

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO  
DEPARTAMENTO DE FISILOGIA

**SILVIA GRACIELA RUGINSK**

**Efeitos da expansão do volume extracelular sobre a ativação neuronal e secreção hormonal: modulação pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.**

RIBEIRÃO PRETO  
2006

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

SILVIA GRACIELA RUGINSK

**Efeitos da expansão do volume extracelular sobre a ativação neuronal e secreção hormonal: modulação pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.**

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia  
Orientador: Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

RIBEIRÃO PRETO  
2006

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Silvia Graciela Ruginsk

Efeitos da expansão do volume extracelular sobre a ativação neuronal e secreção hormonal: modulação pelo eixo hipotálamo-hipófise adrenal.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Fisiologia

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

**Dedico** este trabalho primeiramente aos meus pais, Walter e Maria Alice, por não terem medido esforços para que eu pudesse chegar até aqui.

Aos meus avós maternos, Amadeu e Helena, *in memoriam*.

Ao meu único irmão Carlos Eduardo, pela presença sempre calma nos momentos em que passei junto à família.

Ao meu namorado Diego, pela compreensão e companheirismo sempre presentes, que fizeram a distância menos dolorosa.

Sem vocês, meu caminho não teria sentido...

**Agradeço** primeiramente a Deus, por ter me concedido a oportunidade de buscar meus sonhos, pela minha saúde e também pelos pequenos obstáculos que Ele sabiamente colocou em meu caminho, que foram essenciais para meu crescimento pessoal.

Ao Prof. Dr. José Antunes Rodrigues, vulgo Chefe, um exemplo não só de vida, mas de dedicação profissional ao ideal de um ensino público de qualidade, vinculado à pesquisa básica desenvolvida de forma ética e séria. Obrigada pela orientação segura e pela amizade.

Aos demais membros da banca pelas sugestões na redação e apresentação deste trabalho.

À Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias, pelas opiniões sempre sensatas e práticas no meu desenvolvimento dentro da pesquisa.

À Profa. Dra. Evelin Capellari Cárnio, da Escola de Enfermagem de Ribeirão Preto, sob a orientação da qual fiz dois anos de iniciação científica durante a minha graduação em Enfermagem. Lembro-me bem quando me disse que ficaria muito feliz se eu escolhesse a pós-graduação...

Às técnicas de laboratório Marina Holanda e Maria Valci do Santos Silva (a requisitada Val), pela amizade e pelo apoio sempre competente na realização de experimentos e dosagens hormonais.

Ao pessoal da Secretaria do Departamento, Elisa M. Aleixo (a primeira-dama), Cláudia B. Vanzela, Fernando C. Rastello e Carlos Belini, pela atenção, determinação e paciência com que sempre me trataram.

Ao Rubens F. de Melo, ou simplesmente Rubinho, pelo apoio técnico com a histologia e microscópio, e também pelas conversas e brincadeiras durante o trabalho no criostato. Aos bioteristas Leonardo Fidélis e Eduardo

Gomes pelo cuidado com os animais e também à Lô, pelo cafezinho que anima diariamente o expediente do departamento.

Aos colegas de laboratório (torçam para eu não ter esquecido de ninguém...): Fabíola, Ernane, Dayane, Kika, Badauê, Renato, Lisandra (a quem devo a experiência prática com imuno-histoquímica), Maria Theresa, Carla, Rodrigo, Maurício, Dani, Bia, Wagner, às novatas Lílian e Andréia, e à aluna de graduação Renata de Carvalho Lourenço, pela ajuda na realização de experimentos e pelas confabulações sempre oportunas na salinha dos computadores.

Em especial, agradeço o apoio de Alexandre Giusti Paiva, ex-colega de laboratório, que me apresentou à Profa. Evelin e foi o responsável por grande parte do conhecimento técnico que adquiri no período de iniciação científica e também no início do mestrado. Você e a Regina tornaram-se grandes amigos dentro e fora do laboratório.

Aos demais colegas do departamento e de fora dele, companheiros de “cursão”, pela troca de experiências e pelas amizades construídas.

Aos demais professores do Departamento de Fisiologia, pelos ensinamentos e pela riqueza de opiniões e experiências que contribuíram para minha formação.

E, finalmente, à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, que financiou este projeto.

*“A mente que se abre a uma nova idéia jamais  
voltará ao seu tamanho original.”*

**Albert Einstein**

**RESUMO**

RUGINSK, S.G. **Efeitos da expansão do volume extracelular sobre a ativação neuronal e secreção hormonal: modulação pelo eixo hipotálamo-hipófise-adrenal.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

A manutenção constante do volume e da composição dos líquidos corporais, definida como homeostase hidreletrolítica, é essencial para a sobrevivência dos organismos. Quando ocorre alguma alteração no meio interno, o organismo promove ativação de mecanismos e vias neurais seletivas para o controle da ingestão e excreção de água e eletrólitos, visando manter a composição e o volume dos líquidos corporais compatíveis com a adequada manutenção das funções orgânicas. Os neurônios magnocelulares, localizados nos núcleos paraventricular (NPV) e o supra-óptico (NSO) do hipotálamo, estão sabidamente envolvidos nos mecanismos que controlam a homeostase hidreletrolítica. Estes núcleos hipotalâmicos são responsáveis pela síntese e liberação dos hormônios vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) que, juntamente com o peptídeo natriurético atrial (ANP), estão envolvidos nas respostas renais a alterações do volume ou da osmolalidade do líquido extracelular (LEC). Além disso, estudos desenvolvidos anteriormente em nosso laboratório sugeriram que essas alterações são estímulos potencialmente estressores, capazes de levar à ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA). Portanto, o presente trabalho visou avaliar o padrão de resposta hormonal e ativação dos neurônios magnocelulares do NPV e NSO no modelo experimental que utiliza a expansão do volume extracelular (EVEC), procurando destacar a participação do eixo HHA na mediação destas respostas. Os resultados

apresentados mostram que a EVEC isotônica (NaCl 0,15M, 2ml/100g p.c., e.v.) promoveu aumento na secreção de OT, ANP e corticosterona, e diminuição na secreção de AVP, enquanto que a EVEC hipertônica (NaCl 0,30M, 2ml/100g p.c., e.v.) promoveu aumento nas concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANP e corticosterona. Ambos os tipos de EVEC também promoveram aumento na ativação de neurônios magnocelulares ocitocinérgicos localizados no NPV e NSO. O pré-tratamento com dexametasona (1mg/kg i.p.), um glicocorticóide sintético, foi capaz de inibir a secreção de OT, bem como a ativação neuronal desencadeada pela EVEC isotônica e hipertônica. A adrenalectomia prévia (5-7 dias antes do experimento), contudo, foi capaz de potencializar a secreção de OT observada em resposta a ambos os tipos de EVEC. Os resultados mostram ainda que a administração prévia de dexametasona não alterou a secreção de AVP em resposta à EVEC isotônica ou hipertônica, apesar de ter exercido um efeito aparentemente inibitório sobre a ativação dos neurônios magnocelulares vasopressinérgicos do NPV e NSO. A adrenalectomia preveniu a queda na secreção de AVP normalmente observada em resposta à EVEC isotônica, não alterando os valores observados em resposta à EVEC hipertônica. Por sua vez, a secreção do ANP não foi modificada pelo pré-tratamento com dexametasona ou pela adrenalectomia prévia. Em conjunto, esses dados sugerem que a ativação do eixo HHA exerce um controle diferenciado sobre a síntese e secreção dos hormônios neuro-hipofisários OT e AVP e que esta ativação não influi no controle da secreção de ANP em resposta à EVEC.

Palavras-chave: Ativação Neuronal, Secreção Hormonal, Expansão do Volume Extracelular, Eixo Hipotálamo-hipófise-adrenal.

**ABSTRACT**

RUGINSK, S.G. **The hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of neuronal activity and hormone secretion induced by blood volume expansion.** Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

Plasma volume and electrolytic composition must be maintained into straight ranges of variation, a state known as homeostasis. When fluid or osmolality disturbances are detected, the organisms selectively activate neural pathways in order to promote appropriate changes in water and sodium ingestion and renal excretion. Many studies have been demonstrating the integrative actions of several hypothalamic nuclei, such as the paraventricular (PVN) and the supraoptic nucleus (SON), in the control of drinking behavior and hidroeletrolytic balance. These are the major sites of production of the neurohypophyseal hormones, vasopressin (AVP) and oxytocin (OT), secreted from magnocellular neurons in response to appropriate stimuli. The atrial natriuretic peptide (ANP) is also known to be involved in the maintenance of sodium balance, playing an essential role in peripheral control of diuresis and natriuresis. Furthermore, there are recent and strong evidences for the participation of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis in the modulation of these responses. So, the present study aimed evaluate the involvement of the HPA axis in the activation of vasopressinergic and oxytocinergic neurons of hypothalamic nuclei and in the plasma levels of AVP, OT, ANP, and corticosterone in response to both isotonic and hypertonic blood volume expansion (BVE). Results show that isotonic BVE (NaCl 0,15M, 2ml/100g b.w., i.v.) increased OT, ANP, and corticosterone concentrations, and decreased

AVP secretion. On the other hand, hypertonic BVE (NaCl 0,30M, 2ml/100g b.w., i.v.) enhanced AVP, OT, ANP, and corticosterone plasma concentrations. Both hypertonic and isotonic BVE induced increases in the number of oxytocinergic neurons activated in PVN and SON. Pre-treatment with dexamethasone (1mg/kg, i.p.), a synthetic glucocorticoid, was able to inhibit OT secretion and cellular activation in response to both types of BVE, while previous bilateral adrenalectomy (5-7 days before the experiment) exerted an additive effect on OT secretion induced by both stimuli. Results also show that previous administration of dexamethasone did not alter the secretion of AVP in response to isotonic or hypertonic BVE, although it was observed an inhibitory effect of this pre-treatment on vasopressinergic neuronal activation induced by the hypertonic stimulus in PVN and SON. Adrenalectomy prevented the decrease on plasma AVP normally induced by isotonic BVE, but no alterations were observed on the secretion of this hormone in response to hypertonic BVE. Finally, the experiments show that the secretion of ANP was not altered by dexamethasone administration or adrenalectomy. In conclusion, these data suggest that the activation of the HPA axis exerts a differentially modulated effect on AVP and OT synthesis and secretion from posterior pituitary terminals. These results also suggest that the HPA axis may not directly control ANP secretion induced by BVE.

Key words: Neuronal Activation, Hormone Secretion, Blood Volume Expansion, Hypothalamic-pituitary-adrenal Axis.

## LISTA DE SIGLAS

ACTH	Hormônio Adrenocorticotrófico
ADX	Adrenalectomizado
ANP	Peptídeo Natriurético Atrial
AP	Área Postrema
AVP	Arginina Vasopressina
AV3V	Região ântero-ventral do 3º ventrículo
CA	Porção comissural anterior do NPV
CRH	Hormônio Liberador de Corticotrofina
DBB	Banda Diagonal de Broca
EM	Eminência Mediana
EVEC	Expansão do Volume Extracelular
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GR	Receptor de Glicocorticóide
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal
LC	Locus Coeruleus
LEC	Líquido Extracelular
LM	Porção lateral magnocelular do NPV
MM	Porção medial magnocelular do NPV
MnPO	Núcleo Pré-óptico Mediano
NPV	Núcleo Paraventricular
NSO	Núcleo Supra-óptico
NTS	Núcleo do Trato Solitário
OT	Ocitocina
OVLT	Órgão Vasculoso da Lâmina Terminal
PF	Paraformaldeído
PRL	Prolactina
RNAm	Ácido Ribonucléico (mensageiro)
SFO	Órgão Subfornicial
SNC	Sistema Nervoso Central

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>25</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
3.1. ANIMAIS .....	28
3.2. CIRURGIAS .....	28
3.2.1. Adrenalectomia .....	28
3.2.2. Canulação da veia jugular .....	29
3.3. EXPANSÃO ISOTÔNICA OU HIPERTÔNICA DO VOLUME EXTRACELULAR .....	30
3.4. DOSAGENS HORMONAIS.....	30
3.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	31
<b>4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS</b> .....	<b>35</b>
<b>Protocolo Experimental 1</b> - Efeitos da EVEC (isotônica e hipertônica) sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP.....	36
<b>Protocolo Experimental 2</b> - Efeitos da administração intraperitoneal prévia de dexametasona sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC (isotônica e hipertônica). .....	37
<b>Protocolo Experimental 3</b> - Efeitos da adrenalectomia sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC (isotônica e hipertônica). .....	37
<b>Protocolo Experimental 4</b> - Efeitos da administração intraperitoneal prévia de dexametasona sobre a expressão da proteína c-fos nos núcleos hipotalâmicos (NPV e NSO), em resposta à EVEC (isotônica ou hipertônica). .....	38
<b>5. RESULTADOS</b> .....	<b>39</b>
<b>Protocolo Experimental 1</b> .....	40
Corticosterona.....	40
Ocitocina .....	41
Peptídeo Natriurético Atrial .....	42
Vasopressina .....	42

<b>Protocolo Experimental 2</b> .....	44
Corticoesterona.....	44
Ocitocina .....	45
Peptídeo Natriurético Atrial .....	46
Vasopressina .....	47
<b>Protocolo Experimental 3</b> .....	49
Corticoesterona.....	49
Ocitocina .....	50
Peptídeo Natriurético Atrial .....	51
Vasopressina .....	52
<b>Protocolo Experimental 4</b> .....	54
4.1 – Ocitocina .....	54
4.2 – Vasopressina .....	63
<b>6. DISCUSSÃO</b> .....	72
<b>7. CONCLUSÕES</b> .....	80
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	82
<b>9. ANEXOS</b> .....	89

## **1. INTRODUÇÃO**

A manutenção constante do volume e da composição dos líquidos corporais, definida como homeostase hidreletrolítica, é essencial para a sobrevivência dos organismos. Nesta condição, o volume total dos líquidos corporais e a quantidade e concentração dos íons permanecem relativamente constantes. A homeostase hidreletrolítica é notável, visto que ocorrem trocas contínuas de líquidos e solutos entre os diferentes compartimentos. Quando alguma alteração no meio interno é detectada por sistemas específicos, o organismo promove a ativação de mecanismos e vias neurais seletivas para o controle da ingestão e excreção de água e eletrólitos, visando manter a composição e o volume dos líquidos corporais compatíveis com a adequada manutenção das funções orgânicas.

As alterações osmóticas e volumétricas são detectadas por dois diferentes tipos de receptores: os osmorreceptores, sensíveis às alterações na osmolalidade plasmática e concentração de sódio, e os barorreceptores, sensíveis a alterações no volume e pressão sanguínea.

Os osmorreceptores estão localizados em várias regiões do Sistema Nervoso Central (SNC), principalmente no órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), órgão subforniclar (SFO) e área postrema (AP) (Sibbald *et al*, 1988; Arima *et al*, 1998). A lâmina terminal é uma estrutura do prosencéfalo que contém o SFO, o OVLT e o núcleo pré-óptico mediano (MnPO). A região ântero-ventral do 3º ventrículo (AV3V) inclui a parte ventral do MnPO, o OVLT e as porções periventriculares do 3º ventrículo. A região AV3V e o SFO contêm neurônios sensíveis às variações da osmolalidade plasmática e do líquido cefalorraquidiano. Estas células neuronais são ativadas por aumento da osmolalidade do líquido extracelular (LEC) e, inversamente, inibidas por

redução nessa osmolalidade. Alterações conformacionais nestas células levam à ativação de neurônios localizados nos núcleos supra-óptico (NSO) e paraventricular (NPV), relacionados à secreção de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) (Oliet e Bourque, 1993). Sabe-se também que lesões da região AV3V, envolvendo a porção ventral do MnPO, determinam adipsia e hipernatremia, reforçando a hipótese da participação dos órgãos circumventriculares no controle do balanço de água e eletrólitos, como sugerida anteriormente por Antunes-Rodrigues e Covian (1963 e 1965). A estimulação osmótica local (NSO) e sistêmica após lesão da região AV3V mostrou que a integridade das aferências provenientes desta região é essencial nas respostas a um estímulo osmótico periférico (Ludwig *et al*, 1996).

Diferentemente dos osmorreceptores, os barorreceptores são estimulados pelo seu estiramento, sendo abundantes no seio carotídeo, na parede do arco aórtico, nas arteríolas renais e na região cardiopulmonar. O aumento da pressão sanguínea ativa receptores localizados nestas estruturas, os quais geram impulsos que atingem o núcleo do trato solitário (NTS), localizado na área bulbar do tronco cerebral; desta região, os impulsos são enviados, por via multissináptica, às estruturas hipotalâmicas e à região AV3V. Foi demonstrado que a estimulação elétrica do NPV provoca a ativação de projeções descendentes para o NTS bem como a secreção de OT e AVP por esta região (Landgraf *et al*, 1990). Há evidências de que a AVP esteja relacionada com o controle da função cardiovascular, modulando a atividade dos neurônios do NTS (Michelin, 1984).

A OT e a AVP são hormônios sintetizados e secretados pelos neurônios magnocelulares do hipotálamo, permanecendo armazenados na neuro-

hipófise, de onde são liberados para a circulação sistêmica. Os axônios destes neurônios partem em direção à neuro-hipófise organizando-se em dois grupos adjacentes: um grupo medial (MM), que apresenta predomínio de neurônios ocitocinérgicos e localiza-se na porção ântero-medial deste núcleo, e um grupo lateral (LM), primariamente vasopressinérgico, com formato arredondado (Hatton *et al*, 1976). Além disso, tem sido descrita a existência de neurônios ocitocinérgicos na porção externa do grupo LM, formando uma borda ao redor da porção vasopressinérgica. Podem ser ainda descritos dois grupos acessórios, o grupo periventricular e o grupo comissural anterior (CA), localizados mais rostralmente (Swanson e Kuypers, 1980; Swanson *et al*, 1986). Por sua vez, os neurônios magnocelulares ocitocinérgicos presentes no NSO estão dispostos ântero-dorsalmente, enquanto que os vasopressinérgicos localizam-se na porção pôstero-ventral. Estudos também sugerem que a distribuição destes hormônios possa ser estímulo-dependente (Mezey e Kiss, 1991).

A OT é um nanopeptídeo que teve suas principais ações inicialmente descritas relacionadas ao trabalho de parto (ação uterotônica) e à ejeção de leite. Os efeitos natriuréticos da OT demonstrados anteriormente (Brooks e Pickford, 1958) envolvem a ativação do sistema GMPc, que determina sua ação natriurética nos túbulos renais, (Soares *et al*, 1999).

Experimentos realizados por Huang *et al* (1995) demonstraram que a OT promove um aumento dose-dependente na natriurese. Entretanto, a elevação das concentrações plasmáticas de OT não explica por si só o aumento na natriurese observado em resposta à infusão intravenosa de salina hipertônica. Estudos mais recentes demonstraram que a OT exerce

adicionalmente uma ação sobre o átrio, estimulando a liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP) (Soares *et al*, 1999). Desta forma, o aumento da osmolalidade do LEC eleva a concentração plasmática de OT que estimula diretamente a liberação deste peptídeo do átrio direito (Antunes-Rodrigues *et al*, 1991), bem como sua ação direta no túbulo renal. Estes achados são consistentes com os experimentos “in vitro” realizados por Favaretto *et al*, (1997). A partir destes estudos foi levantada a hipótese de que a OT não só exerceria suas ações no coração, mas seria sintetizada por este órgão. A comprovação dessa hipótese veio por meio de técnicas de hibridização “in situ” e PCR, demonstrando que receptores para OT eram transcritos neste órgão (Jankowski *et al*, 1998). Além dos efeitos já descritos sobre a secreção de ANP e controle hidrossalino, a OT tem efeitos cronotrópicos e inotrópicos negativos sobre o coração, influenciando sua força de contração e frequência cardíaca (Favaretto *et al*, 1997).

A AVP, por sua vez, é mais conhecida por seu efeito antidiurético e vasoconstritor; porém também possui ação termorreguladora. Seus efeitos são mediados por dois tipos de receptores da família dos receptores ligados à proteína G: receptores  $V_1$ , subdivididos em  $V_{1a}$  e  $V_{1b}$ , e receptores  $V_2$ . Os receptores  $V_{1a}$  estão envolvidos no controle da pressão arterial e nos efeitos centrais da AVP, enquanto que os receptores  $V_{1b}$ , localizados na adeno-hipófise, são responsáveis pela liberação de ACTH. Já os receptores  $V_2$  localizam-se predominantemente nas células principais dos dutos coletores renais, tendo sido encontrados também no hipocampo e no cerebelo. Suas funções estão ligadas ao efeito antidiurético da AVP e, quando ativados, levam à fosforilação da porção carboxiterminal da proteína aquaporina 2 nas células

tubulares do néfron distal, promovendo a reabsorção de água. Injeções intravenosas (Mukoyama *et al*, 1987) e intracerebroventriculares (Elias *et al*, 2000) de AVP provocaram, em ratos, um aumento, dose-dependente, nas concentrações plasmáticas de ANP, mostrando que a AVP tem uma ação estimulatória sobre a secreção desta substância.

Como descrito acima, a hipovolemia e a hiperosmolalidade do LEC aumentam, em ratos, a secreção de AVP e OT. Os dois estímulos exercem efeitos aditivos quando aplicados simultaneamente, entretanto, quando ocorre uma diminuição de 3 a 6% da osmolalidade plasmática verifica-se diminuição da secreção de OT e AVP, mesmo em presença de uma redução de volume plasmático de 30%, mostrando ser o estímulo osmótico preponderante sobre as alterações de volume nestas condições experimentais (Stricker e Verbalis, 1986).

Com o propósito de compreender os mecanismos que modulam a secreção de hormônios envolvidos no equilíbrio hidreletrolítico, foi desenvolvido um modelo experimental baseado na expansão do volume extracelular (EVEC). Demonstrou-se que a expansão do volume do compartimento extracelular com salina isotônica interfere nos mecanismos hemodinâmicos de regulação, por meio do estímulo sistêmico para a liberação de ANP dos cardiomiócitos e da ativação, por via neuroendócrina, de terminais hipotalâmicos responsáveis pela liberação central deste peptídeo. Estudos recentes mostraram que a redução na secreção de AVP por neurônios vasopressinérgicos do NSO e NPV é influenciada pela ativação dos neurônios GABAérgicos presentes na porção perinuclear do NSO e na banda diagonal de Broca (DBB) (Grindstaff e Cunningham, 2001; Renaud *et al*, 1988). Por outro

lado, a EVEC realizada com salina hipertônica promove um aumento na concentração plasmática de AVP, OT e ANP (Haanwinckel *et al*, 1995; Ventura *et al*, 2002; Durlo *et al*, 2004), mostrando ser este um modelo experimental bastante prático para o estudo dos mecanismos envolvidos na secreção destes hormônios nestas condições experimentais.

Também vem sendo considerada uma possível participação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) na modulação da liberação de AVP e OT (McCann *et al*, 2000), uma vez que o estímulo osmótico/volumétrico, por si só, já é considerado um fator estressante, ou seja, capaz de alterar a homeostase do organismo e mobilizar mecanismos de correção. Dadoun *et al* (1999) mostraram que ocorre uma diminuição na liberação do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH) e cortisol em resposta à hipoosmolalidade e/ou hipervolemia, sugerindo uma possível participação desta via nos mecanismos decorrentes de alterações no volume e osmolalidade plasmática.

Estudos realizados em nosso laboratório utilizando o modelo de EVEC hipertônica, em animais previamente tratados com dexametasona (um glicocorticóide exógeno) apresentam diminuição das concentrações plasmáticas de OT, sugerindo que o aumento da liberação deste hormônio em resposta ao estímulo osmótico estaria sendo influenciado pela ativação concomitante da via HHA, e/ou do sistema  $\alpha/\beta$ -adrenérgico, ambos envolvidos nas respostas adaptativas ao estresse. Da mesma forma, vários autores têm sugerindo que esse peptídeo esteja contribuindo para a resposta de adaptação ao estresse (Kasting *et al*, 1988).

Além da OT, a AVP também parece estar envolvida em respostas que medeiam o estresse. Sua integração com o eixo HHA foi demonstrada por

meio de estudos “in vitro” incubando-se a hipófise posterior com extratos da eminência mediana (EM) de ratos; estes estudos levaram à descoberta da ação sinérgica da AVP sobre a liberação de ACTH (McCann e Brobeck, 1954). Demonstrou-se posteriormente, que a produção de AVP e CRH (hormônio liberador de corticotrofina) encontra-se co-localizada em neurônios do NPV e NSO (McCann *et al*, 2000).

Tendo em vista os dados obtidos por Durlo *et al* (2004), torna-se evidente que, nas respostas neuroendócrinas desencadeadas pela EVEC isotônica e hipertônica, ocorre a ativação do eixo HHA, determinada experimentalmente pelo aumento da corticosterona plasmática. Dessa forma, partindo dos dados já conhecidos, este trabalho procurou avaliar, entre outros fatores, os efeitos do pré-tratamento com dexametasona na ativação de grupos neuronais hipotalâmicos sabidamente envolvidos no controle da homeostase hidreletrolítica.

Assim, o uso atual de técnicas de imuno-histoquímica permite considerar a ativação neuronal em áreas restritas do SNC como uma medida direta da atividade de síntese peptídica da área cerebral estudada. A técnica de expressão da proteína c-fos é um método bastante difundido para a análise da ativação neuronal em resposta a um estímulo específico, indicando as áreas envolvidas na ativação de determinado mecanismo fisiológico. Com a utilização desta e de outras técnicas, este trabalho visou contribuir para o delineamento tanto de respostas comportamentais e hormonais, como também vias neuronais envolvidas no controle neural e na ativação do eixo HHA mediante um estímulo hiper ou isoosmótico.

## **2. OBJETIVOS**

O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a modulação exercida pelo eixo HHA sobre a ativação neuronal e secreção de AVP, ANP, OT e corticosterona observada em resposta à EVEC isotônica e hipertônica.

De maneira mais específica, este trabalho objetivou:

- Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal (i.p.) prévia de dexametasona (glicocorticóide sintético) sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC isotônica e hipertônica;
- Avaliar os efeitos da adrenalectomia sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC isotônica e hipertônica;
- Avaliar os efeitos da administração i.p. de dexametasona sobre a ativação neuronal no NPV e NSO em resposta à EVEC isotônica e hipertônica, pela expressão da proteína c-fos e de sua co-localização fenotípica com OT e AVP.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. ANIMAIS**

Foram utilizados ratos machos Wistar, pesando entre 220-280g, provenientes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – USP. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas no Biotério do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina (FMRP – USP), em ambiente com temperatura ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) e luz controlada (das 7 às 19 horas). Após a habituação dos animais por, pelo menos, 72 horas, os mesmos foram submetidos aos procedimentos cirúrgicos e divididos em diferentes grupos experimentais.

Em todos os experimentos os animais foram submetidos a procedimentos experimentais aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal, sob o protocolo nº 039/2004.

### **3.2. CIRURGIAS**

#### **3.2.1. Adrenalectomia:**

A adrenalectomia bilateral (ADX) ou fictícia (Sham) foi realizada sob anestesia por 2,2,2-tribromoetanol (Sigma, 2,5%, 1ml/100g de peso corporal). Os animais foram primeiramente submetidos à tricotomia e, em seguida, uma incisão da pele e do tecido subcutâneo foi realizada na região dorsal para

permitir a visualização da musculatura dorsal do abdômen e do ângulo formado pela última costela torácica. Neste ângulo, fez-se a perfuração da musculatura abdominal para visualização da adrenal, posicionada na face renal anterior. No grupo de animais adrenalectomizados, a gordura peri-renal foi exteriorizada e seccionada juntamente com a adrenal, enquanto que, no grupo submetido somente à cirurgia fictícia, foram realizados os mesmos procedimentos cirúrgicos sem a extração da glândula. Após a adrenalectomia, os animais foram mantidos em gaiolas individuais por 5-7 dias antes da realização do protocolo experimental. Ao grupo de animais adrenalectomizados foi oferecida, além de água, solução de NaCl 0,15M, a fim de permitir ao animal a reposição das perdas eletrolíticas em função da ausência de mineralocorticóides.

### **3.2.2. Canulação da veia jugular:**

No dia anterior ao experimento, os animais foram submetidos à canulação da veia jugular direita, seguindo-se a técnica descrita por Harms e Ojeda (1974). Sumariamente, após a anestesia com 2,2,2-tribromoetanol (Sigma, 2,5%, 1ml/100g de peso corporal), a cânula de silástico foi introduzida na veia jugular externa e, a seguir, exteriorizada na região cervical dorsal, através de trajeto subcutâneo feito com a ajuda de um trocater. Após sua fixação na pele, a cânula foi lavada com solução isotônica contendo heparina na proporção 1:40 (Liquemine, Roche), a fim de evitar obstrução da mesma. A

recuperação dos animais foi realizada em gaiolas individuais, com água e comida *ad libitum*.

### **3.3. EXPANSÃO ISOTÔNICA OU HIPERTÔNICA DO VOLUME EXTRACELULAR**

No dia do experimento, antes de se iniciar o procedimento de expansão do volume, as cânulas foram lavadas com um volume mínimo (aproximadamente 100 $\mu$ l) de salina isotônica contendo heparina (1:40), a fim de testar se estavam corretamente posicionadas e pérvias. A EVEC foi realizada por meio de infusão endovenosa (volume de 2ml/100g de peso corpóreo) de solução de NaCl hipertônica (0,3M) ou isotônica (0,15M), mantida a 37°C, a qual foi administrada durante o período de um minuto. Foram considerados controles os animais nos quais foram realizados os mesmos procedimentos, porém sem EVEC.

### **3.4. DOSAGENS HORMONAIS**

Para a determinação das concentrações plasmáticas de AVP, ANP, OT e de corticosterona, o sangue foi coletado do tronco, após a decapitação, em tubos de plástico, mantidos sob gelo, contendo heparina (Liquemine, Roche,

10µl/ml de sangue) ou inibidores de proteases (EDTA, pepstatina A e PMSF, 10µl/ml de sangue cada). A coleta foi realizada no tempo 5 minutos após a aplicação do estímulo (EVEC isotônica ou hipertônica) ou da manipulação sem EVEC (animais controle). O plasma foi separado por centrifugação (20 minutos, 1,09g, 4°C) e armazenado a -70°C até o momento do processo de extração e das dosagens hormonais, que foram feitas utilizando-se técnicas específicas de radioimunoensaio descritas por Hussain *et al*, (1973), Gutkowska *et al*, (1984), Vecsei (1979) e Castro *et al* (1995), respectivamente.

### **3.5. IMUNO-HISTOQUÍMICA**

Noventa minutos após a indução da EVEC e conforme os protocolos estabelecidos, os animais foram anestesiados com tribromoetanol 2,5% (Sigma, 1ml/100g de peso corporal) e, a seguir, perfundidos através de punção intracardíaca com solução de NaCl 0,15M contendo heparina (Liquemine, Roche, 500UI/l), seguida de uma solução de tampão fosfato (pH 7,2) contendo paraformaldeído (PF) 4%. A seguir, os cérebros foram removidos e mergulhados novamente em PF 4%, para pós-fixação. Depois de 4 horas, eles foram colocados em solução de sacarose a 30% em tampão fosfato a 4°C, onde permaneceram durante, no mínimo, 12-14 horas. A seguir, os tecidos cerebrais foram seccionados em cortes de 30µm de espessura, utilizando-se um criostato (Microm). Imediatamente após foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de metanol e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,03% e também o

bloqueio das ligações inespecíficas utilizando-se soro normal de cavalo (10%) ou albumina bovina (5%).

Posteriormente, para visualização da expressão de c-fos, os cortes foram incubados em temperatura ambiente por 12-14 horas com o anticorpo primário anti-c-fos (Ab-5, Calbiochem, 1:10000, nº cat. PC38) e, a seguir, incubados com o segundo anticorpo biotilado (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) à concentração de 1:200 por um período de 1 hora. Para a coloração, foi utilizado o complexo avidina-biotina-peroxidase (Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA), empregando diaminobenzidina (DAB, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), sulfato de níquel 1% e cloreto de cobalto 0,5% como cromógenos, cuja reação conferiu ao núcleo das células neuronais uma coloração de violeta escuro a preto.

Logo após a imunomarcação para c-fos, foram realizados os procedimentos imuno-histoquímicos para o estudo de sua possível co-localização com AVP e OT. Para tanto, os cortes foram primeiramente incubados com anticorpos anti-AVP (rabbit, 1:10000, nº cat T4563/IHC 8103, Península, San Carlos, CA, USA), ou anti-OT (rabbit, Península, 1:10000, nº cat T4084/IHC 8152, San Carlos, CA, USA) por mais um período de 48 horas a 4°C e, em seguida, incubados com o segundo anticorpo biotilado respectivo (anti-rabbit). Após este procedimento, os cortes foram incubados por mais uma hora na solução ABC. A coloração foi realizada utilizando-se somente o complexo DAB como cromógeno, cuja reação conferiu ao citoplasma da célula uma coloração marrom.

Ao término dos procedimentos acima descritos, os cortes foram montados utilizando-se gelatina de Albrecht (1,5% gelatina/álcool 80%) e a

seguir secados a temperatura ambiente, desidratados com xileno e cobertos com o meio de montagem. A visualização microscópica do tecido permitiu a análise do padrão espacial de imunomarcção por meio de um sistema de videomicroscopia. As imagens foram capturadas por meio de uma câmera de vídeo de alta resolução, acoplada a um microscópio Leica, e transmitidas a um computador dotado de um programa digitalizador e quantificador de imagens (IM50, Videoblaster/ScionImage, NIH), de forma a determinar o número de neurônios imunorreativos a c-fos bem como aqueles que apresentam dupla marcação com AVP ou OT. A contagem de células duplamente marcada foi feita manualmente com base em critérios individuais de contagem (intensidade da coloração nuclear ou citoplasmática, visualização no mesmo plano, delimitação dos componentes celulares) sendo que os valores encontrados foram comparados com aqueles obtidos por um software analisador de imagens (Scion Image PC). Os dados apresentados constituem a média destes dois tipos de contagem.

A delimitação dos núcleos cerebrais de interesse foi realizada com base nas coordenadas descritas por Paxinos e Watson (1997), representadas na figura em Anexo. O NPV foi analisado em três sub-áreas distintas, partindo da região rostral em direção à caudal: porção comissural anterior (CA: -0,92 mm em relação ao bregma), porção medial magnocelular (MM: -1,3 mm em relação ao bregma) e porção lateral magnocelular (LM: -1,8 mm em relação ao bregma). O NSO foi analisado na altura de sua porção medial (-1,3 mm em relação ao bregma).

### **3.6. DROGA**

Para os experimentos que avaliam a participação do eixo HHA na secreção hormonal e ativação neuronal foi utilizada dexametasona (Dexazona, Bunker), para administração intraperitoneal, na dose de 1mg/kg, administrada 2h antes da EVEC.

### **3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os resultados obtidos foram expressos como médias  $\pm$  SEM. Os testes estatísticos utilizados foram: “one way ANOVA”, seguido do teste de Newman-Keuls para análise de dados imuno-histoquímicos e hormonais dentro do mesmo grupo (veículo ou dexametasona) e teste t, seguido do teste de Mann-Whitney para comparação entre os dois grupos. O nível de significância adotado foi de  $p < 0.05$ .

#### **4. PROCOLOS EXPERIMENTAIS**

**Protocolo Experimental 1 – Efeitos da EVEC (isotônica e hipertônica) sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP.**

Foram utilizados neste experimento animais que tiveram a veia jugular canulada, 24 horas antes. Cinco minutos após a indução ou não da EVEC hipertônica ou isotônica, os animais foram decapitados e o sangue coletado em tubos, mantidos sob gelo, contendo heparina ou inibidores de proteases (PMSF, Pepstatina A, EDTA) para determinação das concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANP e de corticosterona. O número de animais utilizados em cada grupo encontra-se expresso entre parênteses acima das barras correspondentes nos gráficos. Os valores individuais das concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANP e corticosterona, bem como as médias e os erros padrões de cada grupo, encontram-se expressos em forma de tabela nos Anexos.

**Protocolo Experimental 2 - Efeitos da administração intraperitoneal prévia de dexametasona sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC (isotônica e hipertônica).**

Os animais utilizados nestes experimentos estiveram sob as mesmas condições experimentais descritas no protocolo experimental 1. Eles foram divididos em grupos pré-tratados com veículo ou com dexametasona, administrados por via i.p. 2h antes da EVEC. Os valores individuais das concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANP e corticosterona, bem como as médias e os erros padrões de cada grupo, encontram-se expressos em forma de tabela nos Anexos.

**Protocolo Experimental 3 – Efeitos da adrenalectomia sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC (isotônica e hipertônica).**

Os animais utilizados neste protocolo foram submetidos à adrenalectomia bilateral (ADX) ou cirurgia fictícia (Sham) de 5 a 7 dias antes da realização dos experimentos. Na véspera do experimento, os animais foram submetidos também à canulação da veia jugular externa. No dia do experimento, eles foram divididos em grupos e submetidos à EVEC isotônica

ou hipertônica. Os valores individuais das concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANP e corticosterona, bem como as médias e os erros padrões de cada grupo, encontram-se expressos em forma de tabela nos Anexos.

**Protocolo Experimental 4 – Efeitos da administração intraperitoneal prévia de dexametasona sobre a expressão da proteína c-fos nos núcleos hipotalâmicos (NPV e NSO), em resposta à EVEC (isotônica ou hipertônica).**

Na realização deste protocolo experimental foram utilizados animais portadores de cânulas na veia jugular externa. Noventa minutos após a EVEC, eles foram anestesiados, perfundidos e processados segundo a técnica descrita anteriormente para a imunomarcagem da proteína c-fos e sua eventual co-localização com AVP e OT. O número de animais em cada grupo experimental, os valores individuais das contagens para cada área, bem como as médias e os erros padrões de cada grupo, encontram-se expressos em forma de tabela nos Anexos.

## **5. RESULTADOS**

**Protocolo Experimental 1 – Efeitos da EVEC (isotônica e hipertônica) sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP.**

**Corticosterona**

De acordo com a figura 1.1, pode-se observar que houve elevação significativa nas concentrações plasmáticas de corticosterona quando comparados os grupos controle (não expandido) e expandido, tanto para a EVEC isotônica ( $5,86 \pm 0,79$  vs  $13,43 \pm 1,96$ ,  $p < 0,001$ ) quanto hipertônica ( $5,86 \pm 0,79$  vs  $29,55 \pm 1,28$ ,  $p < 0,001$ ).

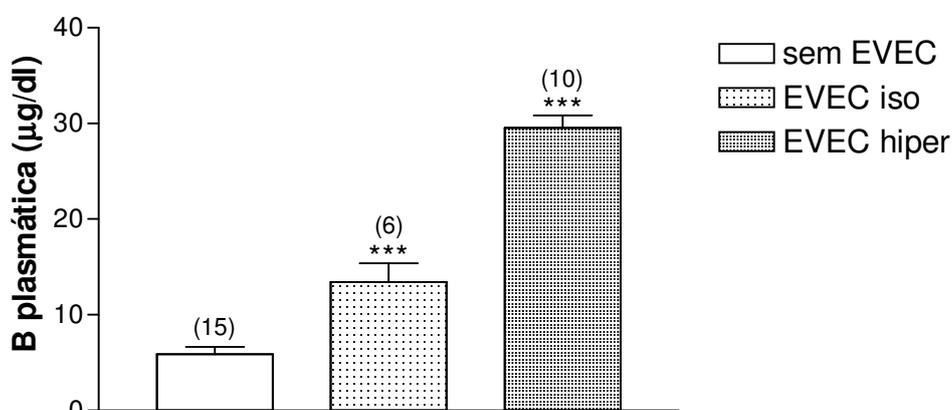


Figura 1.1 – Efeito da EVEC isotônica e hipertônica sobre a secreção de corticosterona.

Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo não expandido.

## Ocitocina

Os dados apresentados na figura 1.2 mostram que a EVEC promoveu elevação significativa nas concentrações plasmáticas de OT quando comparados os grupos controle (não expandido) e expandido, tanto para a EVEC isotônica ( $2.23 \pm 0.34$  vs  $4.49 \pm 0.61$ ,  $p < 0,05$ ) quanto hipertônica ( $2.23 \pm 0.34$  vs  $51.73 \pm 6.97$ ,  $p < 0,001$ ).

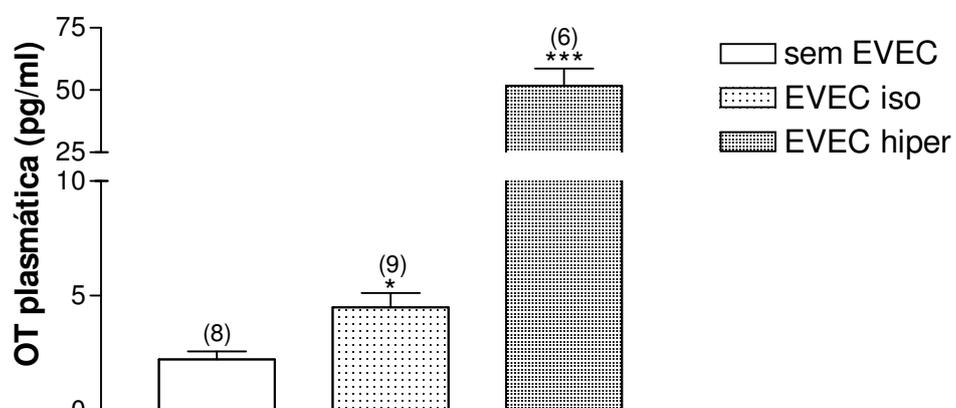


Figura 1.2 – Efeito da EVEC isotônica e hipertônica sobre a secreção de ocitocina. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo não expandido.

## Peptídeo Natriurético Atrial

De acordo com o que pode ser observado na figura 1.3, a EVEC isotônica promoveu elevação significativa nas concentrações plasmáticas de ANP ( $67.77 \pm 5.18$  vs  $356,76 \pm 28.83$ ,  $p < 0,001$ ). O mesmo padrão de resposta é observado em relação à EVEC hipertônica ( $67.77 \pm 5.18$  vs  $483.25 \pm 27.50$ ,  $p < 0,001$ ).

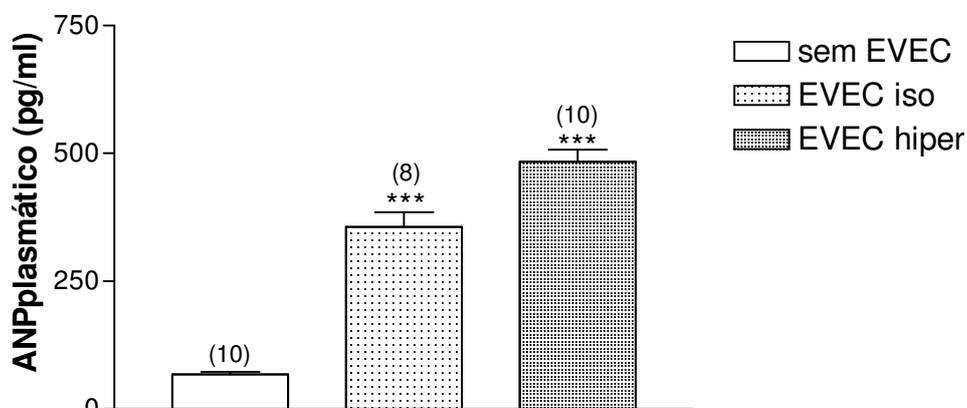


Figura 1.3 – Efeitos da EVEC isotônica e hipertônica sobre a secreção de peptídeo natriurético atrial. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo não expandido.

## Vasopressina

Os experimentos realizados mostram ainda que a EVEC isotônica promoveu uma diminuição na secreção de AVP ( $2,08 \pm 0,13$  vs  $1,41 \pm 0,12$ ,  $p < 0,05$ ), enquanto que a EVEC hipertônica promoveu um aumento na concentração plasmática deste hormônio, quando comparamos os grupos

controle (sem EVEC) e expandido ( $2,08 \pm 0,13$  vs  $4,42 \pm 0,24$ ,  $p < 0,001$ ) (figura 1.4).

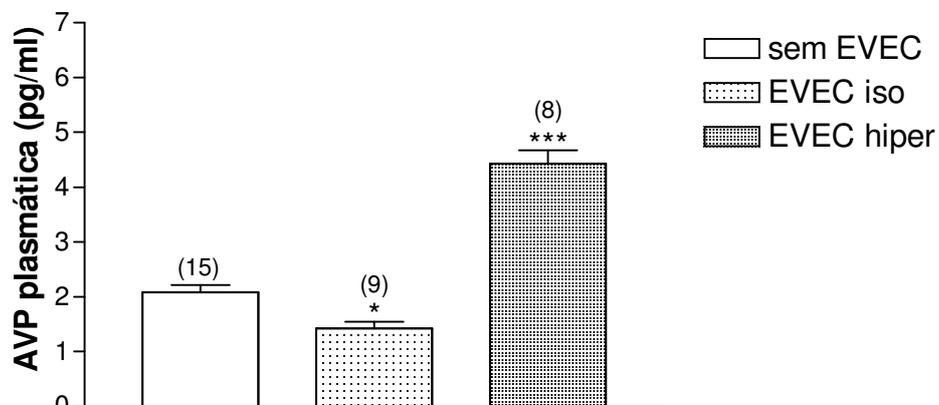


Figura 1.4 – Efeito da EVEC isotônica e hipertônica sobre a secreção de vasopressina. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  e \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo não expandido.

**Protocolo Experimental 2 - Efeitos da administração intraperitoneal prévia de dexametasona sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC (isotônica e hipertônica).**

### **Corticosterona**

Como pode ser observado na figura 2.1, o pré-tratamento com dexametasona diminuiu significativamente os valores de corticosterona observados em resposta à EVEC isotônica ( $13,43 \pm 1,96$  vs  $2,46 \pm 0,67$ ,  $p < 0,001$ ) e hipertônica ( $29,55 \pm 1,28$  vs  $5,23 \pm 1,49$ ,  $p < 0,001$ ), mostrando que a dose utilizada promoveu um recrutamento dos mecanismos de retroalimentação negativa sobre a secreção endógena de glicocorticóide. Pode-se observar ainda que a administração de dexametasona diminuiu significativamente a concentração plasmática de corticosterona dos animais não submetidos à EVEC ( $5,86 \pm 0,79$  vs  $0,89 \pm 0,13$ ,  $p < 0,001$ ).

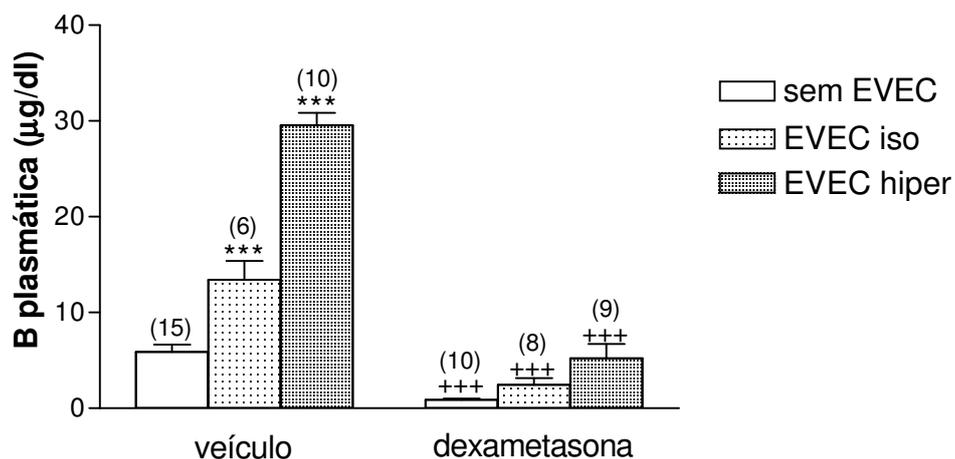


Figura 2.1 – Efeito da administração i.p. de dexametasona sobre a secreção de corticosterona induzida pela EVEC isotônica e hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao basal (veículo sem EVEC) e +++  $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado correspondente.

## Ocitocina

De acordo com os dados apresentados na figura 2.2, o pré-tratamento com dexametasona diminuiu significativamente as concentrações plasmáticas de OT quando comparados os grupos veic + EVEC e dexa + EVEC para a solução isotônica ( $4.49 \pm 0.61$  vs  $1.81 \pm 0.27$ ,  $p < 0,001$ ) e hipertônica ( $51.73 \pm 6.97$  vs  $19.69 \pm 2.20$ ,  $p < 0,001$ ). A administração da droga não alterou os valores do grupo não submetido à EVEC.

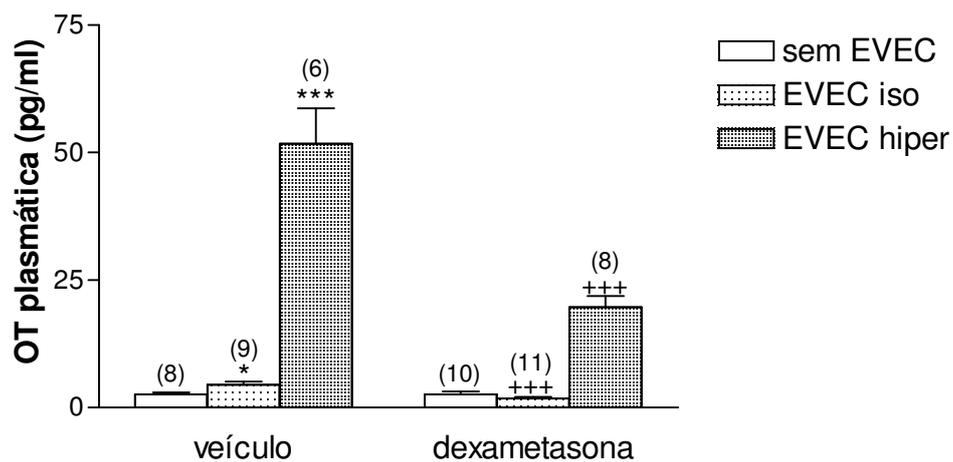


Figura 2.2 – Efeito da administração i.p. de dexametasona sobre a secreção de ocitocina induzida pela EVEC isotônica e hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao basal (veículo sem EVEC) e +++  $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado correspondente.

### Peptídeo Natriurético Atrial

Os efeitos da administração de dexametasona sobre a secreção de ANP induzida pela EVEC isotônica e hipertônica estão representados na figura 2.3. Como pode ser observado, o pré-tratamento com dexametasona não alterou os valores normalmente observados nos animais controle (sem EVEC) e nos animais submetidos à EVEC isotônica ou hipertônica.

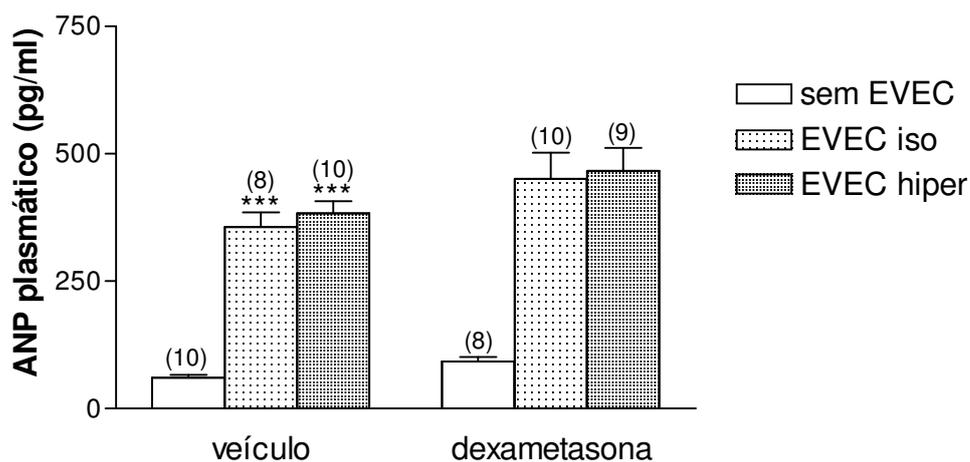


Figura 2.3 – Efeito da administração i.p. de dexametasona sobre a secreção do peptídeo natriurético atrial induzida pela EVEC isotônica e hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao basal (veículo sem EVEC).

### Vasopressina

A prévia administração de dexametasona não alterou os valores de AVP observados em resposta tanto à EVEC isotônica quanto hipertônica, de acordo com o que está demonstrado na figura 2.4. Os dados mostram ainda que a administração do glicocorticoide não exerce nenhum efeito sobre a secreção basal de AVP.

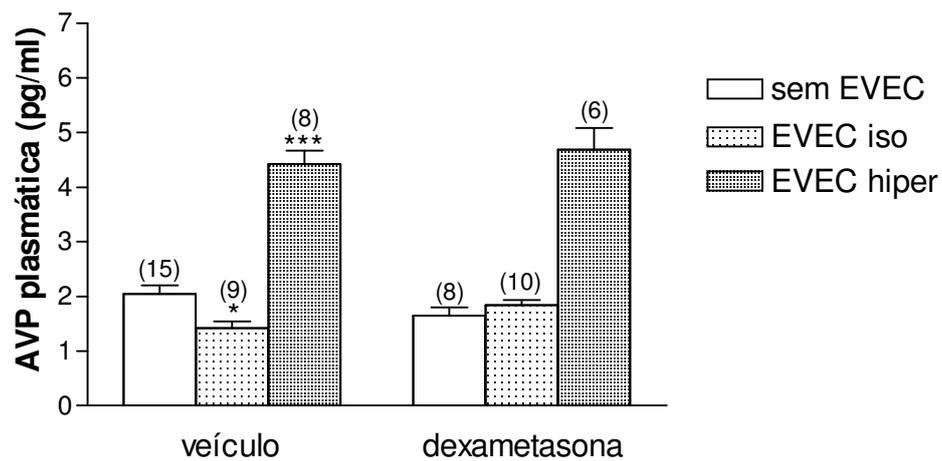


Figura 2.4 – Efeito da administração i.p. de dexametasona sobre a secreção de vasopressina induzida pela EVEC isotônica e hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  e

\*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao basal (veículo sem EVEC).

**Protocolo Experimental 3 – Efeitos da adrenalectomia sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC (isotônica e hipertônica).**

### **Corticosterona**

Para assegurar a eficácia da adrenalectomia, foi realizada a dosagem da corticosterona plasmática dos grupos ADX e Sham. Como pode ser observado na figura 3.1, os animais ADX submetidos à EVEC apresentaram valores significativamente menores que os encontrados no grupo Sham expandido, tanto em resposta à EVEC isotônica ( $4.80 \pm 0.64$  vs  $0.22 \pm 0.03$ ,  $p < 0,001$ ) quanto hipertônica ( $12.73 \pm 0.86$  vs  $0.24 \pm 0.07$ ,  $p < 0,001$ ). Da mesma forma, a adrenalectomia reduziu significativamente os valores basais de corticosterona ( $1.31 \pm 0.31$  vs  $0.15 \pm 0.01$ ,  $p < 0,05$ ).

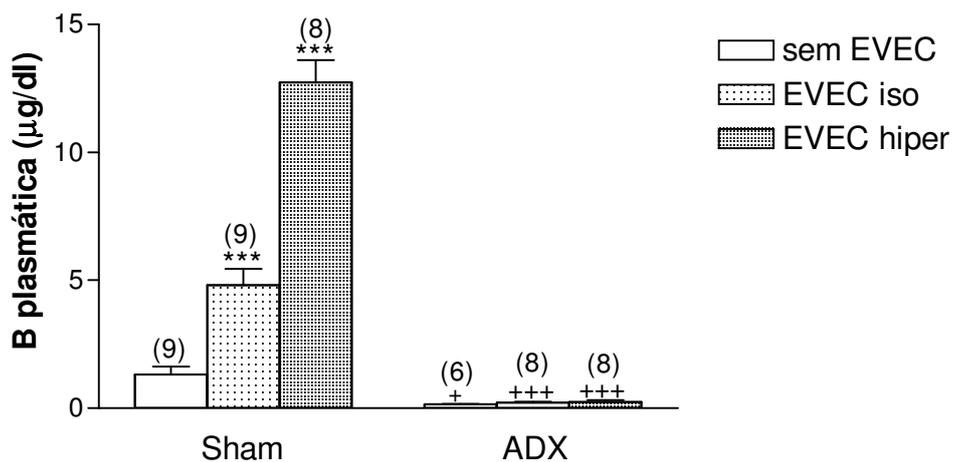


Figura 3.1 – Efeito da adrenalectomia sobre a secreção de corticosterona induzida pela EVEC isotônica e hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao basal (Sham sem EVEC); +++  $p < 0,001$  e +  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham correspondente.

## Ocitocina

Os dados obtidos indicam que a adrenalectomia não altera a secreção basal de OT nem a liberação deste hormônio em resposta à EVEC isotônica. Ao contrário disso, a adrenalectomia aumentou significativamente as concentrações plasmáticas de OT observadas em resposta à EVEC hipertônica ( $29,72 \pm 2,51$  vs  $33,25 \pm 2,79$ ,  $p < 0,01$ ) (figura 3.2).

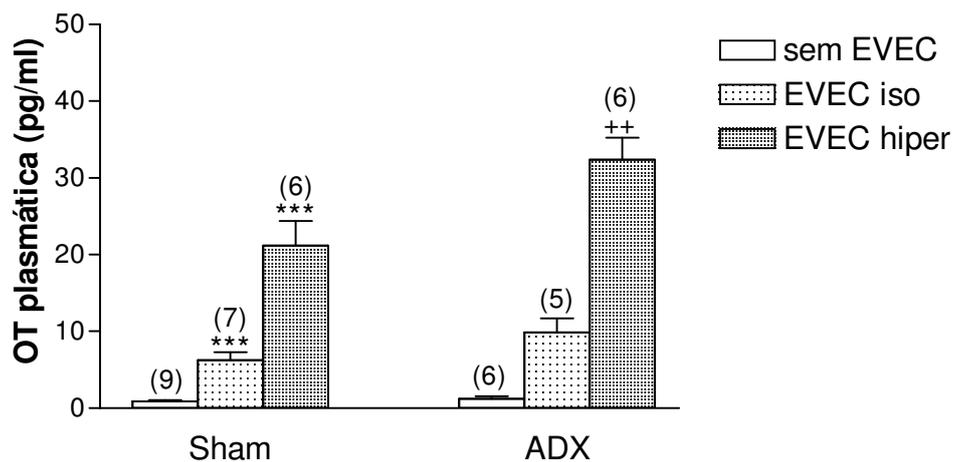


Figura 3.2 – Efeito da adrenalectomia sobre a secreção de ocitocina induzida pela EVEC isotônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao basal (Sham sem EVEC); ++  $p < 0,01$  em relação ao grupo Sham correspondente.

### Peptídeo Natriurético Atrial

Os dados mostram que a secreção basal de ANP não foi alterada pela adrenalectomia. Da mesma forma, não houve diferença estatística na secreção de ANP quando comparados os grupos adrenalectomizado e Sham tanto para a EVEC isotônica quanto hipertônica, de acordo com o que pode ser observado na figura 3.3.

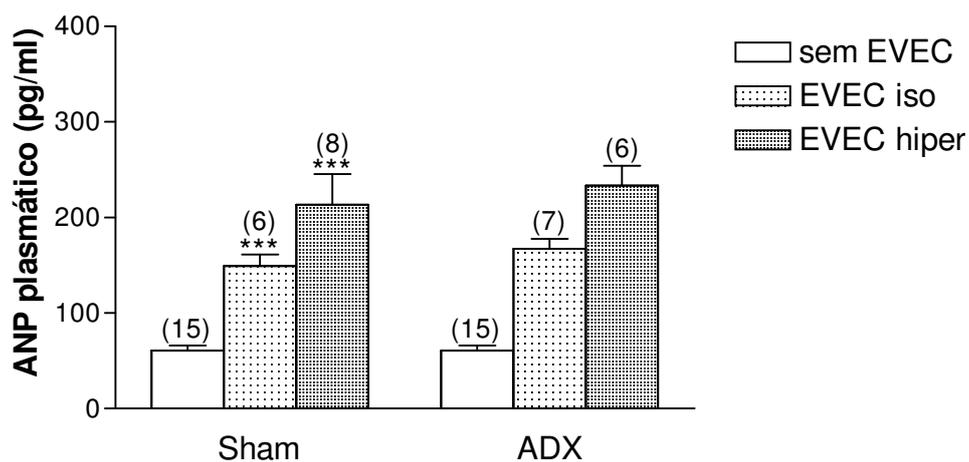


Figura 3.3 – Efeito da adrenalectomia sobre a secreção do peptídeo natriurético atrial induzida pela EVEC isotônica e hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao basal (Sham sem EVEC).

### Vasopressina

Os resultados apresentados mostram ainda que a adrenalectomia não alterou os valores basais de AVP, porém impediu a queda na secreção de AVP normalmente observada em resposta à EVEC isotônica ( $2.20 \pm 0.28$  vs  $4.05 \pm 0.27$ ,  $p < 0,05$ ), não alterando os valores induzidos em resposta à EVEC hipertônica (figura 3.4).

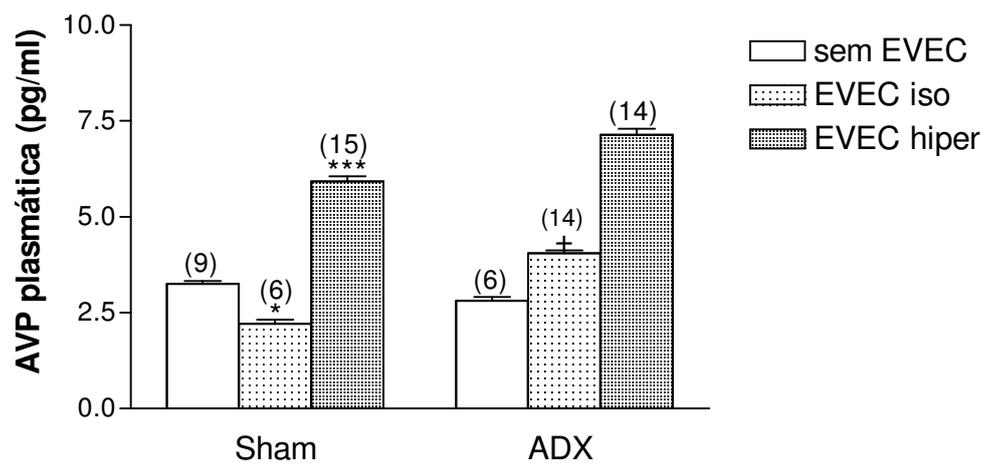


Figura 3.4 – Efeito da adrenalectomia sobre a secreção de vasopressina induzida pela EVEC isotônica e hipertônica. Valores expressos em médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao basal (Sham sem EVEC) e +  $p < 0,05$  em relação ao grupo Sham correspondente.

**Protocolo Experimental 4 – Efeitos da administração intraperitoneal prévia de dexametasona sobre a expressão da proteína c-fos nos núcleos hipotalâmicos (NPV e NSO), em resposta à EVEC (isotônica ou hipertônica).**

#### **4.1 – Ocitocina**

Os dados obtidos nestes estudos mostram que tanto a EVEC isotônica quanto hipertônica promovem aumento do número de duplas marcações fos-OT na maioria das regiões analisadas do NPV e NSO, de acordo com o que pode ser observado nas figuras de 4.1.1 a 4.1.8. A administração de dexametasona não alterou os valores de dupla marcação em animais não submetidos à EVEC em nenhuma região analisada.

Na porção Comissural Anterior (CA) do NPV, tanto a EVEC isotônica quanto hipertônica não induziram aumento significativo no número de células duplamente marcadas para fos-OT em relação ao grupo não submetido à EVEC ( $1.33 \pm 0.66$  vs  $7.66 \pm 2.90$  para a EVEC isotônica;  $1.33 \pm 0.66$  vs  $3.80 \pm 0.96$  para a EVEC hipertônica). A administração prévia de dexametasona diminuiu estes valores para a EVEC isotônica ( $7.66 \pm 2.90$  vs  $0.20 \pm 0.20$ ,  $p < 0,05$ ), porém não alterou os dados obtidos para a EVEC hipertônica (figuras 4.1.1 e 4.1.2).

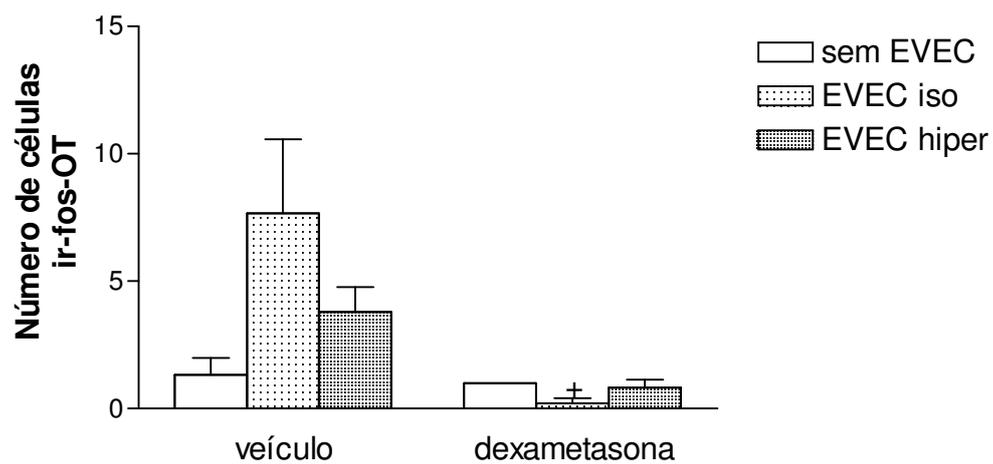


Figura 4.1.1 – Efeito da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas (ir fos-OT) na porção CA do NPV. Os valores são expressos como médias  $\pm$  EPM. +  $p < 0,05$  em relação ao grupo não tratado correspondente.

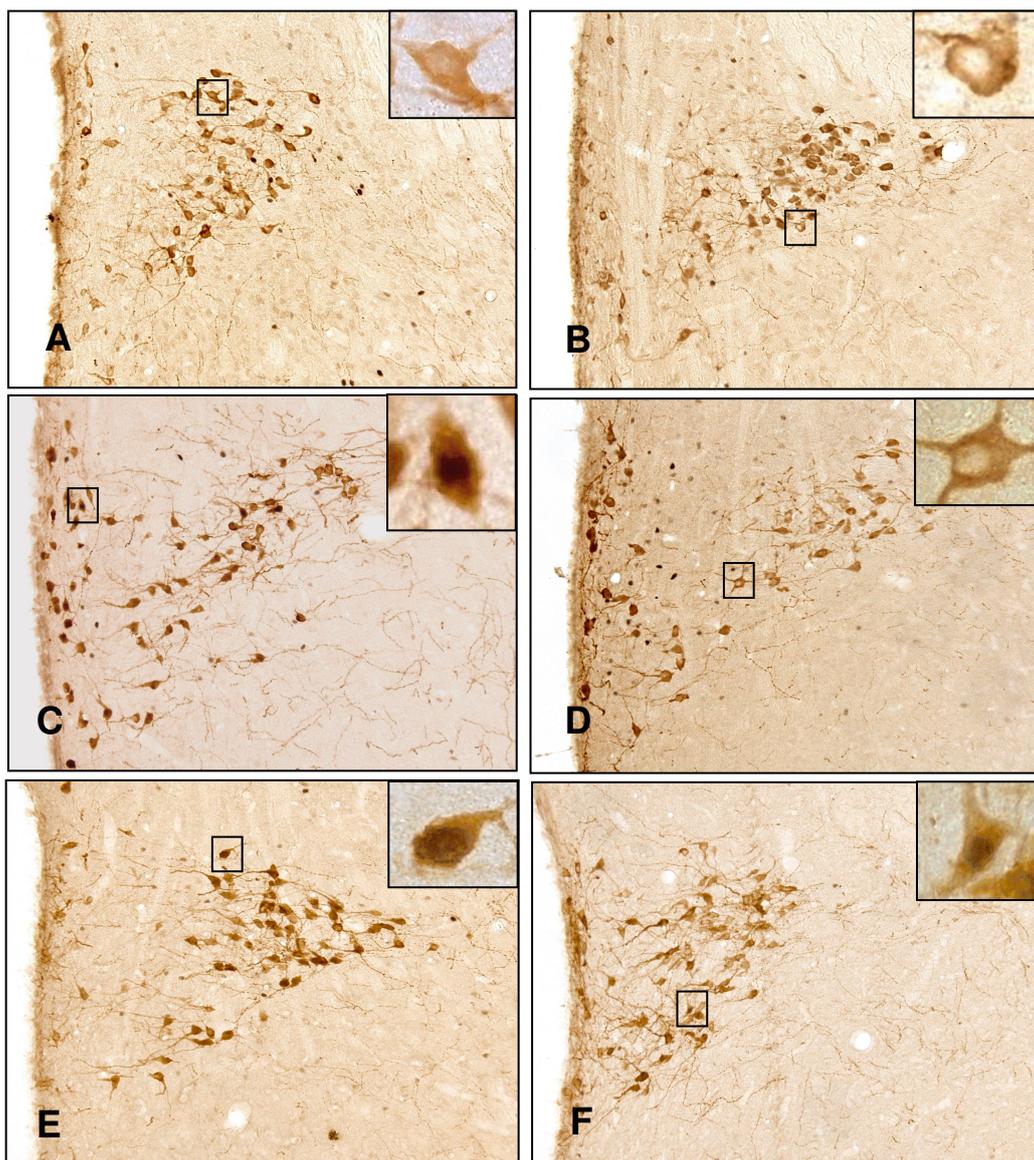


Figura 4.1.2 - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-OT no Núcleo Comissural Anterior (CA) do NPV. A: veículo + veículo; B: dexametasona + veículo; C: veículo + EVEC isotônica; D: dexametasona + EVEC isotônica; E: veículo + EVEC hipertônica; F: dexametasona + EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 20X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas encontram-se em destaque no canto superior direito (aumento de 100X).

Nas figura 4.1.3 e 4.1.4 encontra-se expresso o número de neurônios ativados na porção Medial Magnocelular (MM) do NPV, indicando que houve um aumento no número de duplas marcações em resposta à EVEC isotônica ( $1,00 \pm 1,00$  vs  $6,85 \pm 1,42$ ,  $p < 0,05$ ) e hipertônica ( $1,00 \pm 1,00$  vs  $9,00 \pm 1,94$ ,  $p < 0,01$ ). A administração prévia de dexametasona promoveu diminuição significativa nestes valores ( $6,85 \pm 1,42$  vs  $0,20 \pm 0,20$ ,  $p < 0,01$ , para a EVEC isotônica;  $9,00 \pm 1,94$  vs  $2,60 \pm 0,92$ ,  $p < 0,01$ , para a EVEC hipertônica), trazendo-os próximos aos valores basais.

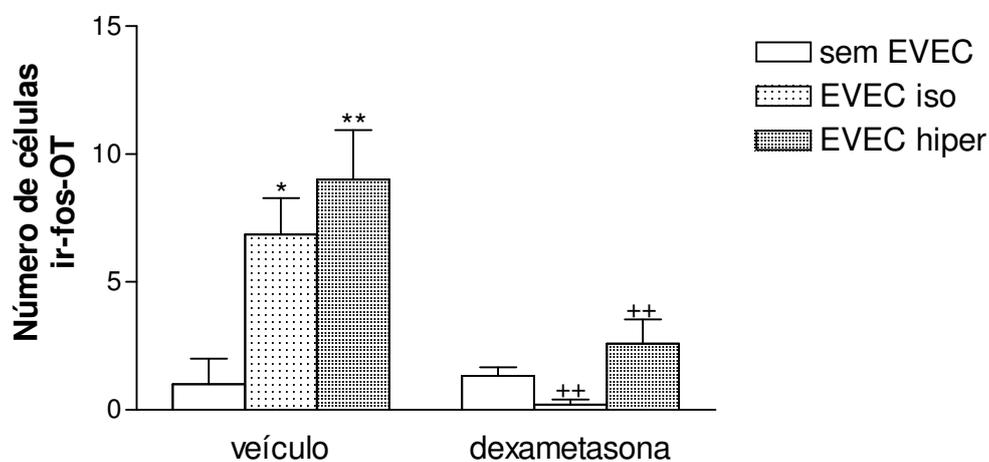


Figura 4.1.3 – Efeito da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas (ir fos-OT) na porção MM do NPV. Os valores são expressos como médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  e \*\*  $p < 0,01$  em relação ao grupo basal (veículo sem EVEC); ++  $p < 0,01$  em relação ao grupo não tratado correspondente.

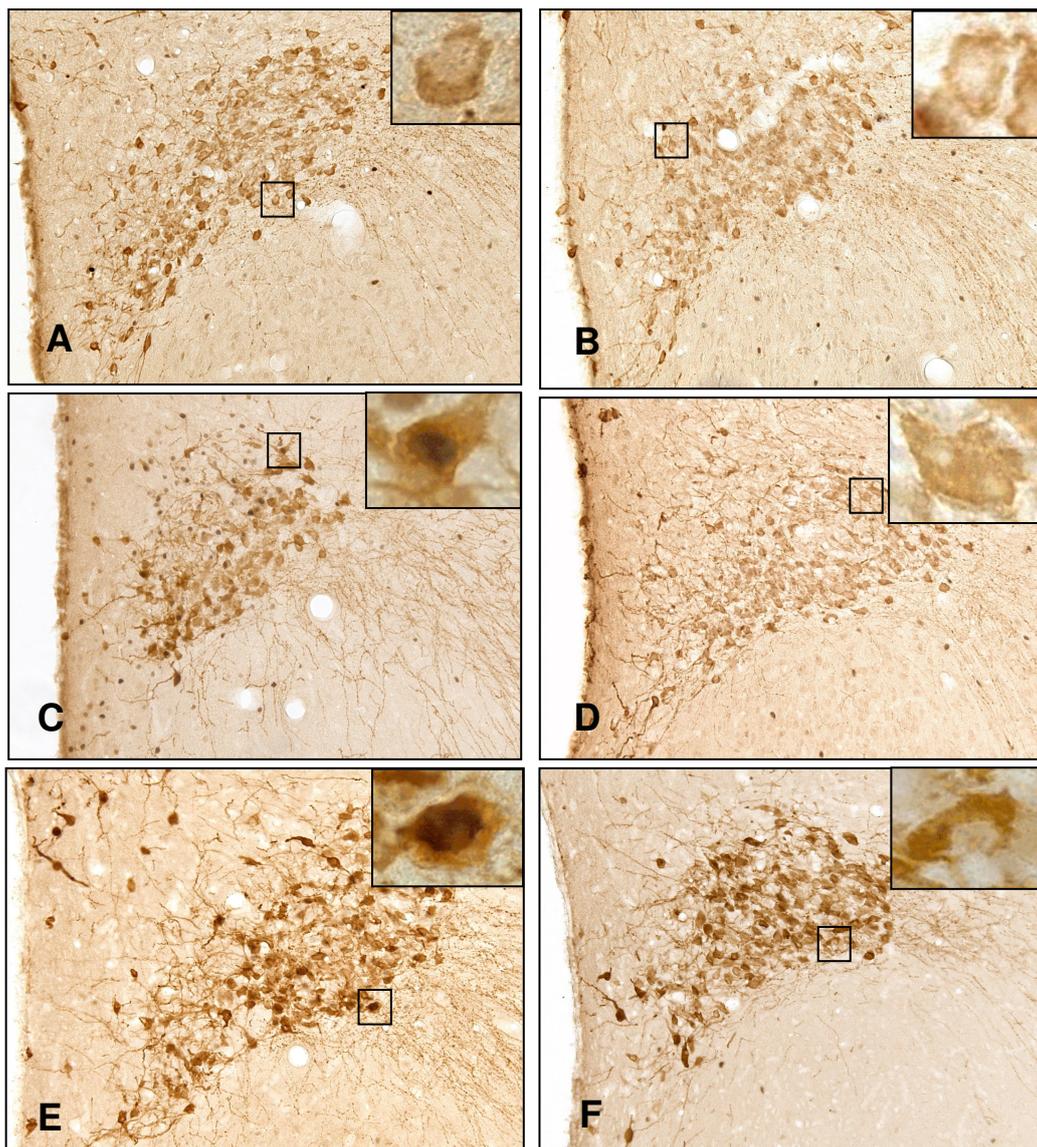


Figura 4.1.4 - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-OT no Núcleo Medial Magnocelular (MM) do NPV. A: veículo + veículo; B: dexametasona + veículo; C: veículo + EVEC isotônica; D: dexametasona + EVEC isotônica; E: veículo + EVEC hipertônica; F: dexametasona + EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 20X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas encontram-se em destaque no canto superior direito (aumento de 100X).

As figuras 4.1.5 e 4.1.6 representam o número de neurônios ir-fos-OT na porção Lateral Magnocelular (LM) do NPV. Os dados mostram que, tanto a EVEC isotônica ( $1,33 \pm 0,66$  vs  $7,14 \pm 1,71$ ,  $p < 0,01$ ) quanto hipertônica ( $1,33 \pm 0,66$  vs  $8,66 \pm 0,95$ ,  $p < 0,01$ ) aumentaram estes valores, e que a administração prévia de dexametasona diminuiu significativamente esta resposta celular ( $7,14 \pm 1,71$  vs  $0,40 \pm 0,24$ ,  $p < 0,01$ , para a EVEC isotônica;  $8,66 \pm 0,95$  vs  $1,20 \pm 0,58$ ,  $p < 0,001$ , para a EVEC hipertônica).

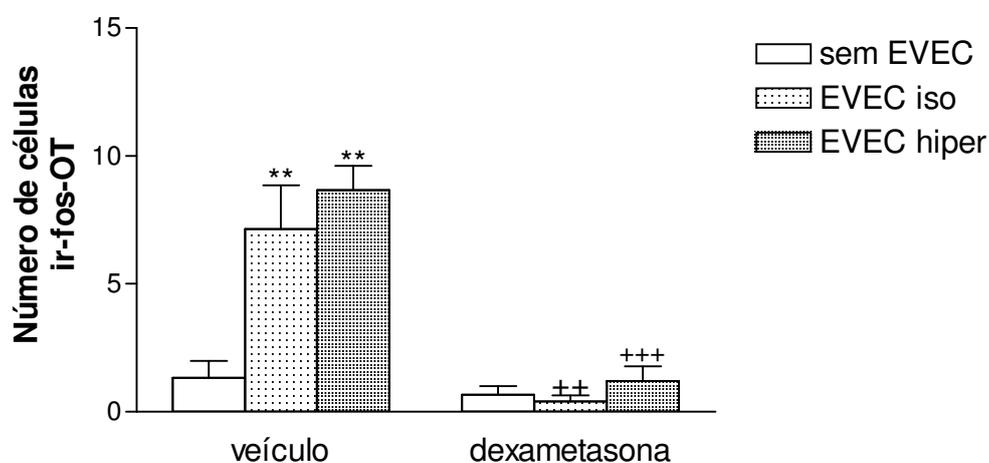


Figura 4.1.5 – Efeito da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas (ir fos-OT) na porção LM do NPV. Os valores são expressos como médias  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  em relação ao grupo basal (veículo sem EVEC); ++  $p < 0,01$  e +++  $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado correspondente.

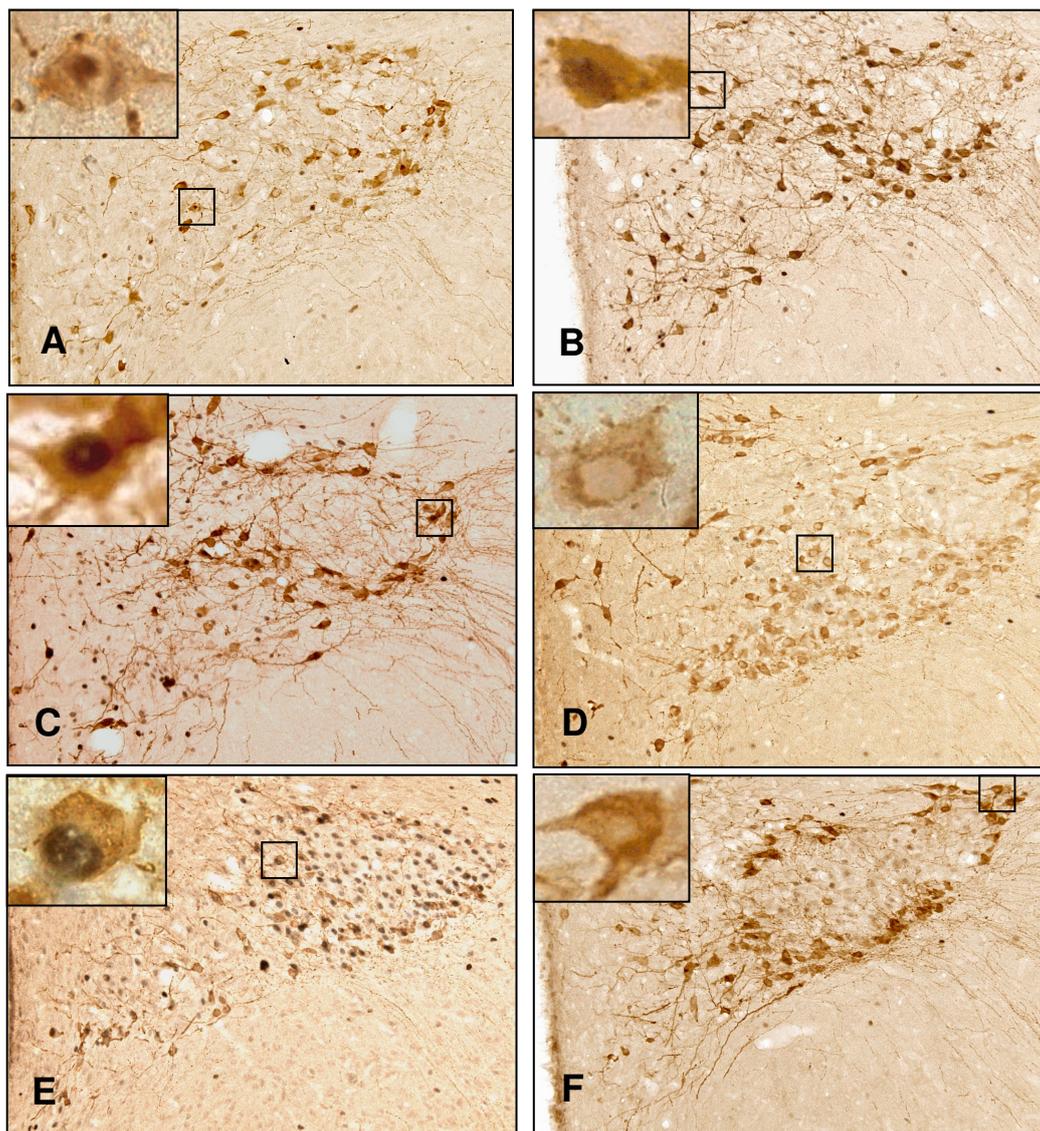


Figura 4.1.6 - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-OT no Núcleo Lateral Magnocelular (LM) do NPV. A: veículo + veículo; B: dexametasona + veículo; C: veículo + EVEC isotônica; D: dexametasona + EVEC isotônica; E: veículo + EVEC hipertônica; F: dexametasona + EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 20X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas encontram-se em destaque no canto superior esquerdo (aumento de 100X).

Ambos os tipos de EVEC também promoveram aumento nas duplas marcações observadas no NSO ( $0,66 \pm 0,66$  vs  $8,57 \pm 2,01$ ,  $p < 0,01$ , para a EVEC isotônica;  $0,66 \pm 0,66$  vs  $13,40 \pm 1,98$ ,  $p < 0,001$ , para a EVEC hipertônica). O pré-tratamento com dexametasona reduziu estes valores aos basais, tanto para a EVEC isotônica ( $8,57 \pm 2,01$  vs  $0,40 \pm 0,40$ ,  $p < 0,001$ ) quanto hipertônica ( $13,40 \pm 1,98$  vs  $2,6 \pm 0,67$ ,  $p < 0,001$ ) (figuras 4.1.7 e 4.1.8).

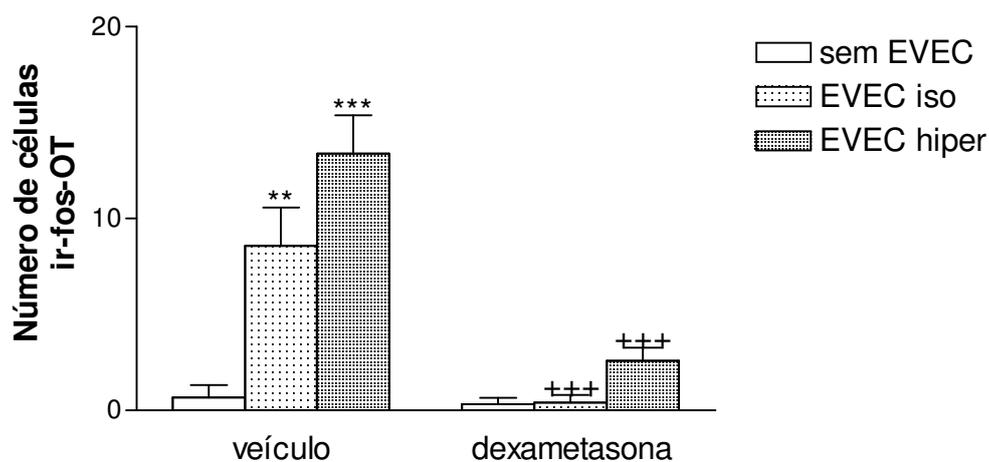


Figura 4.1.7 – Efeito da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas (ir fos-OT) no NSO. Os valores são expressos como médias  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  e \*\*\*  $p < 0,001$  em relação ao grupo basal (veículo sem EVEC); +++  $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado correspondente.

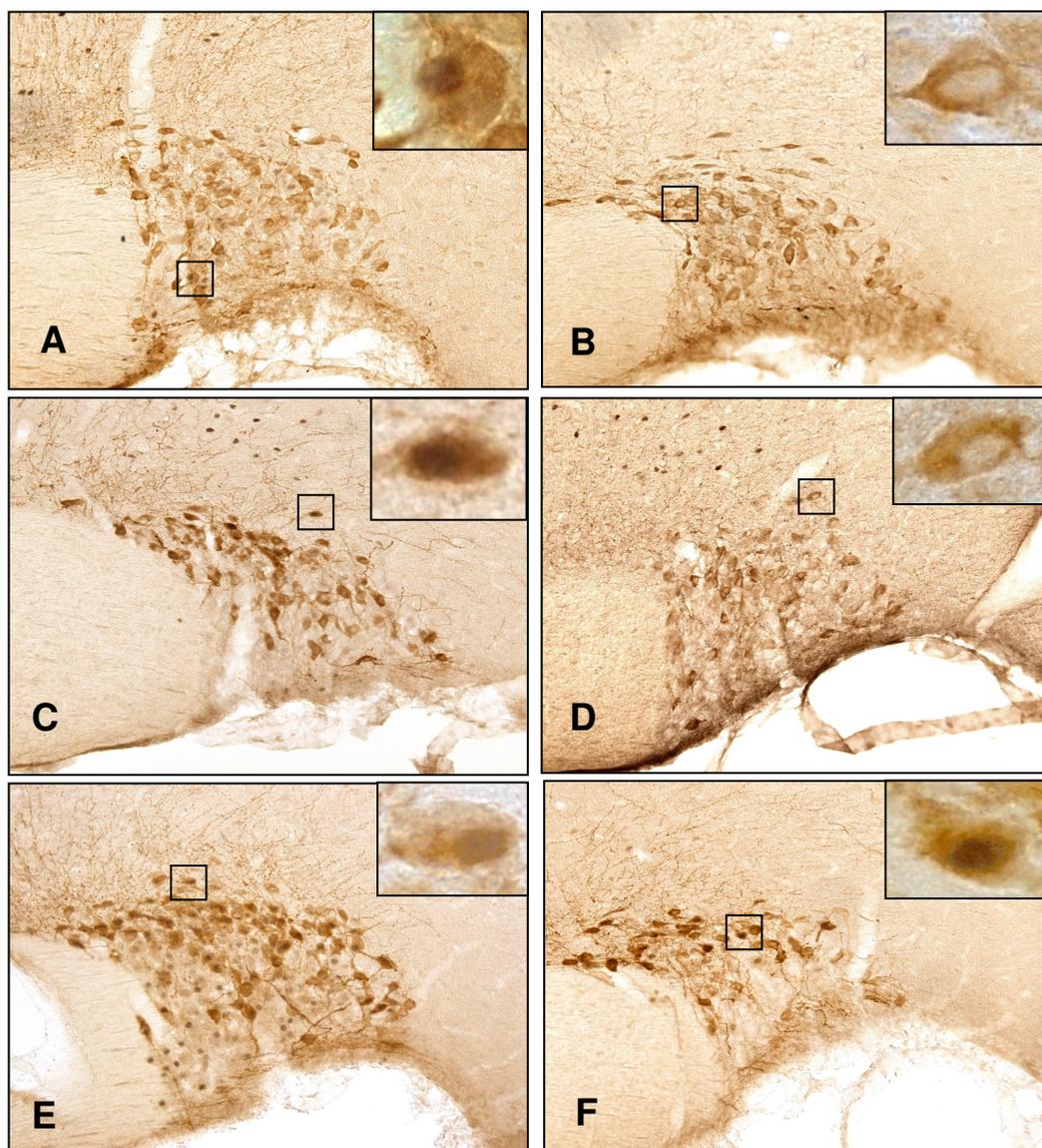


Figura 4.1.8 - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-OT no NSO. A: veículo + veículo; B: dexametasona + veículo; C: veículo + EVEC isotônica; D: dexametasona + EVEC isotônica; E: veículo + EVEC hipertônica; F: dexametasona + EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 20X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas encontram-se em destaque no canto superior direito (aumento de 100X).

## 4.2 – Vasopressina

Nas figuras de 4.2.1 a 4.2.8 estão representados os efeitos da administração prévia de dexametasona sobre o número de neurônios magnocelulares vasopressinérgicos ativados no NPV e NSO em resposta às EVEC isotônica ou hipertônica. Os resultados obtidos mostram que a EVEC isotônica mantém em valores basais o número de células duplamente marcadas em todas as porções do NPV analisadas. A administração de dexametasona diminuiu ainda mais estes valores na porção MM do NPV ( $1,40 \pm 0,50$  vs  $0,25 \pm 0,25$ ,  $p < 0,001$ ) (figuras 4.2.3 e 4.2.4) e não alterou em nenhuma região analisada os valores de dupla marcação observados em animais não submetidos à EVEC.

Ao contrário, a EVEC hipertônica promoveu um aumento significativo nestes valores na maioria das regiões analisadas (porção CA:  $0,33 \pm 0,33$  vs  $9,00 \pm 3,02$ ,  $p < 0,05$  (figuras 4.2.1 e 4.2.2); porção MM:  $1,33 \pm 0,66$  vs  $9,40 \pm 1,93$ ,  $p < 0,05$  (figuras 4.2.3 e 4.2.4); NSO:  $1,66 \pm 0,33$  vs  $14,80 \pm 1,93$ ,  $p < 0,01$  (figuras 4.2.7 e 4.2.8). O pré-tratamento com dexametasona diminuiu significativamente estes valores no NSO ( $14,80 \pm 1,93$  vs  $3,66 \pm 1,17$ ,  $p < 0,001$ ).

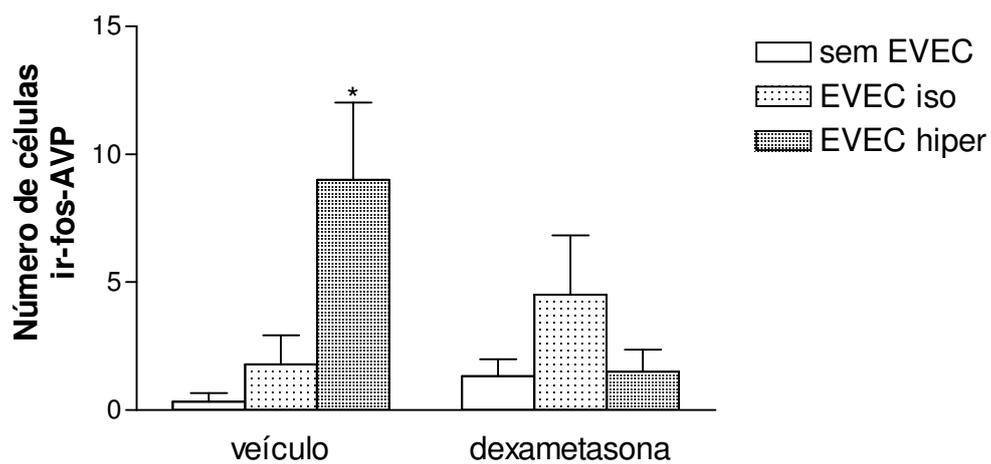


Figura 4.2.1 – Efeito da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas (ir fos-AVP) na porção CA do NPV. Os valores são expressos como médias  $\pm$

EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo basal (veículo sem EVEC).

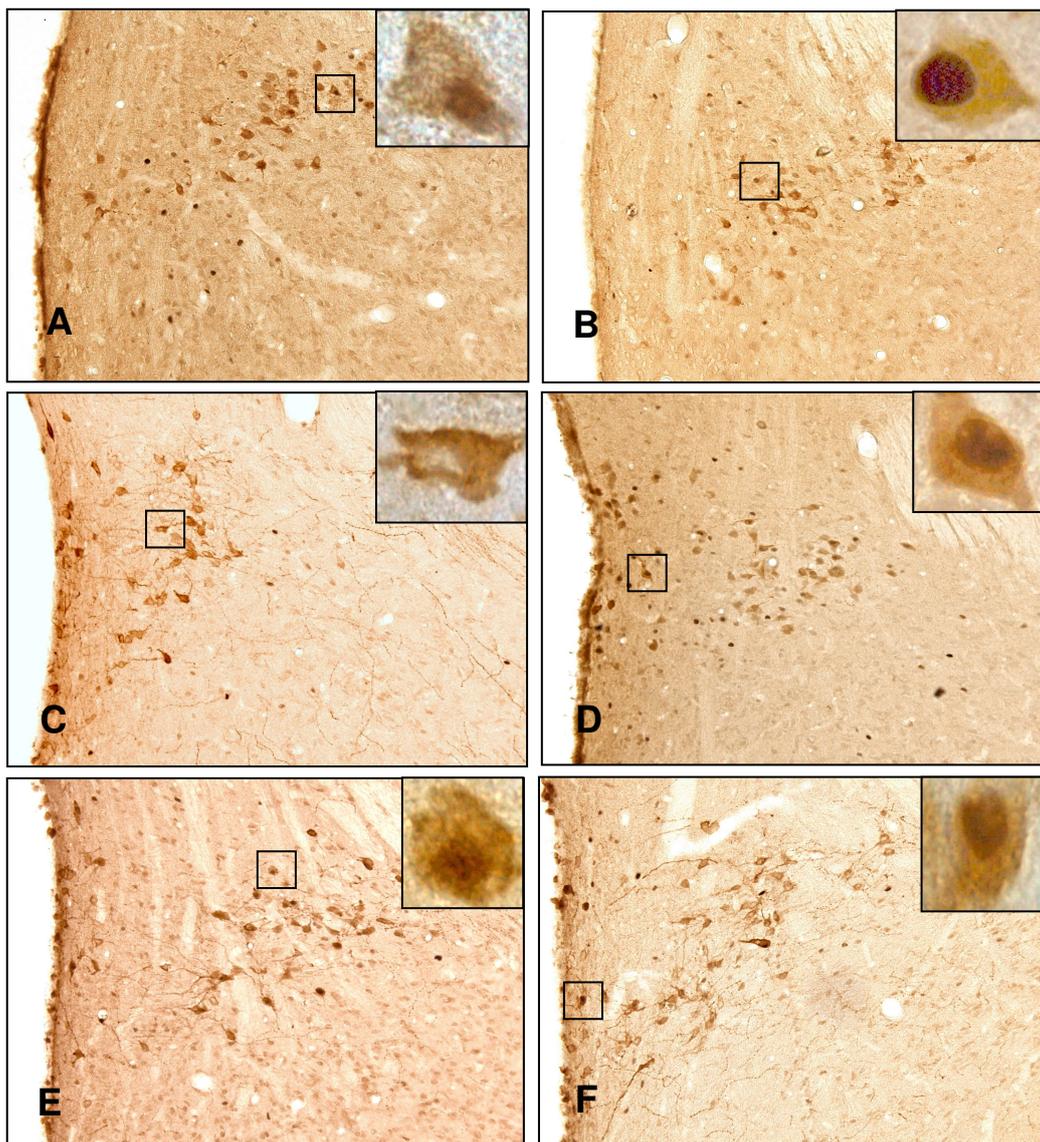


Figura 4.2.2 - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-AVP no Núcleo Comissural Anterior (CA) do NPV. A: veículo + veículo; B: dexametasona + veículo; C: veículo + EVEC isotônica; D: dexametasona + EVEC isotônica; E: veículo + EVEC hipertônica; F: dexametasona + EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 20X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas encontram-se em destaque no canto superior direito (aumento de 100X).

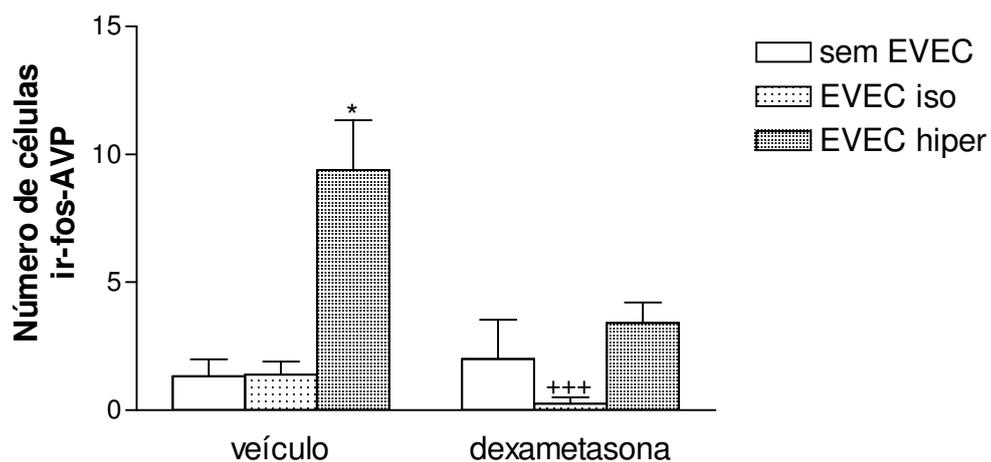


Figura 4.2.3 – Efeito da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas (ir fos-APV) na porção MM do NPV. Os valores são expressos como médias  $\pm$  EPM. \*  $p < 0,05$  em relação ao grupo basal (veículo sem EVEC) e +++  $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado correspondente.

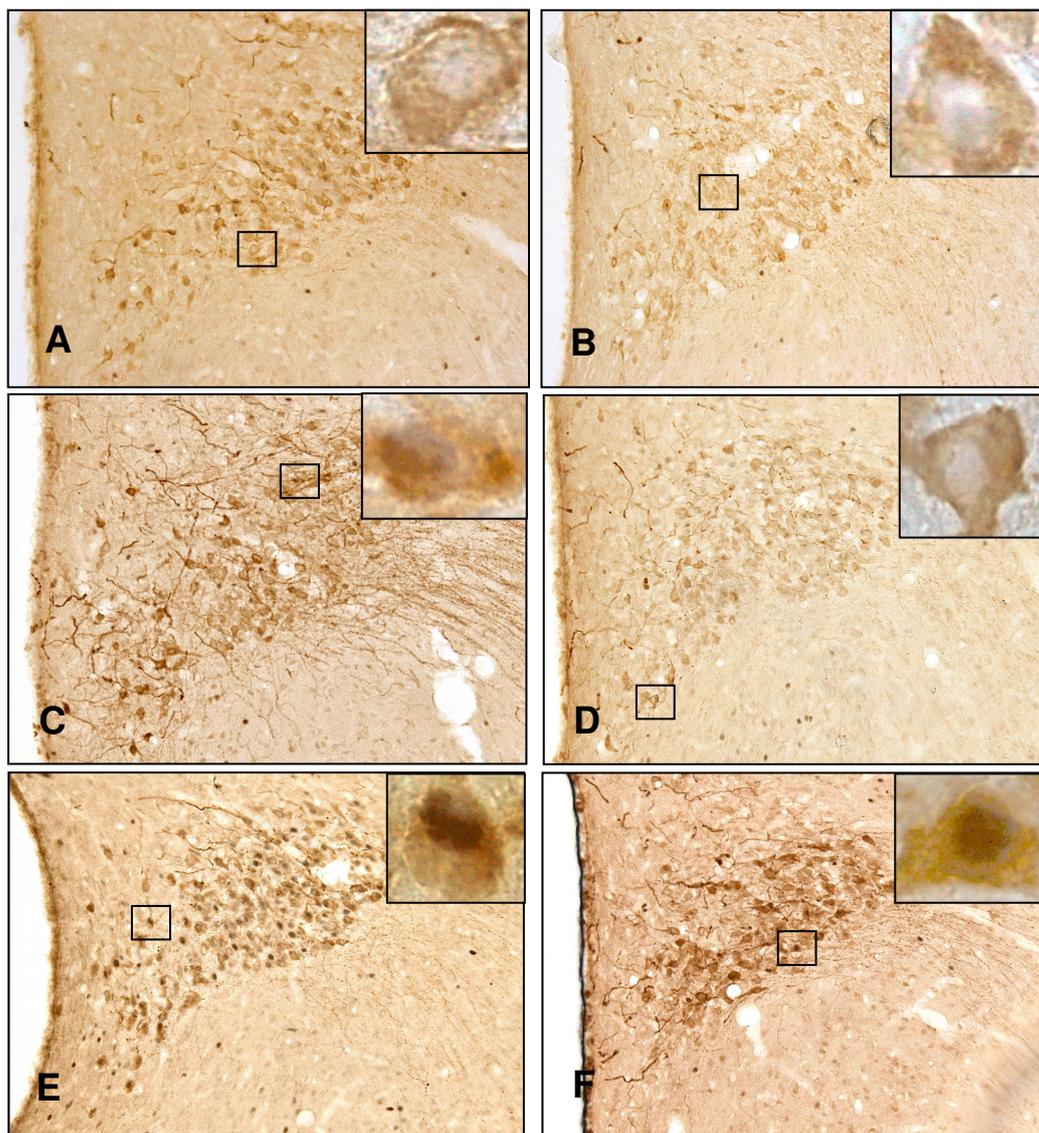


Figura 4.2.4 - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-AVP no Núcleo Medial Magnocelular (MM) do NPV. A: veículo + veículo; B: dexametasona + veículo; C: veículo + EVEC isotônica; D: dexametasona + EVEC isotônica; E: veículo + EVEC hipertônica; F: dexametasona + EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 20X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas encontram-se em destaque no canto superior direito (aumento de 100X).

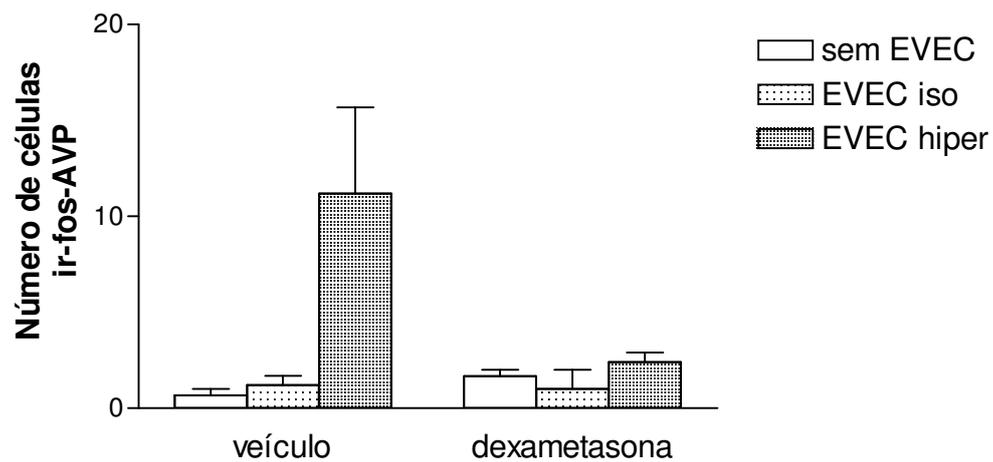


Figura 4.2.5 – Efeito da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas (ir fos-AVP) na porção LM do NPV. Os valores são expressos como médias  $\pm$  EPM.

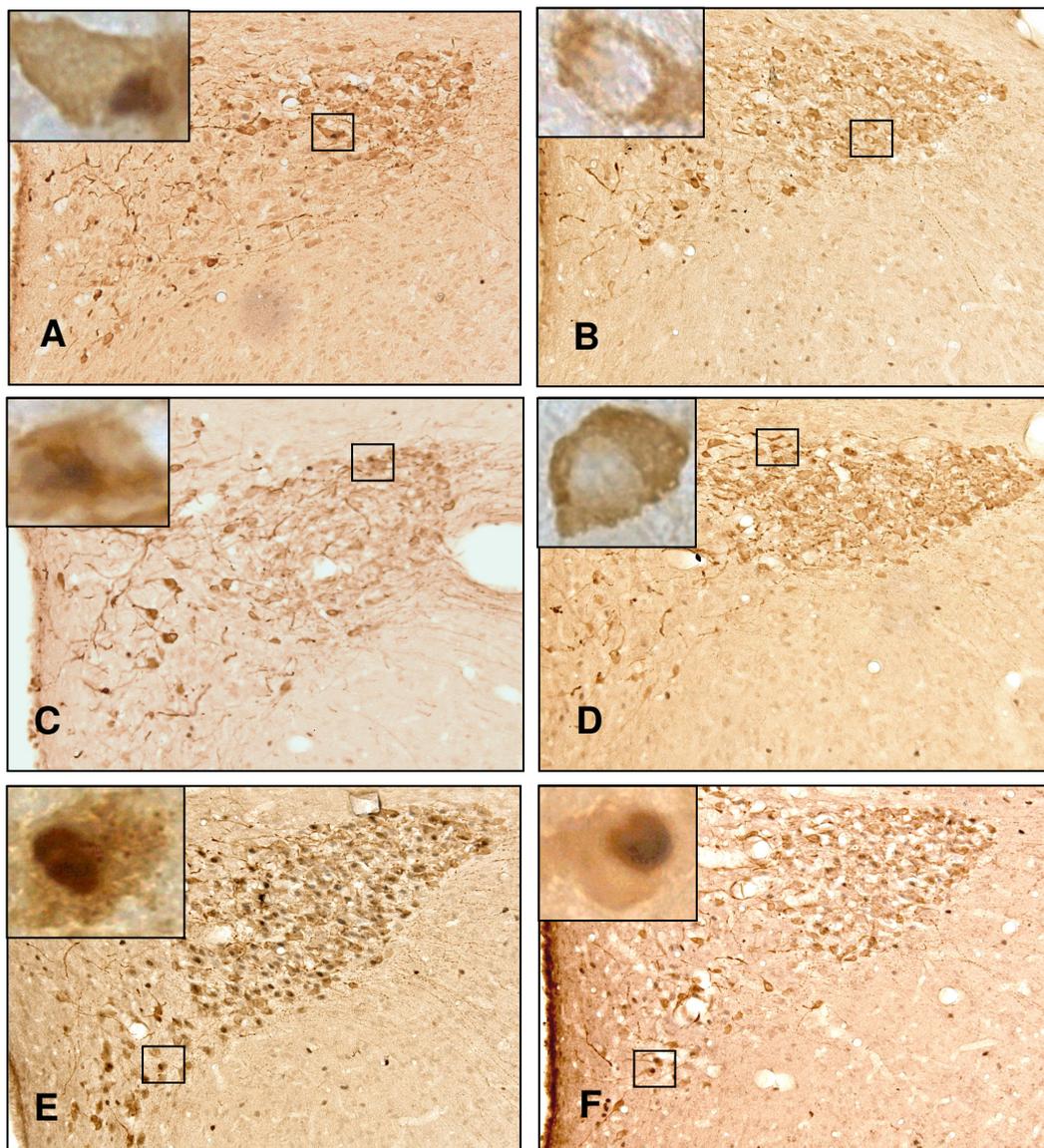


Figura 4.2.6 - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-AVP no Núcleo Lateral Magnocelular (LM) do NPV. A: veículo + veículo; B: dexametasona + veículo; C: veículo + EVEC isotônica; D: dexametasona + EVEC isotônica; E: veículo + EVEC hipertônica; F: dexametasona + EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 20X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas encontram-se em destaque no canto superior esquerdo (aumento de 100X).

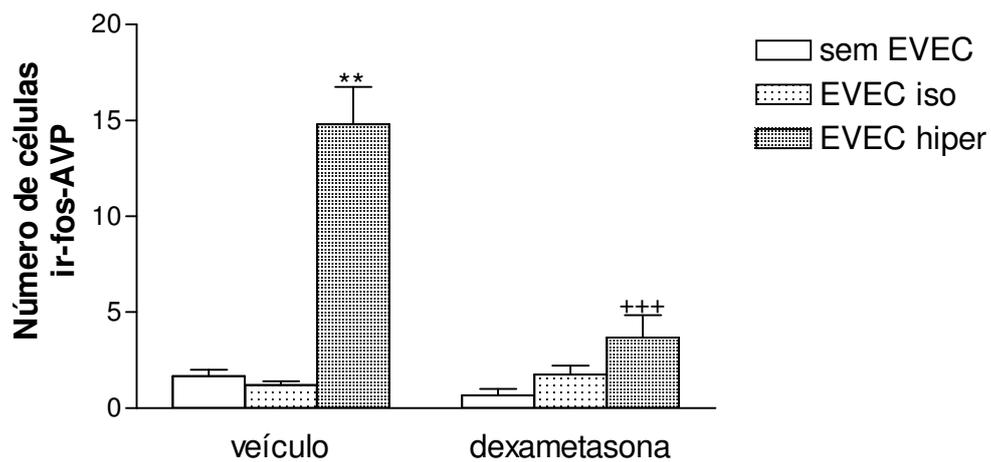


Figura 4.2.7– Efeito da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas (ir fos-AVP) no NSO. Os valores são expressos como médias  $\pm$  EPM. \*\*  $p < 0,01$  em relação ao grupo basal (veículo sem EVEC); +++  $p < 0,001$  em relação ao grupo não tratado correspondente.

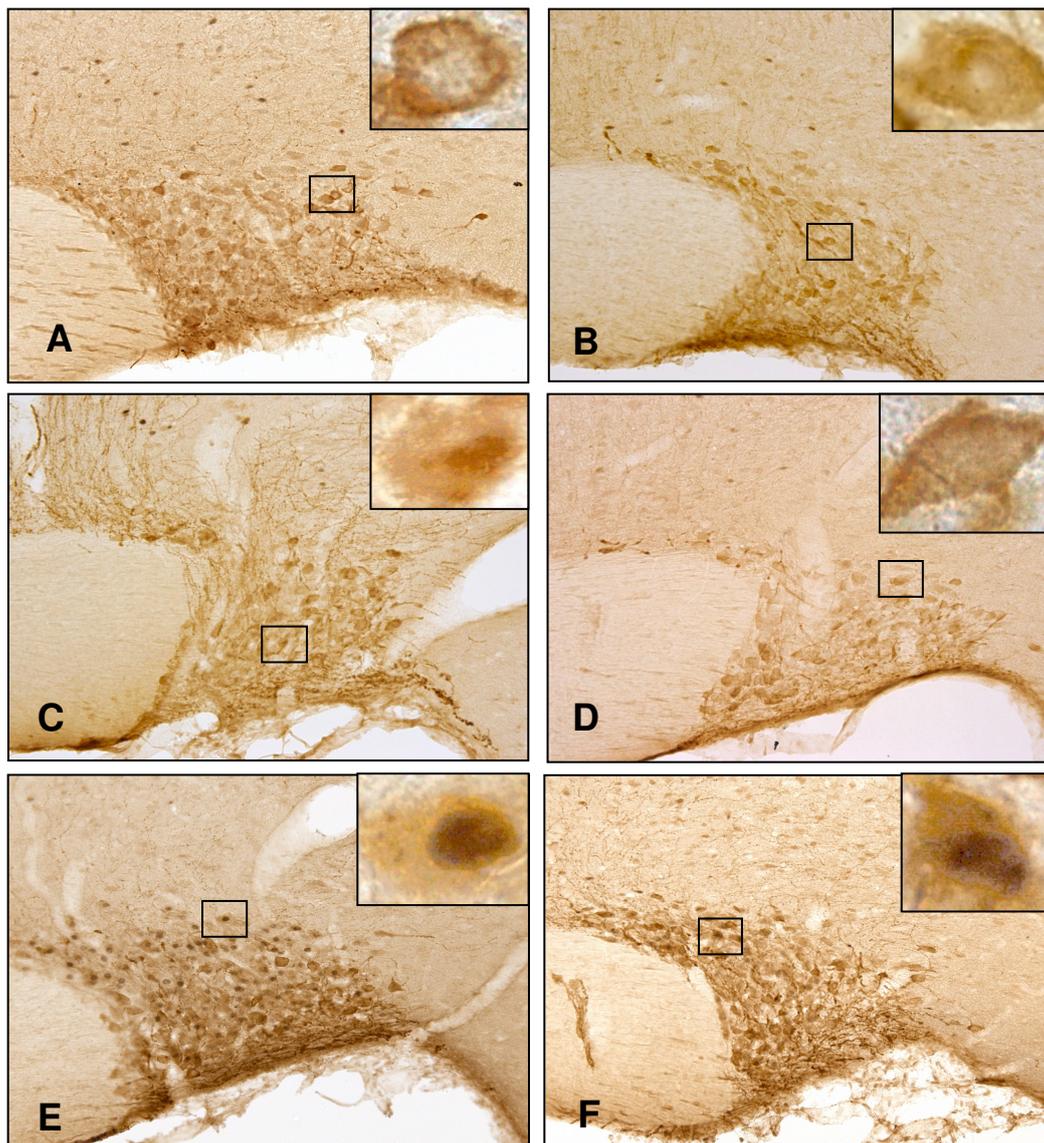


Figura 4.2.8 - Fotomicrografias de secções coronais mostrando ir-Fos-AVP no NSO. A: veículo + veículo; B: dexametasona + veículo; C: veículo + EVEC isotônica; D: dexametasona + EVEC isotônica; E: veículo + EVEC hipertônica; F: dexametasona + EVEC hipertônica. As figuras encontram-se em aumento de 20X. As duplas marcações ou marcações citoplasmáticas encontram-se em destaque no canto superior direito (aumento de 100X).

## **6. DISCUSSÃO**

Os resultados apresentados neste trabalho mostraram que ocorreu uma diminuição significativa nas concentrações plasmáticas de AVP em resposta à EVEC isotônica, e aumento nestes valores quando o animal foi submetido à EVEC hipertônica. Dessa forma, quando um aumento do volume extracelular é detectado, o organismo mobiliza diversos sistemas que visam, de uma forma geral, restabelecer o volume circulante pelo controle sobre a ingestão e excreção de eletrólitos e água. Estas respostas homeostáticas visam restaurar o volume circulante por ativação de mecanismos neurais, humorais e comportamentais. Porém, na EVEC hipertônica, o sistema torna-se menos sensível, priorizando a correção do fator mais limitante, que corresponde à osmolalidade, como proposto anteriormente por Stricker e Verbalis (1986). Estes dados confirmam a ação da AVP sobre o balanço de água entre os diferentes compartimentos em situações de alteração osmótica e/ou de volume plasmático.

Observou-se também que, tanto a EVEC isotônica quanto a hipertônica, promoveram aumento significativo nas concentrações plasmáticas de OT e ANP, dados já demonstrados anteriormente por estudos realizados em nosso laboratório (Haanwinckel *et al*, 1995; Ventura *et al*, 2002; Durlo *et al*, 2004).

Sabe-se que a EVEC isotônica ativa receptores especializados localizados em determinadas regiões do sistema cardiovascular, os quais levam impulsos via nervos vago e glossofaríngeo até a região do NTS, de onde partem conexões multissinápticas que alcançam o NPV e NSO, promovendo a ativação dos neurônios hipotalâmicos e secreção dos hormônios neuro-hipofisários (AVP e OT). Uma vez secretados para a circulação sistêmica,

esses peptídeos irão atuar promovendo os ajustes necessários para a manutenção homeostática do LEC.

Como já foi descrito anteriormente, a EVEC também promove liberação de ANP não só dos cardiomiócitos, mas também do hipotálamo. O ANP produzido centralmente estimula a secreção de OT pela hipófise posterior. Esta, uma vez presente na circulação sistêmica, estimula diretamente o coração para a produção e liberação de ANP periférico, principal responsável pelos efeitos renais observados, e em menor proporção, age também sobre os túbulos renais, promovendo natriurese.

Os dados obtidos mostraram que a EVEC promoveu um aumento nas concentrações plasmáticas de corticosterona, sugerindo que o eixo HHA esteja envolvido na regulação do equilíbrio hidreletrolítico. Vários estudos têm demonstrado que os hormônios neuro-hipofisários apresentam concentrações plasmáticas aumentadas mediante diferentes estímulos estressores, como imobilização, hipoglicemia e natação forçada (Lang *et al*, 1983).

Durlo *et al* (2004) mostraram que a secreção de prolactina (PRL) em resposta à EVEC é também modulada pelo eixo HHA, sem, no entanto, influenciar diretamente a liberação de ANP e OT no modelo experimental de EVEC. Esses autores também sugeriram que a secreção de ANP neste modelo experimental não seria diretamente modulada pelos glicocorticóides.

De fato, os dados apresentados mostraram que a administração de dexametasona, que possui ação estimulatória sobre a liberação de ANP dos cardiomiócitos (Fink *et al*, 1992), não altera a secreção deste hormônio observada em resposta à EVEC. Estudos *in vitro* desenvolvidos em nosso laboratório apontam para uma regulação central dos glicocorticóides sobre a

secreção de ANP, uma vez que a incubação prévia do hipotálamo médio-basal proveniente de ratos pré-tratados com dexametasona reduziu a secreção de ANP em resposta ao aumento da osmolalidade do meio de incubação.

O presente trabalho mostrou ainda que a administração do glicocorticóide sintético dexametasona diminuiu significativamente as concentrações plasmáticas de OT em resposta à EVEC isotônica e hipertônica. Em ratos previamente adrenalectomizados, a secreção de OT induzida pela EVEC hipertônica foi potencializada, sugerindo que o eixo HHA esteja modulando negativamente a secreção deste hormônio nesta situação.

Outros autores mostraram que a EVEC isotônica induz aumento no número de células ativadas (Randolph *et al*, 1998) e duplamente marcadas para fos-OT no hipotálamo (Godino *et al*, 2005). O presente trabalho confirmou estes achados, mostrando ainda que a EVEC hipertônica promoveu aumento na ativação dos neurônios ocitocinérgicos do NPV e NSO. Além de modular a secreção de OT induzida pela EVEC, o eixo HHA também parece estar envolvido na ativação dos neurônios ocitocinérgicos, uma vez que o pré-tratamento com dexametasona diminuiu significativamente o número de células duplamente marcadas para fos-OT no NPV e NSO, reforçando a hipótese de uma ação inibitória do glicocorticóide sobre a ativação neuronal ocitocinérgica desencadeada tanto pela EVEC isotônica quanto hipertônica.

Por outro lado, o eixo HHA parece não interferir diretamente na secreção de AVP induzida pela EVEC, uma vez que a administração aguda de dexametasona não alterou as concentrações plasmáticas deste hormônio. Esses dados confirmam resultados obtidos *in vitro* por outros autores, mostrando que este tratamento não altera a liberação nem o conteúdo de AVP

da neuro-hipófise e EM (Verbalis *et al*, 1986). Os experimentos mostraram ainda que a adrenalectomia reverteu a queda na secreção de AVP normalmente observada em resposta à EVEC isotônica. Estudos já mostraram que esta resposta pode ocorrer devido ao surgimento de um mecanismo compensatório de síntese de AVP, desencadeado frente à inexistente responsividade do eixo HHA ao CRH no modelo de adrenalectomia. Portanto, a AVP secretada atuaria, juntamente com o CRH, como secretagogo de ACTH na adeno-hipófise, agindo via receptores do subtipo V<sub>1b</sub> (Whitnall, M.H., 1988). Verbalis *et al* (1986) mostraram que a liberação de AVP induzida *in vitro* por despolarização dos terminais da camada externa da EM é aumentada em ratos adrenalectomizados. Segundo os autores, esse aumento se deve primariamente à liberação vasopressinérgica de feixes neuronais que partem da porção parvocelular do PVN, sugerindo a participação da AVP produzida por este grupo neuronal neste mecanismo compensatório observado em animais adrenalectomizados.

Recentes estudos sugerem ainda que ocorra uma regulação intra-hipofisária e intra-hipotalâmica da secreção de AVP (Sperlágh, B. *et al*, 1999), envolvendo células da glia como elementos capazes de modular a secreção dos hormônios neuro-hipofisários por meio da liberação de neurotransmissores já conhecidos (como GABA, glicina e óxido nítrico), bem como outros de ação ainda não definidas sobre o equilíbrio hidreletrolítico, como a taurina, um neurotransmissor que parece estar envolvido na dissociação entre a liberação central e periférica de AVP em resposta a diferentes estímulos estressores (Engelmann, M. *et al*, 2001; Rosso, L. *et al*, 2003).

Com relação à atividade neuronal, os dados imuno-histoquímicos mostraram que o pré-tratamento com dexametasona não alterou o padrão de ativação dos neurônios vasopressinérgicos observado em resposta ao estímulo isotônico, porém diminuiu a resposta celular à EVEC hipertônica. Esses dados sugerem que a secreção de AVP induzida pelo estímulo hipertônico em animais pré-tratados com dexametasona seja mantida, predominantemente, pela liberação de estoques neuro-hipofisários e não pela síntese hormonal “de novo” nos neurônios magnocelulares do NSO e NPV.

O efeito inibitório exercido pelos glicocorticóides sobre os genes que controlam vários tipos de respostas, notadamente as que envolvem o sistema imune, vem sendo amplamente estudado devido ao interesse nas aplicações clínicas deste conhecimento. O principal mecanismo de ação, denominado transcricional, envolve o controle de sítios regulatórios, presentes nestes genes, para os fatores de transcrição Kappa B (NFκB) e para a família de proteínas AP-1, à qual pertencem os produtos c-fos e c-jun.

González *et al* (2000) mostraram que os glicocorticóides antagonizam a ligação dos membros da AP-1 ao DNA por meio da inibição da fosforilação de uma MAP Kinase da cascata intracelular de ativação da transcrição. Também foi demonstrado que um desvio nesta via intracelular de sinalização é capaz de conferir resistência em células imunes (Tsitoura *et al*, 2004). Os dados imuno-histoquímicos apresentados mostram que, em animais tratados com dexametasona, assim como nos controles, ocorre a ativação de células em diferentes sítios de expressão constitutiva, sugerindo que o padrão de inibição observado em resposta ao glicocorticóide seja conferido de maneira específica aos neurônios ativados pelo estímulo da EVEC.

Estudos *in vitro* mostraram que a dexametasona, numa fase inicial, estimula a translocação de NF $\kappa$ B para o núcleo e sua ligação ao DNA, enquanto que, numa fase posterior e prolongada, inibe a degradação e estimula a síntese de I $\kappa$ B, o tampão intracelular do NF $\kappa$ B, diminuindo a atividade transcricional desta via (Castro-Caldas *et al*, 2003).

Além da enorme influência que o glicocorticóide parece exercer sobre a transcrição de diversos genes, entre eles os que determinam a síntese de AVP e OT, têm surgido recentemente na literatura dados acerca das ações não-genômicas do receptor de glicocorticóide (GR), que diferem das ações transcripcionais clássicas pelo alvo, tipo de interação e tempo de ação (Limbourg e Liao, 2003).

Di *et al* (2003) demonstraram pela primeira vez que o glicocorticóide inibe de forma bastante rápida a liberação de glutamato, o principal mediador estimulatório do SNC, em neurônios do NPV, por meio da ação de um mensageiro retrógrado da família dos endocanabinóides. Estes pesquisadores sugerem ainda que essa ação seja mediada por um receptor de membrana, e não pelo conhecido GR citoplasmático. De acordo com este estudo, a inibição ocorre predominantemente sobre neurônios ocitocinérgicos, seguidos dos vasopressinérgicos e CRH-érgicos.

Portanto, sugerimos que o eixo HHA desempenhe uma ação moduladora da secreção de AVP e OT. Este controle, porém, parece se dar de formas distintas e envolver, como mecanismos mais imediatos, a participação dos endocanabinóides (Di, S. *et al*, 2003; Di, S. *et al*, 2005), e, a longo prazo, uma interferência com a transcrição gênica por meio do controle sobre a atividade dos fatores transcripcionais.

Dessa forma, o presente estudo visou pesquisar alguns dos mecanismos neuroendócrinos envolvidos na mediação das respostas a um estímulo de alteração do volume e/ou da osmolalidade do LEC, destacando o controle exercido pelo eixo HHA sobre a secreção de diversos hormônios, bem como sobre a expressão da proteína c-fos desencadeados por estas alterações.

## **7. CONCLUSÕES**

Os dados apresentados sugerem que os glicocorticóides exercem um controle negativo sobre a síntese e secreção de OT pelos neurônios magnocelulares hipotalâmicos em resposta aos estímulos de aumento de volume e osmolalidade do LEC. A modulação exercida sobre a secreção de AVP induzida pela EVEC hipertônica também está sob controle inibitório do eixo HHA, porém o padrão de secreção de AVP em resposta à EVEC isotônica parece envolver mecanismos não tão claros de controle. Os resultados sugerem ainda que a secreção de ANP em resposta ao estímulo de alteração do volume e osmolalidade não é modulada diretamente pelo eixo HHA.

## **8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

**ANTUNES-RODRIGUES, J., COVIAN, M.R.** Hypothalamic control of chloride and water intake. *Acta Physiol. Latinoamer.* 13:94-100, 1963.

**ANTUNES-RODRIGUES, J., COVIAN, M.R.** Specific changes in water intake and adipsia for water and sodium chloride after hypothalamic lesions. *Acta Physiol. Latinoamer.* 13: 94-100, 1965.

**ANTUNES-RODRIGUES, J., RAMALHO, M.J., REIS, L.C., MENANI, J.V., TURRIN, M.Q., GUTKOWSKA, J., McCANN, S.M.** Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:2956-60, 1991.

**ARIMA, H., KONDO, K., MURASE, T., YOKOI, H., IWASAKI, Y., SAITO, H., OISO, Y.** Regulation of vasopressin synthesis and release by area postrema in rats. *Endocrinology*. 139: 1481-1486, 1998.

**BROOKS, F.P., PICKFRD, M.** The effect of posterior pituitary hormones on the excretion of electrolytes, in dogs. *J. Physiol.*, 142: 468-493, 1958.

**CASTRO, M., FIGUEIREDO, F., MOREIRA, A.C.** Time-course of hypothalamic CRH and pituitary ACTH contents, and pituitary responsiveness to CRH stimulation after bilateral adrenalectomy. *Horm. Metab. Res.*, 27:10-15, 1995.

**CASTRO-CALDAS. M., MENDES, A.F., CARVALHO, A., DUARTE, C.B., LOPES, M.C.** Dexamethasone prevents interleukin 1 $\beta$ -induced nuclear factor  $\kappa$ -B by upregulating I $\kappa$ B- $\alpha$  synthesis in lymphoblastic cells. *Mediators of Inflammation*, 12:37-46, 2003.

**DADOUN, F., VELUT, J.G., GUILLAUME, V., SAUZE, N., ORSONI, J.C., GAILLARD, R.C., OLIVER, C.C.** Combined hypervolemia and hypoosmolality alter hypothalamic-pituitary-adrenal axis response to endotoxin stimulation. *Neuroendocrinology*, 69(5):352-9, 1999.

**DI, S., MALCHER-LOPES, R., HALMOS, K.C., TASKER, J.** Nongenomic glucocorticoid inhibition via endocannabinoid release in the hypothalamus: a fast feedback mechanism. *J. Neurosci.*, 23(12):4850-57, 2003.

**DI, S., MALCHER-LOPES, MARCHESELLI, V.L., BAZAN, N.G., TASKER, J.G.** Rapid glucocorticoid-mediated endocannabinoid release and

opposing regulation of glutamate and  $\gamma$ -aminobutyric acid inputs to hypothalamic magnocellular neurons. *Endocrinology*, 145(10):4292-4301, 2005.

**DURLO, F.V., CASTRO, M., ELIAS, L.L.K., ANTUNES-RODRIGUES, J.** Interaction of prolactin, ANPergic, oxytocinergic and adrenal systems in response to extracellular volume expansion in rats. *Exp. Physiol.*, 89(5): 541-48, 2004.

**ELIAS, L.L.K., CASTRO, M., OLIVEIRA, F.R.T., SIQUEIRA, M.L.S., McCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J.** Effect of vasopressin (AVP) on atrial natriuretic peptide (ANP) release in rats (Abstract). *Proc. Int. Congr. Endocrinol. 11<sup>th</sup> Sydney Australia 2000*, p.347.

**ENGELMANN, M., LUDWIG, M., SINGEWALD, N., EBNER, K., SABATIER, N., LUBEC, G., LANDGRAF, R., WOTJAK, C.T.** Taurine selectively modulates the secretory activity of vasopressin neurons in conscious rats. *Eur. J. Neurosci.*, 14:1047-1055, 2001.

**FAVARETTO, A.L., BALLEJO, G.O., ALBUQUERQUE-ARAÚJO, W.I., GUTKOWSKA, J., ANTUNES-RODRIGUES, J., McCANN, S.M.** Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides*. 18: 1377-1381, 1997.

**FINK, G., DOW, R.C., CASLEY, D., JONHSTON, C.I., BENNIE, J., CARROL, S., DICK, H.** Atrial natriuretic peptide is involved in the ACTH response to stress and glucocorticoid negative feedback in the rat. *J. Endocrinol.*, 1:37-43, 1992.

**GODINO, A., GIUSTI-PAIVA, A., ANTUNES-RODRIGUES, J., VIVAS, L.** Neurochemical brain groups activated after an isotônica blood volume expansion in rats. *Neuroscience*, 133:493-505, 2005.

**GONZÁLEZ, M.V., JIMÉNEZ, B., BERCIANO, M.T., GONZÁLEZ-SANCHO, J.M., CAELLES, C., LAFARGA, M., MUÑOZ, A.** Glucocorticoids antagonize AP-1 by inhibiting the activation/phosphorylation of JNK without affecting its subcellular distribution. *J. Cell Biol.*, 150(5):1199-1207, 2000.

**GRINDSTAFF, R.R., CUNNINGHAM, J.T.** Cardiovascular regulation of vasopressin neurons in the supraoptic nucleus. *Exp. Neurol.*, 171:219-226, 2001.

**GUTKOWSKA, J., HORKY, K., THIBAUT, G., JANUSZEWICZ, P., CANTIN, M. E GENEST, J.** Atrial natriuretic factor is a circulating hormone. *Biochem. Biophys. Res. Comum.* 125, 315-323, 1984.

**HAANWINCKEL, M.A., ELIAS, L.L.K., FAVARETTO, A.L., GUTKOWSKA, J., McCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J.** Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 92:7902-7906, 1995.

**HARMS, P.G., OJEDA, S.R.** A rapid and simple procedure for chronic cannulation of the rat jugular vein. *Appl Physiol.* 36(3):391-2, 1974.

**HATTON, G.I., HUTTON, U.E., HOBLITZELL, E.R., ARMSTRONG, W.E.** Morphological evidence for two populations of magnocellular elements in the paraventricular nucleus. *Brain Res.*, 108:187-93, 1976.

**HUANG, W., LEE, S., SJOQUIST, M.** Natriuretic role of endogenous oxytocin in male rats infused with hypertonic NaCl. *Am. J. Physiol.*, 258(37):634-40, 1995.

**HUSSAIN, M.K., FERNANDO, N., SHAPIRO, M., KAGAN, A. E GLICK, S.M.** Radioimmunoassay of arginine vasopressin in humans plasma. *J.Clin. Endocrinol. Metab.*, 37(4):616-625, 1973.

**JANKOWSKI, M., ILAJJAR, F., KAWAS, S.A., MUKADDAM-DAHER, S., HOFFMAN, G., McCANN, S.M., GUTKOWSKA, J.** Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* 95: 14558-14563, 1998.

**KASTING, N.W.** Simultaneous and independent release of vasopressin and oxytocin in the rat. *Can. J. Physiol. Pharmac.*, 66:22-26, 1988.

**LANDGRAF, R., MALKINSON, T., HORN, T., VEALE, W.L., LEDERIS, K., PITTMAN, Q.J.** Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular stimulation in rats. *Am. J. Physiol.*, 258(27):155-59, 1990.

**LANG, R.E., HEIL, J.W.E., GANTEN, D., HERMANN, K., UNGER, T., RASCHER, W.** Oxytocin unlike vasopressin is a stress hormone in the rat. *Neuroendocrinology*, 37:314-316, 1983.

**LIMBOURG, F.P., LIAO, J.K.** Nontranscriptional actions of the glucocorticoid receptor. *J. Mol. Med.*, 81:168-74, 2003.

**LUDWIG, M., CALLAHAN, M.F., LANDGRAF, R., JOHNSON, A.K., MORRIS, M.** Neural inputs modulate osmotically stimulated release of vasopressin into the supraoptic nucleus. *Am. J. Physiol.*, 270(33):787-792, 1996.

**McCANN, S.M., BROBECK, J.R.** Evidence for a role of the supraopticohypophyseal system in regulation of adrenocorticotrophin secretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 87:318-324, 1954.

**McCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J., FRANCI, C.R., ANSELMO-FRANCI, J.A., KARANTH, S., RETTORI, V.** Role of the hypothalamic pituitary adrenal axis in the control of the response to stress and infection. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 33:1121-31, 2000.

**MEZEY, E., KISS, J.Z.** Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. *Endocrinology* 12:1814-1820, 1991.

**MICHELINI, L.C.** Vasopressin in the nucleus tractus solitarius: a modulator of baroreceptor reflex control of heart rate. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 27(4):1017-24, 1984.

**MUKOYAMA, M., ARAI, H., KATSUURA, G., EIGYO, M., MATSUSHITA, A., IMURA, H.** Modulatory role of vasopressin in secretion of atrial natriuretic polypeptide in conscious rats. *Endocrinology*. 120: 2186-2188, 1987.

**OLIET, S.H., BOURQUE, C.W.** Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature*. 22;364(6435): 341-343, 1993.

**PAXINOS, G., WATSON, C.** The rat brain in stereotaxic coordinates. *San Diego: Academic Press*, 1997.

**RANDOLPH, R.R., LI, K.S., KURTIS, K.S., SULLIVAN, M.J., CUNNINGHAM, J.T.** Fos expression following isotonic volume expansion of the unanesthetized male rat. *Am. J. Physiol.* 274(43):1345-52, 1998.

**RENAUD, L.P., JHAMANDAS, J.H., BUIJIS, R., RABY, W., RANDLE, J.C.** Cardiovascular input to hypothalamic neurosecretory neurons. *Brain Res. Bull.*, 20(6):771-7, 1988.

**ROSSO, L., PETERI-BRUNBACK, B., POUJEOL, P., HUSSY, N., MIENVILLE, J.M.** Vasopressin-induced taurine efflux from rat pituicytes: a potential negative feedback for hormone secretion. *J. Physiol.*, 554(3):731-42, 2003.

**SIBBALD, J.R., SIRETT, N.E., HUBBARD, J.I.** Osmosensitive neurons in the rat subfornical organ. *Brain Res.* 461: 205-214, 1988.

**SOARES, T.J., COIMBRA, T.M., MARTINS, A.R., PEREIRA, A.G., CARNIO, E.C., BRANCO, L.G., ALBUQUERQUE-ARAÚJO, W.I., De NUCCI, G., FAVARETTO, A.L., GUTKOWSKA, J., McCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J.** Atrial natriuretic peptide and oxytocin induce natriuresis by release of cGMP. *Proc Natl Acad Sci USA*; 5;96(1): 278-283, 1999.

**STRICKER, E.M., VERBALIS, J.G.** Interaction of osmotic and volume stimuli in regulation of neurohypophyseal secretion in rats. *Am. J. Physiol.*, 250(19):267-275, 1986.

**SWANSON, L.W., KUYPERS, H.G.** The paraventricular nucleus of hypothalamus cytoarchitectonic subdivisions and organization of projections to the pituitary, dorsal vagal complex, and spinal cord as demonstrated by retrograde fluorescence double-labelling methods. *J. Comp. Neurol.* 194:555-570, 1980.

**SWANSON, L.W., SAWCHENKO, P.E., LIND, R.W.** Regulation of multiple peptides in CRF parvocellular neurosecretory neurons: implications for the stress response. *Prog. Brain Res.* 68:169-190, 1986.

**TSITOURA, D.C., ROTHMANN, P.B.** Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4 T cells. *J. Clin. Invest.*, 113(4):619-627, 2004.

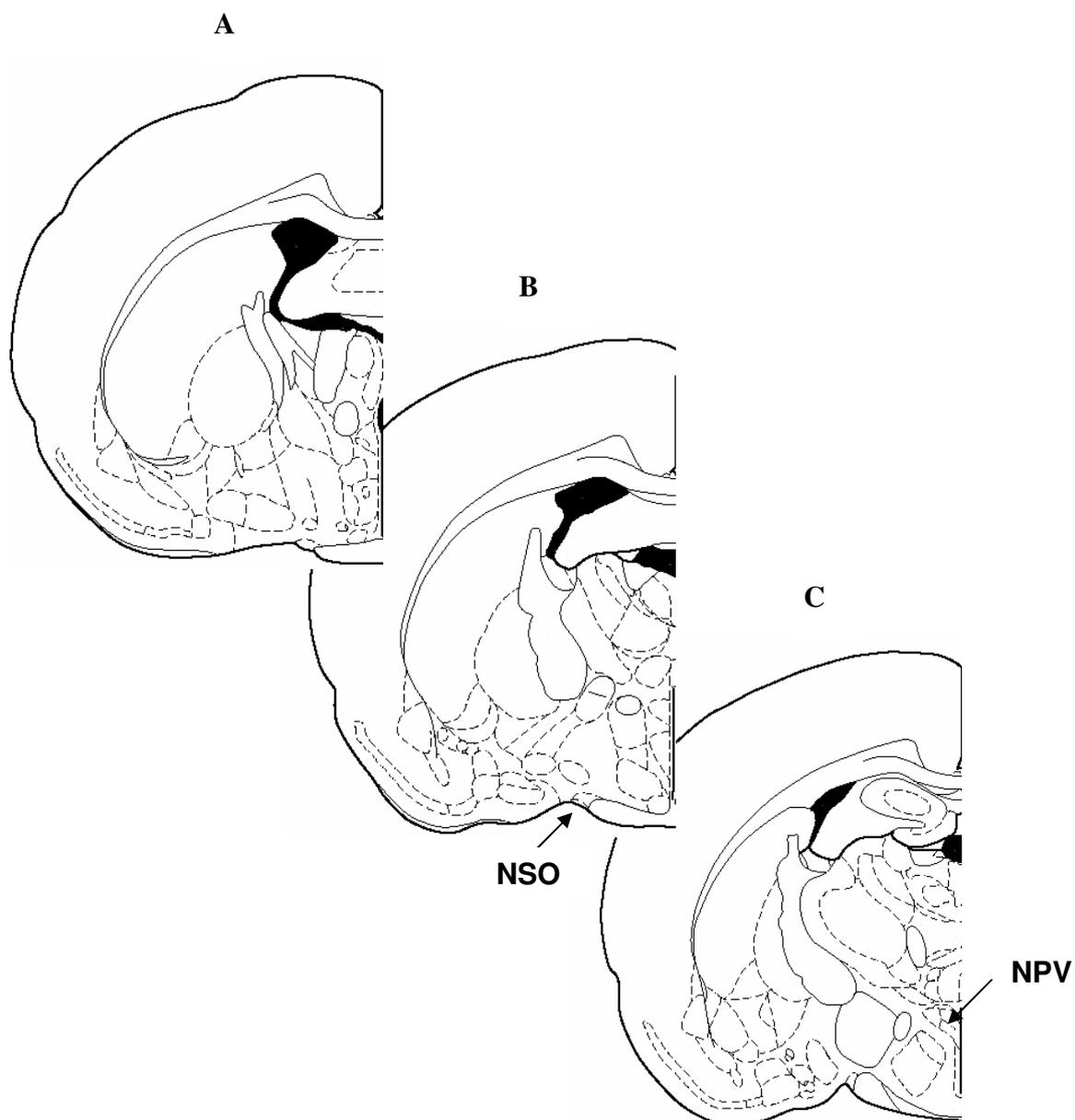
**VECSEI, P.** Glucocorticoids: cortical, corticosterone and compounds. Em Jaffe, B.M., Berhman, H.R. Methods of hormone radioimmunoassay. *New York, Academic Press*, 39:767-792, 1979.

**VENTURA, R.R., GOMES, D.A., REIS, W.L., ELIAS, L.L.K., CASTRO, M., VALENÇA, M.M., CARNIO, E.C., RETTORI, E., McCANN, S.M., ANTUNES-RODRIGUES, J.** Nitrgic modulation of vasopressin, oxytocin and natriuretic peptide secretion in response to sodium intake and hypertonic blood volume expansion. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 35:1101-1109, 2002.

**VERBALIS, J.G., BALDWIN, E.F., RONNEKLEIV, O.K., ROBINSON, A.G.** In vitro release of vasopressin and oxytocin from rat median eminence tissue. *Neuroendocrinology*, 42(6):481-8, 1986.

**WHITNALL, M.H.** Distributions of pro-vasopressin expressing and pro-vasopressin deficient neurons in the paraventricular hypothalamic nucleus of colchicines-treated normal and adrenalectomized rats. *J. Comp. Neurol.*, 275:13-28, 1988.





**ANEXO A** – Cortes sagitais mostrando em **A** a coordenada -0,92 mm, em relação ao bregma (onde foi analisada a porção CA do NPV); em **B** a coordenada -1,3 mm em relação ao bregma (onde foram analisados a porção MM do NPV e o NSO) e em **C**, a coordenada - 1,8 mm em relação ao bregma (onde foi analisada a porção LM do PVN). Extraído de Paxinos & Watson, 1997.

**ANEXO B** - Efeitos da administração intraperitoneal prévia de dexametasona sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC isotônica. Valores individuais, médias e EPM nos tempos 0 (basal) e 5 minutos após a EVEC.

	Corticosterona ( $\mu\text{g/dl}$ )				Ocitocina ( $\text{pg/ml}$ )				Vasopressina ( $\text{pg/ml}$ )				Peptídeo Natriurético Atrial ( $\text{pg/ml}$ )			
	EVEC I		D + EVEC I		EVEC I		D + EVEC I		EVEC I		D + EVEC I		EVEC I		D + EVEC I	
	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'
	2.73	20.13	0.63	1.19	2.29	4.88	2.56	1.44	2.53	1.40	1.06	2.43	61.11	388.9	74.75	418.7
	7.99	13.71	0.41	1.37	0.80	8.48	1.89	1.95	2.70	1.35	2.23	1.47	67.92	360.7	94.78	107.3
	2.64	6.56	0.72	1.43	1.80	5.26	1.03	0.82	2.73	1.72	1.65	1.58	31.17	457.2	80.15	476.7
	5.35	17.00	0.78	1.01	3.79	3.11	6.95	3.80	1.53	2.18	1.25	1.60	68.67	440.4	78.38	576.0
	8.73	13.08	1.89	1.74	2.70	4.97	1.76	1.35	2.14	1.16	1.88	1.83	94.78	333.0	62.76	577.2
	6.76	10.11	1.25	2.17	3.18	2.94	1.60	1.26	2.22	0.93	1.57	2.02	80.15	382.2	121.5	235.1
	2.52		0.72	6.32	1.88	3.80	3.81	1.44	2.33	1.27	2.16	2.06	78.38	281.3	94.14	602.3
	2.64		0.82	4.46	1.37	4.83	3.01	1.37	1.40	1.20	1.36	1.63	62.76	210.0	137.4	492.6
	6.07		1.00			2.16	1.82	3.27	2.46	1.53		1.97	64.08			574.5
	8.30		0.77				1.66	1.35	1.40			1.76	68.67			448.8
	2.17							1.83	2.46							
	11.00								1.51							
	2.73								1.30							
	8.73								1.98							
	9.64								2.48							
<b>MÉDIA</b>	5.86	13.43	0.89	2.46	2.23	4.49	2.61	1.81	2.08	1.41	1.64	1.84	67.77	356.7	92.99	450.9
<b>EPM</b>	0.79	1.96	0.13	0.67	0.34	0.61	0.54	0.27	0.13	0.12	0.15	0.09	5.18	28.83	8.88	51.40

**ANEXO C** - Efeitos da administração intraperitoneal prévia de dexametasona sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC hipertônica. Valores individuais, médias e EPM nos tempos 0 (basal) e 5 minutos após a EVEC.

Corticosterona (µg/dl)		Ocitocina (pg/ml)				Vasopressina (pg/ml)				Peptídeo Natriurético Atrial (pg/ml)						
EVEC H		D + EVEC H		EVEC H		D + EVEC H		EVEC H		D + EVEC H		EVEC H		D + EVEC H		
0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	
2.73	28.37	0.63	3.22	2.29	60.21	2.56	17.49	2.53	4.90	1.06	3.72	61.11	538.1	74.75	470.9	
7.99	30.53	0.41	3.37	0.80	59.34	1.89	18.71	2.70	3.08	2.23	3.91	67.92	394.1	94.78	411.0	
2.64	33.27	0.72	13.59	1.80	53.10	1.03	17.04	2.73	3.82	1.65	4.78	31.17	334.3	80.15	499.6	
5.35	26.06	0.78	1.68	3.79	30.29	6.95	28.75	1.53	4.93	1.25	5.98	68.67	377.9	78.38	563.2	
8.73	31.58	1.89	1.36	2.70	33.02	1.76	25.42	2.14	4.34	1.88	5.67	94.78	321.8	62.76	581.3	
6.76	32.41	1.25	10.65	3.18	74.44	1.60	25.50	2.22	4.33	1.57	4.04	80.15	341.7	121.5	330.5	
2.52	31.86	0.72	3.24	1.88		3.81	12.57	2.33	5.11	2.16		78.38	490.7	94.14	363.6	
2.64	33.86	0.82	8.36	1.37		3.01	12.02	1.40	4.86	1.36		62.76	294.3	137.4	701.9	
6.07	20.79	1.00	1.60			1.82		2.46				64.08	377.5		277.6	
8.30	26.76	0.77				1.66		1.40				68.67	361.8			
2.17								2.46								
11.00								1.51								
2.73								1.30								
8.73								1.98								
9.64								2.48								
<b>MÉDIA</b>	5.86	29.55	0.89	5.23	2.23	51.73	2.61	19.69	2.08	4.42	1.64	4.69	67.77	483.2	92.99	466.6
<b>EPM</b>	0.79	1.28	0.13	1.49	0.34	6.97	0.54	2.20	0.13	0.24	0.15	0.39	5.18	27.50	8.88	45.17

**ANEXO D** - Efeitos da adrenalectomia prévia sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC isotônica. Valores individuais, médias e EPM nos tempos 0 (basal) e 5 minutos após a EVEC.

	Corticosterona (µg/dl)				Ocitocina (pg/ml)				Vasopressina (pg/ml)				Peptídeo Natriurético Atrial (pg/ml)			
	SHAM		ADX		SHAM		ADX		SHAM		ADX		SHAM		ADX	
	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'
	1.05	2.88	0.12	0.18	0.78	0.97	0.47	1.06	4.18	2.91	1.89	4.54	49.89	189.2	59.89	151.6
	0.68	3.72	0.12	0.37	0.84	2.32	0.84	2.29	3.24	2.22	2.67	4.68	37.96	132.5	47.96	180.6
	0.53	6.58	0.17	0.17	2.54	1.79	0.53	4.43	3.13	2.75	3.08	3.68	78.82	104.5	68.82	122.2
	3.10	4.74	0.21	0.19	1.69	0.56	1.32	9.43	3.82	2.60	3.44	4.48	87.71	168.4	57.71	198.0
	1.89	4.52	0.12	0.21	1.25	1.88	2.42	4.84	2.50	1.21	2.31	4.70	30.89	142.9	31.90	198.4
	1.90	6.48	0.17	0.21	0.69	4.65	1.85	4.40	4.04	1.54	3.44	4.21	31.17	156.6	31.17	163.4
	1.94	1.42		0.12	0.50	1.57		3.52	2.69			3.79	62.76		72.76	156.1
	0.32	5.44		0.34	0.40	1.00			3.19			3.75	94.78		84.78	
	0.44	7.46			1.10				2.47			2.76	80.15		80.15	
												3.00	78.38		68.38	
												6.44	68.67		78.67	
												2.62	39.60		49.60	
												4.95	43.20		53.20	
												3.11	64.08		54.08	
													65.12		75.12	
<b>MÉDIA</b>	1.31	4.80	0.15	0.22	1.09	1.84	1.24	4.28	3.25	2.20	2.80	4.05	60.88	149.0	60.94	167.2
<b>EPM</b>	0.31	0.64	0.01	0.03	0.22	0.44	0.31	0.99	0.21	0.28	0.25	0.27	5.41	12.03	4.28	10.36

**ANEXO E** - Efeitos da adrenalectomia prévia sobre as concentrações plasmáticas de corticosterona, OT, ANP e AVP em resposta à EVEC hipertônica. Valores individuais, médias e EPM nos tempos 0 (basal) e 5 minutos após a EVEC.

	Corticosterona (µg/dl)				Ocitocina (pg/ml)				Vasopressina (pg/ml)				Peptídeo Natriurético Atrial (pg/ml)			
	SHAM		ADX		SHAM		ADX		SHAM		ADX		SHAM		ADX	
	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'	0'	5'
	1.05	9.71	0.12	0.12	0.78	44.19	0.47	25.14	4.18	5.25	1.89	4.53	49.89	309.9	59.89	234.4
	0.68	8.72	0.12	0.21	0.84	27.53	0.84	27.04	3.24	3.70	2.67	6.10	37.96	154.9	47.96	274.4
	0.53	14.87	0.17	0.12	2.54	32.02	0.53	36.19	3.13	4.50	3.08	7.02	78.82	303.3	68.82	162.8
	3.10	11.77	0.21	0.12	1.69	34.55	1.32	51.36	3.82	4.53	3.44	9.37	87.71	81.24	57.71	250.0
	1.89	13.19	0.12	0.12	1.25	28.59	2.42	23.46	2.50	8.74	2.31	6.63	30.89	283.7	31.90	293.6
	1.90	13.92	0.17	0.12	0.69	32.00	1.85	42.06	4.04	2.81	3.44	6.80	31.17	218.2	31.17	185.5
	1.94	15.58		0.46	0.50	35.85		34.23	2.69	6.51		9.37	62.76	255.9	72.76	
	0.32	14.10		0.69	0.40	52.74		23.19	3.19	5.18		5.62	94.78	100.2	84.78	
	0.44				1.10	54.74		30.10	2.47	7.09		5.47	80.15		80.15	
						31.99		27.57		6.24		8.76	78.38		68.38	
						37.55		35.91		5.23		4.93	68.67		78.67	
						55.46		40.25		4.49		12.68	39.60		49.60	
						50.06		35.70		9.96		7.04	43.20		53.20	
						33.68				5.83		5.49	64.08		54.08	
						44.89				8.64			65.12		75.12	
<b>MÉDIA</b>	1.31	12.73	0.15	0.24	1.09	29.72	1.24	33.25	3.25	5.91	2.80	7.13	60.88	213.4	60.94	233.4
<b>EPM</b>	0.31	0.86	0.01	0.07	0.22	2.51	0.31	2.29	0.21	0.51	0.25	0.59	5.41	32.15	4.28	20.71

**ANEXO F** - Efeitos da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas para fos-OT observado nas porções CA, MM e LM do NPV e no NSO em resposta à EVEC isotônica. Valores individuais, médias e EPM de animais perfundidos 90 minutos após a indução da EVEC.

Dexametasona								Veículo								
Veículo				EVEC I				Veículo				EVEC I				
CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO	
1	1	1	0	0	0	0	2	2	0	2	2	12	10	15	17	
1	2	0	1	0	0	0	0	2	3	2	0	19	8	10	15	
1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4	10	5	7	
				0	1	1	0					0	2	4	8	
				1	0	1	0					2	4	7	5	
												9	11	8	4	
													3	1	4	
<b>MÉDIA</b>	1,33	1,33	0,66	0,33	0,20	0,20	0,40	0,40	1,33	1,00	1,33	0,66	7,66	6,85	7,14	8,57
<b>EPM</b>	0,66	0,33	0,33	0,33	0,20	0,20	0,24	0,40	0,66	1,00	0,66	0,66	2,90	1,42	1,71	2,01

**ANEXO G** - Efeitos da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas para fos-OT observado nas porções CA, MM e LM do NPV e no NSO em resposta à EVEC hipertônica. Valores individuais, médias e EPM de animais perfundidos 90 minutos após a indução da EVEC.

		Dexametasona								Veículo							
		Veículo				EVEC H				Veículo				EVEC H			
		CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO
		1	1	1	0	1	1	0	2	2	0	2	2	5	12	11	16
		1	2	0	1	0	6	0	3	2	3	2	0	7	14	12	10
		1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	3	10	8	8
						0	3	2	2					2	5	7	14
						1	2	3	5					2	4	8	19
						2										6	
<b>MÉDIA</b>		1,33	1,33	0,66	0,33	0,83	2,60	1,20	2,60	1,33	1,00	1,33	0,66	3,80	9,00	8,66	13,4
<b>EPM</b>		0,66	0,33	0,33	0,33	0,30	0,92	0,58	0,67	0,66	1,00	0,66	0,66	0,97	1,94	0,95	1,99

**ANEXO H** - Efeitos da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas para fos-AVP observado nas porções CA, MM e LM do NPV e no NSO em resposta à EVEC isotônica. Valores individuais, médias e EPM de animais perfundidos 90 minutos após a indução da EVEC.

	Dexametasona								Veículo							
	Veículo				EVEC I				Veículo				EVEC I			
	CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO
	2	0	1	1	8	0	0	3	0	2	1	1	2	1	1	1
	0	1	2	1	9	0	0	2	0	2	1	2	0	1	1	2
	2	5	2	0	0	0	4	1	1	0	0	2	0	2	1	1
					1	1	0	1					6	3	3	1
													1	0	0	1
<b>MÉDIA</b>	1,33	2,00	1,66	0,66	4,50	0,25	1,00	1,75	0,33	1,33	0,66	1,66	1,80	1,40	1,20	1,20
<b>EPM</b>	0,66	1,52	0,33	0,33	2,32	0,25	1,00	0,47	0,33	0,66	0,33	0,33	1,11	0,51	0,49	0,20

**ANEXO I** - Efeitos da administração prévia de dexametasona sobre o número de células duplamente marcadas para fos-AVP observado nas porções CA, MM e LM do NPV e no NSO em resposta à EVEC hipertônica. Valores individuais, médias e EPM de animais perfundidos 90 minutos após a indução da EVEC.

		Dexametasona								Veículo							
		Veículo				EVEC H				Veículo				EVEC H			
		CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO	CA	MM	LM	NSO
		2	0	1	1	4	4	2	8	0	2	1	1	13	10	22	20
		0	1	2	1	1	2	3	2	0	2	1	2	15	16	22	15
		2	5	2	0	0	5	1	6	1	0	0	2	6	8	2	18
						1	1	4	0					2	9	3	11
							5		3						4	7	10
									3								
									3								
<b>MÉDIA</b>		1,33	2,00	1,66	0,66	1,50	9,40	2,40	3,66	0,33	1,33	0,66	1,66	9,00	9,40	11,2	14,8
<b>EPM</b>		0,66	1,52	0,33	0,33	0,86	1,93	0,51	1,17	0,33	0,66	0,33	0,33	3,02	0,81	4,48	1,93

# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)