMDA no NTS, sem alterar as respostas cardiovasculares promovidas pela injeção do L-glutamato no NTS. A resposta pressora e a bradicardia após a injeção de NMDA no NTS de ratos não anestesiados foram atenuadas aos 5 e 30 minutos após a injeção do antagonista AP5, em todas as situações testadas, normohidratado, desidratado e reidratado. Observamos também que a resposta pressora a injeção de L-glutamato 15 minutos após o AP5 não foi alterada em todas as situações testadas, normohidratado, desidratado e reidratado, e a bradicardia foi atenuada apenas nos animais normohidratados. Além disso, nossos resultados também mostraram que a injeção de L-glutamato no NTS de animais normohidratados promoveu hiperventilação devido ao aumento do VC, sem alterar a fR, e a desidratação mista bem como a reidratação, não modificaram essa hiperventilação. A injeção de NMDA no NTS de animais normohidratados não promoveu alterações significantes na VE, pois ocorreu aumento do VC e queda na fR. A desidratação mista, bem como a reidratação, não alteraram a ventilação produzida pela injeção de NMDA no NTS. Desta forma, nossos resultados mostram que a desidratação mista atenuou as respostas pressoras, mas não a hiperventilação, induzidas pela ativação dos receptores glutamatérgicos no NTS, sugerindo mecanismos diferentes para o aparecimento destas respostas. Diferente desses

resultados, Favero, 2012, mostrou que a desidratação extracelular atenua tanto a resposta pressora e como a hiperventilação produzida pela injeção de L-glutamato no NTS, sugerindo que os mecanismos hormonais envolvidos em cada tipo de desidratação (mista e extracelular) ativam os sistemas cardiovascular e respiratório de forma diferente.

Discussão dos resultados referentes aos animais anestesiados

Nossos resultados mostraram que os animais anestesiados com desidratação extracelular, promovida pela injeção subcutânea do diurético/natriurético furosemida seguida da manutenção da dieta deficiente em sódio, não apresentam alterações na PAM, FC basais, nem na atividade do nervo simpático renal, nem na atividade do nervo frênico. Os resultados também mostraram que esses animais com desidratação extracelular apresentaram um aumento do hematócrito (comprovando a hipovolemia) e diminuição da concentração plasmática de sódio e potássio. Estudos anteriores de Favero, 2012, também mostraram, em animais submetidos ao mesmo modelo de desidratação extracelular, porém não anestesiados, que também não ocorreu alterações na PAM e FC basais, mas estes animais apresentaram aumento significativo da VE basal. Assim, a principal diferença entre os animais anestesiados e não anestesiados foi vista nos parâmetros ventilatórios, mas não cardiovascular, sugerindo que a anestesia pode estar deprimindo eventuais alterações na atividade do nervo frênico. Desta forma, ainda não conseguimos elucidar qual o significado fisiológico deste aumento da VE em animais não anestesiados com desidratação extracelular.

O principal achado do nosso estudo foi que a injeção iv de losartan (antagonista de receptores AT1) diminuiu mais a PAM em animais com a desidratação extracelular do que em animais normovolêmicos, sem alterar a FC, sugerindo que a PAM neste tipo de desidratação é mantida por fatores humorais como a ANG II circulante, sem alterar a atividade simpática renal e nem na atividade do nervo frênico. Esses resultados estão de acordo com vários trabalhos da literatura (De Luca Jr. e cols., 2000; DiBona e Sawin, 1985; Brosnihan e cols., 1981, Rowland, 2007) que mostraram que neste tipo de desidratação extracelular ocorre um aumento da atividade do sistema

renina-angiotensina, resultando em um aumento da ANG II circulante, que auxilia na manutenção da PAM e FC em níveis normais.

Nossos resultados também mostraram que a injeção intravenosa de ANG II em ratos anestesiados produziu resposta pressora e queda na atividade simpática do nervo renal (ASNR) e não alterou a frequência cardíaca, nem a atividade do nervo frênico (ANF). A desidratação extracelular não alterou a resposta pressora produzida pela injeção intravenosa de ANG II, nem a queda na ASNR e não promoveu alterações na FC e na ANF. No entanto, diferente destes resultados, estudo de Colombari e cols., 1992, mostraram em animais não anestesiados e com desidratação extracelular que a resposta pressora à injeção intravenosa e central de ANG II foi reduzida, sugerindo que as alterações de volemia que ocorre durante a desidratação extracelular prejudiquem os mecanismos envolvidos na resposta pressora mediada pela ativação periférica e central de ANG II. Desta forma, essa diferença nos resultados pode ser devido à anestesia.

Outro fator que poderia contribuir para a manutenção dos parâmetros cardiovasculares basais nos animais com desidratação extracelular seria um aumento da atividade simpática. Nossos resultados mostraram que não ocorreram alterações na atividade simpática renal nos animais com desidratação extracelular, pois verificamos que a queda na pressão arterial em resposta ao hexametônio (bloqueador ganglionar) foi similar tanto nos animais desidratados quanto nos animais normovolêmicos, sugerindo indiretamente que a atividade simpática é igual em ambos os grupos. Estudo de Phillips (1987) demonstrou que a ANG II pode manter os níveis de PA basais não somente por sua ação vasoconstrictora, mas também por atuar no PVN e RVL aumentando a atividade simpática, no entanto, no presente estudo o aumento da ANG II circulante nos animais com desidratação extracelular não foi capaz de alterar a atividade simpática.

Nossos resultados também mostraram em animais anestesiados e com desidratação extracelular que não ocorreram alterações na atividade do nervo frênico (tanto da frequência quanto da amplitude dos disparos). Resultados prévios em animais acordados com desidratação extracelular (Favero, 2012), mostraram que esses animais apresentavam um aumento da ventilação basal devido a um aumento do VC sem alterar a fR, porém os mecanismos que promovem essa hiperventilação basal ainda não foram elucidados. Um possível mecanismo seria por aumento da atividade do nervo frênico, porém o presente resultado mostra que não ocorrem alterações na atividade do nervo frênico. Assim, essa ausência de alteração na ANF poderia ser explicada devido ao fato do animal estar anestesiado e com aporte de 100% de oxigênio durante o experimento. Sabe-se que neste tipo de desidratação com o uso do diurético furosemida ocorre a depleção de sódio e de potássio, e estudos de Girard e cols., 1984, mostraram que a restrição de potássio altera significativamente a frequência respiratória. No entanto, estudo preliminar de nosso laboratório mostrou que a reposição de sódio e potássio nos animais com desidratação extracelular não alterou a hiperventilação basal destes animais, mostrando que as concentrações plasmáticas destes íons não estão envolvidas nestes mecanismos e assim mais estudos são necessários para esclarecer qual o significado destas alterações respiratórias durante a desidratação extracelular em animais não anestesiados.

7 SUMÁRIO

Nossos resultados mostraram:

- 1) Em ratos não anestesiados e com desidratação intracelular:
 - Aumento na PAM, sem alterar a FC e a VE.
 - Redução das concentrações de bicarbonato e potássio plasmático, e um aumento no sódio plasmático e na osmolaridade, sem alterações na gasometria.
- 2) Em ratos não anestesiados e com desidratação mista (intracelular e extracelular):
 - Aumento da PAM e do VC, sem modificar a FC, a fR e a VE e após a reidratação destes animais, a PAM e o VC retornaram aos valores basais.
 - Aumento das proteínas totais e da osmolaridade e também uma queda na pressão parcial de gás carbônico e na concentração de bicarbonato plasmático, sem alterar o pHa, a pressão parcial de oxigênio, hematócrito e concentrações de sódio e potássio plasmáticos. A reidratação foi capaz de reestabelecer a concentração de proteínas totais e a osmolaridade, e diminuiu o hematócrito.
 - Injeções unilaterais de L-glutamato e do agonista de receptor glutamatérgico NMDA no NTS de ratos normohidratados produziram respostas pressoras e bradicardias. Após 24 h de privação hídrica, as respostas pressoras produzidas pelas injeções unilaterais de L-glutamato e de NMDA no NTS foram reduzidas, assim como a bradicardia produzida por injeção de NMDA no NTS e sem alteração na bradicardia produzida por L-glutamato no

NTS. Após a reidratação, as respostas pressoras do L-glutamato e NMDA no NTS permaneceram reduzidas, bem como a bradicardia produzida pela injeção de NMDA no NTS.

- Injeções unilaterais de L-glutamato antes do bloqueio de receptores NMDA com AP5, no NTS de ratos não anestesiados normohidratados produziram hiperventilação, sendo que essa hiperventilação foi devido a um aumento do volume corrente, sem alterar a frequência respiratória. A desidratação mista induzida por 24 h de privação não modificou a hiperventilação produzida pela injeção unilateral de L-glutamato no NTS. Após a reidratação, a hiperventilação não foi alterada.
- Injeções unilaterais de NMDA no NTS de ratos não anestesiados normohidratados não alterou a ventilação, devido a um aumento do volume corrente e uma queda na frequência respiratória. A desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica também não alterou a ventilação produzida pela injeção unilateral de NMDA no NTS. Após a reidratação, a injeção do NMDA no NTS não alterou a ventilação

3) Em ratos anestesiados e com desidratação extracelular:

- Não apresentam alterações na PAM, FC basais, nem na atividade do nervo simpático renal, nem na atividade do nervo frênico.
- Aumento do hematócrito e diminuição da concentração plasmática de sódio e potássio.
- A injeção iv de losartan (antagonista de receptores AT1) diminui mais a PAM em animais com a desidratação extracelular do que em animais normovolêmicos, sem alterar a FC.

- A injeção iv de ANG II em ratos anestesiados produziu resposta pressora e queda na atividade simpática do nervo renal e não alterou a frequência cardíaca, nem a atividade do nervo frênico.

8 CONCLUSÃO

Os resultados sugerem que alterações na composição e no volume dos líquidos corporais alteram os parâmetros cardiovasculares em animais não anestesiados com desidratação intracelular induzida por infusão intragástrica de NaCl 2M, além disso alteram os parâmetros cardiorrespiratórios em animais não anestesiados com desidratação mista induzida por 24 h de privação hídrica, bem como a neurotransmissão glutamatérgica no NTS. Além disso, animais anestesiados com desidratação extracelular induzida pela injeção s.c. de furosemida seguida de 24 h de dieta deficiente em sódio, não apresentaram alterações na atividade do nervo frênico nem mesmo na atividade do nervo simpático renal, portanto mais estudos serão necessários para elucidar o mecanismo que está envolvido com a alteração da ventilação em animais não anestesiados com desidratação extracelular.

9 REFERÊNCIAS

1. Adachi A. Projection of the hepatic vagal nerve in the medulla oblongata. *J Auton Nerv Syst.* 1984; 10: 287-93.
2. Akins VF, Bealer SL. Brain histamine regulates pressor responses to peripheral hyperosmolality. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1990, 259:R507-R513.
3. Almado CEL, Machado BH. Respiratory and autonomic responses to microinjection of NMDA and AMPA into the commissural subnucleus of the NTS of awake rats. *Brain Research.* 2005, 1063: 59 – 68
4. Antunes VR, Bonagamba LGH, Machado BH. NMDA receptor antagonism blocks the cardiovascular responses to microinjection of trans-ACPD into the NTS of awake rats. *Clin Expental Physiol.* 2004; 89.3: 279-286.
5. Antunes-Rodrigues J, Castro M, Elias LL, Valenca MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev.* 2004; 84: 169-208.
6. Antunes-Rodrigues J, Elias LLK, Castro M, De Luca Jr. LA, Vivas LM, Menani JV. Regulação do Balanço Hidroeletrólítico. In Guanabara Koogan (ed.) *Fisiologia 3ª Edição.* 2008, p.1119-1136.
7. Bardgett ME, Chen QH, Guo Q, Calderon AS, Andrade MA, Toney GM. Coping with dehydration: sympathetic activation and regulation of glutamatergic transmission in the hypothalamic PVN. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014, 306: 804–813.
8. Barraco R, El-Ridi M, Ergene E, Parizon M, Bradley D. An atlas of the rat subpostremal nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull.* 1992; 29: 703–65.
9. Bartlett D Jr, Tenney SM. Control of breathing in experimental anemia. *Resp Physiol.* 1970; 10: 384-95.
10. Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Murphy D, Paulin RF, Antunes-Rodrigues J, Colombari E, Menani JV, Colombari DSA. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved

in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013, 304: 531–542.

11. Bourque CW, Oliet SH. Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1997; 59: 601-19.

12. Braga VA, Antunes VR, Machado BH. Autonomic and respiratory responses to microinjection of L-glutamate into the commissural subnucleus of the NTS in the working heart-brainstem preparation of the rat. *Brain Res.* 2006; 1093: 150-60.

13. Brizzee BL, Harrison-Bernard L, Pretus HA, Clifton GG, Walker BR. Hemodynamic responses to vasopressinergic antagonism in water-deprived conscious rats. *Am J Physiol.* 1988, 255:46-51.

14. Brooks VL, Qi Y, O'Donoghue TL. Increased osmolality of conscious water-deprived rats supports arterial pressure and sympathetic activity via a brain action *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2005, 288:1248-1255.

15. Brosnihan KB, Szilagyi JE, Ferrario CM. Effect of chronic sodium depletion on cerebrospinal fluid and plasma catecholamines. *Hypertension.* 1981; 3: 233-9.

16. Ciriello J, Hochstenbach SL, Roder S. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferents fibers in the rat. In: Barraco I, editor. *Nucleus of the solitary tract.* Florida: Boca Raton; 1994. p. 35-50.

17. Colombari DSA, Colombari C, Saad WA, Camargo LAA, Renzi A, De Luca Jr LA, et al. Effect of furosemida treatment on the central and peripheral pressor responses to cholinergic and adrenergic agonists, angiotensin II, hypertonic solution and vasopressina. *Neurosci lett.* 1992; 143: 255-8.

18. Colombari DSA, Colombari E, Freiria-Oliveira AH, Antunes VR, Yao ST, Hindmarch C, Ferguson AV, Fry M, Murphy D, Paton JFR. Switching control of sympathetic activity from forebrain to hindbrain in chronic dehydration. *J Physiol.* 2011, 589-18: 4457–4471.

19. Colombari E, Bonagamba LG, Machado BH. Mechanisms of pressor and bradycardic responses to L-glutamate microinjected into the NTS of conscious rats. *Am J Physiol.* 1994; 266: R730-8.
20. Cottle MA. Degeneration studies of the primary afferents of IXth and Xth cranial nerves in the cat. *J Comp Neurol.* 1964; 122: 329-45.
21. Dampney RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol Rev.* 1994; 74: 323-64.
22. De Luca Jr LA, Vendramini RC, Pereira DTB, Colombari DSA, David RB, De Paula PM, Menani JV. Water deprivation and the double depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2007, 40: 707-712.
23. De Luca Jr LA, Xu Z, Schoorlemmer GH, Thunhorst RL, Beltz TG, Menani JV, Johnson AK. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002, 282-2 : 552-9.
24. De Luca Jr LA, Sugawara AM, Menani JV. Brain versus peripheral angiotensin ii receptors in hypovolaemia: behavioural and cardiovascular implications. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 2000, 27: 437-442.
25. de Oliveira LB, Callera JC, De Luca LA Jr, Colombari DS, Menani JV. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. *Brain Res Bull.* 2007; 73: 238-47.
26. de Oliveira LB, De Luca LA Jr, Menani JV. Moxonidine and central alpha2 adrenergic receptors in sodium intake. *Brain Res.* 2003; 993: 177-82.
27. Decavel C, Curras MC. Increased expression of the n-methyl-d-aspartate receptor subunit, NR1, in immunohistochemically identified magnocellular hypothalamic neurons during dehydration. *Neuroscience.* 1997, 78-1: 91-202.
28. DiBona GF, Sawin LL. Renal nerve activity in conscious rats during volume expansion and depletion. *Am J Physiol Renal Fluid Electrolyte Physiol.* 1985, 17:15-23.

29. Fanestil DD. Compartmentation of body water. In Narins RG (ed.) *Clinical Disorders of Fluid and Electrolyte Metabolism*. New York: McGraw-Hill. 1994, p. 3-20.
30. Favero MT e De Paula PM. Dissestação de mestrado: Respostas cardiorrespiratórias promovidas pela ativação de receptores glutamatérgicos e purinérgicos no núcleo do trato solitário. 2012.
31. Favero MT, Menani JV, De Paula PM. Alterações respiratórias em ratos depletados de sódio. XVI Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular. 2002.
32. Fitzsimons JT. Physiology and pathology of thirst and sodium appetite. In *The kidney: physiology and pathophysiology*. Raven Press, New York (ed.) Seldin DW & Giebisch G. 1985; pp. 885-901.
33. Fleming TM, Scott V, Naskar K, Joe N, Brown CH, Stern JE. State-dependent changes in astrocyte regulation of extrasynaptic NMDA receptor signaling in neurosecretory neurons. *J Physiol*. 2011, 589-16: 3929–3941.
34. Freeman KL, Brooks VL. AT1 and glutamatergic receptors in paraventricular nucleus support blood pressure during water deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007, 292: 1675–1682.
35. Frigero M, Bonagamba LGH, Machado BH. The gain of the baroreflex bradycardia is reduced by microinjection of NMDA receptor antagonists into the nucleus tractus solitarii of awake rats. *Journal of Autonomic Nervous System*. 2000, 79: 28–33.
36. Garcia-Estar J, Carbonell LF, Garcia-Salom M, Salazar FJ, Quesada T. Hemodynamic effects of hypertonic saline in the conscious rat. *Life Sci*. 1989; 44: 1343-50.
37. Girard P, Polianski J, Brun-Pascaud M, Jelazko P, Henzel D, Pocidal JJ. Ventilatory adaptation to metabolic alkalosis in adult awake potassium restricted rats. *Respiration Physiology*. 1984, 57:23-30.
38. Haber E. The role of renin in normal and pathological cardiovascular homeostasis. *Circulation*. 1976; 54: 849-961.
39. Haberich FJ. Osmorreception in the portal circulation. *Fed Proc*. 1968, 27-5: 1137-41.

40. Haibara AS, Colombari E, Chianca Jr DA, Bonagamba LGH, Machado BH. NMDA receptors in NTS are involved in bradycardic but not in pressor response of chemoreflex. *Am J Physiol.* 1995; 269: H1421–7.
41. Hatzinikolaou P, Gavras H, Brunner HR, Gavras I. Role of vasopressin, catecholamines and plasma volume in hypertonic saline-induced hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1981; 240: 827-831.
42. Holbein WW, Toney GM. Activation of the hypothalamic paraventricular nucleus by forebrain hypertonicity selectively increases tonic vasomotor sympathetic nerve activity. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2015, 308: 351–359.
43. Holbein WW, Toney GM. Sympathetic network drive during water deprivation does not increase respiratory or cardiac rhythmic sympathetic nerve activity. *J Appl Physiol.* 2013, 114: 1689–1696.
44. Huang W, Lee SL, Sjoquist M. Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. *Am J Physiol.* 1995; 268: 634-640.
45. Jalowiec JE. Sodium appetite elicited by furosemide: effects of differential dietary maintenance. *Behav Biol.* 1974; 10: 313-27.
46. Johnson AK, Edwards GL. Neuroendocrinology of thirst: afferent signalling and mechanisms of central integration. In: Ganten D, Pfaff D, editors. *Current Topics in Neuroendocrinology.* Berlin-Heidelberg: Spriger-Verlag. 1990; 149-90.
47. Kraly FK, Kim YM, Dunham LM, Tribuzio RA. Drinking after intragastric NaCl without increase in systemic plasma osmolality in rats. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 1995, 269:1085-1092.
48. Kupfermann I, Kandel ER, Iversen S. Motivational and Addictive States. In McGraw-Hill Companies (ed.) *Principles of Neural Science* 4ª Edição. 2000, 838-853.
49. Lauar MR, Colombari DSA, De Paula PM, Colombari E, Cardoso LM, De Luca Jr LA, Menani JV. Inhibition of central angiotensin ii-induced pressor responses by hydrogen peroxide. *Neuroscience.* 2010, 171:524-530.

50. Lawrence AJ, Jarrott B. Neurochemical modulation of cardiovascular control in the nucleus tractus solitarius. *Prog Neurobiol.* 1996; 48: 21-53.
51. Machado BH e Bonagamba LGH. Microinjection of L-glutamate into the nucleus tractus solitarii increases arterial pressure in conscious rats. *Brain Res.* 1992; 576: 131-8.
52. McKinley MJ, Johnson AK. The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci.* 2004; 19: 1-6.
53. Menani JV, De Luca LA Jr, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am J Physiol.* 1998; 274: R555-60.
54. Menezes MF, Barbosa SP, De Andrade CA, Menani JV, De Paula PM. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. *Brain Res.* 2011; 1372: 49-58.
55. Nakanishi S, Nakajima Y, Masu M, Ueda Y, Nakahara K, Watanabe D, Yamaguchi S, Kawabata S, Okada M. Glutamate receptors: brain function and signal transduction. *Brain Res Reviews.* 1998; 26: 230-235.
56. Nattie E, Li A. Central chemoreception is a complex system function that involves multiple brain stem sites. *J Appl Physiol.* 2009, 106: 1464–1466.
57. Nozaki PN, Pereira DT, Moura FV, Menani JV, De Luca LA. Ingestion of hypertonic NaCl vs. palatable drinks by sodium-depleted rats. *Physiol Behav.* 2002; 75: 443-8.
58. Palkovits M, Zaborsky L. Neuroanatomy of central cardiovascular control. Nucleus tractus solitarius: afferent and efferent neuronal connections in relation to baroreceptor reflex arc. In: De Jong W, Provoost AP, Shapiro AP, editors. *Hypertension and brain mechanisms.* Amsterdam: Elsevier; 1977. p. 9-34.
59. Paxinos G, Watson C. *The rat brain in stereotaxic coordinates.* 5th ed. San Diego: Academic Press; 2004.
60. Pereira DT, Vendramini RC, David RB, Nozaki PN, Menani JV, De Luca Jr. LA. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. *Physiol Behav.* 2002; 76: 501-5.

61. Phillips MI. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu Rev Physiol.* 1987, 49: 413-435.
62. Rowland NE. Matching salt intake to physiological need in rats using foraging protocols. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2007, 40:713-720.
63. Sato MA, Yada MM, Renzi A, Camargo LA, Saad WA, Menani JV, et al. Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. *Braz J Med Biol Res.* 1996; 29: 1663-6.
64. Scrogin KE, Mckeogh DF, Brooks VL. Is osmolality a long-term regulator of renal sympathetic nerve activity in conscious water-deprived rats? *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.* 2002, 282: 560–568.
65. Speilman WS, Davis JO. The renin-angiotensin system and aldosterone secretion during sodium depletion in the rat. *Circ Res.* 1974; 35: 615-24.
66. Stocker SD, Simmons JR, Stornetta RL, Toney GM, Guyenet PG. Water deprivation activates a glutamatergic projection from the hypothalamic paraventricular nucleus to the rostral ventrolateral medulla. *The Journal of Comparative Neurology.* 2006, 494:673–685.
67. Stricker EM, Callahan JB, Huang W, Sved AF. Early osmoregulatory stimulation of neurohypophyseal hormone secretion and thirst after gastric NaCl loads. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002; 282: 1710-1717.
68. Stricker EM, Gannon KS, Smith JC. Thirst and salt appetite induced by hypovolemia in rats: analysis of drinking behavior. *Physiology & Behavior.* 1991; 51: 27-37.
69. Takakura AC, Moreira TS, Menani JV, Colombari E. Inhibition of the caudal pressor area reduces cardiorespiratory chemoreflex responses. *Neuroscience.* 2011, 177: 84–92.
70. Talman WT, Perrone MH, Reis DJ. Evidence for L-glutamate as the neurotransmitter of baroreceptor afferents. *Science.* 1980; 209: 813-5.
71. Talman WT. Kynurenic acid microinjected into the nucleus tractus solitaries of rat blocks the arterial baroreflex but not responses to glutamate. *Neurosci Lett.* 1989; 102: 247-52.

72. Van Giersbergen PL, Palkovits M, De Jong W. Involvement of neurotransmitters in the nucleus tractus solitarii in cardiovascular regulation. *Physiol Rev.* 1992; 72: 789-824.
73. Vardhan A, Kachroo A, Sapru HN. Excitatory amino acid receptors in commissural nucleus of the NTS mediate carotid chemoreceptor responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 1993; 264: 41–50.
74. Verbalis JG. Disorders of body water homeostasis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2003; 17: 471–503.
75. Yamamoto K, Eubank W, Franzke M, Mifflin S. Resetting of the sympathetic baroreflex is associated with the onset of hypertension during chronic intermittent hypoxia. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical.* 2013, 173: 22–27.
76. Yamamoto K, Lalley P, Mifflin S. Acute intermittent optogenetic stimulation of nucleus tractus solitarius neurons induces sympathetic long-term facilitation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2014, 308-4: 266-75.
77. Zhang W, Mifflin SW. Excitatory amino acid receptors within NTS mediate arterial chemoreceptor reflexes in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1993; 265: 770-3.