

NATALIA RIBEIRO

**ESTUDO DOS MECANISMOS NEURONAIS HIPOTALÂMICOS E  
BULBARES ENVOLVIDOS NO MODELO DE HIPERTENSÃO INDUZIDA  
POR SOBRECARGA DE SÓDIO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Fisiologia Humana do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2018

## RESUMO

**RIBEIRO N. Estudo dos mecanismos neuronais hipotalâmicos e bulbares envolvidos no modelo de hipertensão induzida por sobrecarga de sódio.** [Tese (Doutorado em Fisiologia) ]- São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

A osmolaridade plasmática é caracterizada como a quantidade de partículas osmoticamente ativas presentes em um determinado volume de solvente, sendo uma variável fisiológica cuja constância é indispensável para a manutenção da vida. O aumento da osmolaridade plasmática é conhecido como hiperosmolaridade e é resultado do aumento do aporte de sódio ou da diminuição do volume plasmático de água. Trata-se de um desafio orgânico capaz de iniciar uma série de respostas neuro-hormonais que incluem a liberação de vasopressina e o aumento da atividade simpática, com consequente elevação da pressão arterial. Investigar os mecanismos pelos quais a hiperosmolaridade é capaz de influenciar o controle do sistema autonômico é essencial para elucidar o mecanismo envolvido no desenvolvimento da hipertensão secundária a ingestão de sódio. Neste sentido, o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) é um importante alvo de estudos, dado seu envolvimento na regulação da atividade simpática; esta região possui um grupamento neuronal caracterizado pela presença da enzima *Phenylethanolamine N-methyltransferase* (PNMT) conhecido como C1. A ativação dos neurônios do grupamento C1 já foi descrita em resposta a diversos desafios orgânicos tais como hipóxia, dor, hemorragia, inflamação, hipotensão e hipoglicemia. Sendo a hiperosmolaridade um desequilíbrio da homeostase, o primeiro objetivo deste trabalho foi investigar a função dos neurônios catecolaminérgicos do grupamento C1 no desenvolvimento da resposta pressora secundária ao desafio osmótico crônico, provocado pela ingestão de salina hiperosmótica (NaCl 2%) durante 7 dias. Nossos resultados nos permitem concluir que: 1) a injeção de anti-DβH-saporina na região do RVLM causou a depleção de neurônios TH<sup>+</sup> na área em que estão localizados os neurônios dos grupamentos C1 e A5; 2) A depleção dos neurônios TH<sup>+</sup> não alterou o volume ingerido de solução NaCl 2% em relação ao grupo controle; 3) Após 7 dias de estímulo hiperosmótico os valores de hematócrito e osmolaridade plasmática não foram diferentes entre os animais controle e os animais com depleção de neurônios TH<sup>+</sup>; 4) A hipertensão secundária à ingestão de solução de NaCl 2% durante 7 dias foi prevenida pela lesão prévia dos neurônios TH<sup>+</sup> dos grupamentos C1 e A5; 5) A análise de variabilidade demonstrou que a lesão dos neurônios TH<sup>+</sup> inibiu o aumento do componente VLF da pressão arterial sistólica induzido pelo estímulo hiperosmótico durante 7 dias.

Ainda, alguns indivíduos apresentam uma maior suscetibilidade às alterações da pressão arterial quando expostos ao sódio sendo considerados sensíveis ao sal e, entre os diversos mecanismos possivelmente envolvidos na sensibilidade ao sódio o sistema nervoso autônomo parece desempenhar uma importante função no desenvolvimento desta condição. Desta forma, a segunda hipótese proposta neste estudo foi a de que, ratos Wistar e ratos espontaneamente hipertensos (SHR) quando submetidos a um desafio da osmolaridade, promovido pela ingestão de solução NaCl 2% apresentariam distintas respostas hemodinâmicas e de controle hidroeletrólítico, o que poderia auxiliar a compreensão dos mecanismos envolvidos no desenvolvimento da hipertensão arterial decorrente da exposição ao alto teor de sódio. Nossos resultados nos permitiram concluir: 1) em ambas as linhagens tanto o consumo de salina hiperosmótica quanto o volume urinário sofreram um incremento após 7 dias de estímulo hiperosmótico; 2) Em relação ao controle água, a ingestão de solução NaCl 2% durante 7 dias provocou o aumento da

osmolaridade e do conteúdo de sódio plasmáticos semelhante entre os ratos Wistar e SHR; 3) Após 7 dias de estímulo hiperosmótico a linhagem SHR desenvolveu uma elevação da pressão arterial de maior magnitude comparado aos ratos Wistar; 4) Comparado ao grupo controle, que recebeu somente água, a expressão gênica para o peptídeo vasopressina (VP) no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) esteve aumentada na linhagem Wistar após 1 e 7 dias de ingestão de NaCl 2%, enquanto nos SHR o aumento foi observado após 7 dias de estímulo hiperosmótico; 5) Após o estímulo hiperosmótico por 7 dias, o antagonismo sistêmico dos receptores para VP do tipo 1 causou uma redução significativamente maior da pressão arterial nos SHRs.

Em conjunto os resultados desta tese nos permitem apontar duas principais conclusões: 1) Os neurônios do grupamento neuronal C1 estão diretamente envolvidos no desenvolvimento da hipertensão arterial secundária a sobrecarga de sódio e; 2) O desafio osmótico induzido pela ingestão de solução NaC 2% provoca uma elevação da pressão arterial de maior magnitude em ratos SHR que está relacionada, pelo menos em parte, a ação periférica da vasopressina.

**Palavras-Chave:** Sistema Nervoso Autônomo. Hiperosmolaridade. Hipertensão. Hipotálamo. Neurônios Catecolaminérgicos. Ratos Espontaneamente Hipertensos.

## ABSTRACT

RIBEIRO, N. **Hypothalamic and medullary mechanism involved in sodium-induced hypertension.** [Ph.D. (Human Physiology)] – São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

Plasma osmolality is defined as the number of osmoles of solute diluted in plasma and, the mammals are able to maintain its level within narrow physiological limits (~300 mOsm/Kg), which is indispensable for life maintenance. Increased plasma osmolality is known as hyperosmolality, and is result of an imbalance between sodium intake and plasma water volume. Hyperosmolality is able to evoke a series of neurohormonal responses that include vasopressin release, sympathoexcitation, and consequently blood pressure rise. To investigate the mechanisms by which hyperosmolality affects the autonomic control is essential to elucidate the mechanisms involved in salt-induced hypertension. Therefore, the RVLM is an important nucleus of interest to study, given its role in the control of sympathetic activity. The RVLM region has a specific cluster of neurons characterized by presence of PNMT enzyme and, named as C1 region. Activation of C1 neurons has been described in response to several organic challenges such as hypoxia, pain, hemorrhage, inflammation, hypotension and hypoglycemia. Since hyperosmolality is an imbalance of homeostasis, the first aim of this study was to investigate the role of C1 neurons in the development of salt-induced hypertension. In this sense, Wistar rats were submitted to a osmotic challenge elicits by NaCl 2% intake during 7 days. The results have shown that: 1) anti-DβH-saporin injection in RVLM region depleted TH<sup>+</sup> neurons in the C1 and A5 regions; 2) Depletion of TH<sup>+</sup> neurons did not affect the volume consumption of NaCl 2%, hematocrit, and plasma osmolality between control (sham) and C1 lesioned group; 3) Salt-induced hypertension was prevented by previous TH<sup>+</sup> neurons depletion of C1 region; 4) Variability analysis showed that, TH<sup>+</sup> neuron depletion inhibits the VLF component increase of systolic blood pressure, induced by the hyperosmotic stimulus.

Some individuals are more susceptible to changes in blood pressure when exposed to high sodium diet and, increases in sympathetic outflow seems to play an important role in this autonomic overactivity. Thus, the second aim of this work was investigate, and compare the hemodynamic and hydroelectrolytic responses elicits by hyperosmotic challenge with NaCl 2% intake, in Wistar and SHR. Our results have shown that: 1) Volume of liquid consumption, urinary volume, plasma osmolality, and plasma sodium increased after 7 days of high-salt exposure in both Wistar and SHR groups; 2) After 7 days of hyperosmotic stimulus SHR had a greater rise in blood pressure, compared to Wistar; 3) VP gene expression was higher in the PVN of both strains after 7 days of 2% NaCl intake when compared to water control group; 4) The systemic antagonism of V1 vasopressin receptors elicited a larger decreasing in the salt-induced hypertension of SHR when compared to Wistar.

In conclusion, the main findings of this study were: 1) C1 neurons are directly involved in the development of salt-induced hypertension; 2) The hyperosmotic challenge elicits a higher increase in blood pressure of SHR, compare to Wistar, and this response seems to be related, at least in part, to the peripheral VP action.

**Keyword:** Autonomic Nervous System. Hyperosmolality. Hypertension. Hypothalamus C1 neurons. Spontaneously Hypertensive Rats.

# 1 Introdução

## 1.1 Homeostase e Osmolaridade

Os mamíferos são seres capazes de regular seu meio interno de modo que suas células se encontrem constantemente banhadas por um meio estável e a esta capacidade se dá o nome de homeostase (Cannon, 1932). Todos os dias os seres humanos se deparam com diferentes tipos de ambientes, altitudes, graus de temperatura, tipos de alimentos e líquidos, atividades físicas, estresse, etc; no entanto seu meio interno deve manter-se constante, retornando a condições basais mesmo quando desafiado, ou seja, em homeostase.

Dentre as diversas variáveis orgânicas que necessitam ser finamente controladas para a manutenção da vida pode-se citar: a temperatura, a glicemia, o balanço energético e ácido-base, a pressão sanguínea dos gases, a pressão arterial e a osmolaridade. A constância dessas variáveis depende de um complexo e bem orquestrado sistema formado por núcleos encefálicos envolvidos no controle do sistema nervoso autônomo, hormônios e órgãos efetores que são responsáveis pela detecção das condições orgânicas, o processamento da informação e a execução de ajustes necessários.

A osmolaridade é uma importante variável fisiológica que, como tal, necessita ser finamente controlada para a viabilidade das funções vitais. A importância da manutenção da osmolaridade exige a compreensão do conceito de osmose: a osmose é definida como o fluxo de água, entre dois compartimentos, através de uma membrana semipermeável; sendo este fluxo direcionado pelo gradiente de concentração de partículas diluídas em cada um dos compartimentos (Boron, Boulpaep, 2009).

O fenômeno da osmose foi primeiramente descrito pelo cientista francês René Henri Dutrochet no século XVIII. René observou que ao inserir em um recipiente com água, um tubo vedado com uma membrana semipermeável e contendo soluto, ocorria o movimento da água para dentro deste tubo e, que a quantidade de água deslocada era proporcional a concentração de soluto diluído (Mecawi et al., 2015). Além disso, o movimento de água era capaz de gerar, no lado da membrana em se encontrava o soluto, uma pressão hidráulica que era contrária ao fluxo de água; à pressão hidráulica desenvolvida no recipiente contendo soluto que contrapõe a osmose deu-se o nome de pressão osmótica (Mecawi et al., 2015).

A pressão osmótica é proporcional a concentração de soluto e depende somente do número de partículas diluídas e não da natureza do soluto sendo, portanto, uma propriedade coligativa. Deste modo, é necessário que um soluto não eletrolítico esteja em uma concentração duas vezes maior que um eletrólito monovalente para desenvolver a mesma pressão osmótica (Mecawi et al., 2015). Em laboratórios a pressão osmótica é medida em aparelhos denominados osmomômetros que empregam outras propriedades coligativas como a depressão do ponto de congelamento e a depressão da pressão de vapor da água, para estimar a quantidade de partículas osmoticamente ativas presentes em um determinado volume de soluto, ou seja, a osmolaridade dada em miliosmol por litro.

O íon sódio ( $\text{Na}^+$ ) é o principal soluto determinante da osmolaridade plasmática. Em seres formados por células delimitadas por membranas semipermeáveis e compostos por aproximadamente 70-75% de água, a diferença de concentração de sódio entre os meios intra e extracelular é a principal responsável pelo movimento de água entre estes dois compartimentos. Neste sentido, o aumento da concentração plasmática de  $\text{Na}^+$  causa a saída de água do meio intracelular para o meio extracelular e, o contrário ocorre quando a osmolaridade do plasma diminui, ocorrendo então a passagem de água para dentro da célula. Tanto o influxo quanto o efluxo de água são deletérios para o funcionamento celular; por essa razão a osmolaridade extracelular é constantemente regulada e mantida nos mesmos valores da osmolaridade intracelular; que nos mamíferos encontra-se entre 290 e 300 mOsm/L.

O aumento da osmolaridade plasmática é conhecido como hiperosmolaridade e é resultado do aumento do aporte de sódio ou, da diminuição do volume plasmático de água. As alterações da osmolaridade são detectadas em estruturas especializadas denominada osmorreceptores. Estas estruturas são capazes de transformar estímulos osmóticos em sinais elétricos que, por sua vez, são transmitidos a diversas regiões encefálicas, conforme discutido nos próximos tópicos.

## 1.2 Detecção da osmolaridade plasmática

Os osmorreceptores estão localizados tanto central quanto periféricamente, neste último caso encontram-se distribuídos ao longo dos órgãos do sistema gastrointestinal, mesentério, sistema porta hepático e rins (Bourque, 2008). Os osmorreceptores periféricos possuem uma importante função antecipatória sobre as alterações da osmolaridade plasmática, uma vez que são estimulados ainda durante a fase digestiva do

alimento, desencadeando respostas precoces às possíveis flutuações da osmolaridade plasmática (Baerstschi, Vallet, 1981. Choi-Kwon, Baerstschi, 1991; Carlson et al., 1997). Alterações da osmolaridade detectadas pelos osmorreceptores periféricos são conduzidas, via nervo vago, até o sistema nervoso central (SNC), mais especificamente para uma região bulbar conhecida como núcleo do trato solitário (NTS) (Mecawi et al., 2015).

Os osmorreceptores centrais localizam-se na lamina terminal e são denominados órgãos circumventriculares (CVOs) compreendendo o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e o órgão subfornicial (SFO) (Weindl, 1973; Kizer et al., 1976; Thrasher, 1985; Bourque, Oliet, 1997). A presença de uma barreira hematoencefalica fenestrada permite que estes órgãos estejam em contato direto com o plasma possibilitando a detecção da composição química do mesmo; além disso, os CVOs possuem a capacidade de transduzir as alterações na osmolaridade em sinais elétricos que são enviados a diversas regiões do sistema nervoso central (SNC) com os quais estas estruturas se comunicam.

A transdução do sinal osmótico é desencadeada por alterações do volume celular ocorridas em função das variações na osmolaridade que, por sua vez, levam a ativação de mecanorreceptores localizados na membrana celular. No caso da hiperosmolaridade plasmática, o efluxo de água nos neurônios dos CVOs causa a retração de volume dos mesmos ativando mecanorreceptores que aumentam a condutância para cátions, consequentemente despolarizando esses neurônios e aumentando suas frequências de disparos (Oliet, Bourque, 1993; Bourque, 2008). Esta resposta é mediada pelos canais catiônicos TRP (*transiente potencial receptor*), cuja ativação gera influxo principalmente do íon  $\text{Ca}^{2+}$  (cálcio) (Zhang, Bouque, 2006; Bansal, Fisher, 2017) e, mais especificamente, pelos TRPV1 já que a inativação seletiva desta isoforma bloqueia a sensibilidade osmótica do OVLT e seu *knockout* diminui a liberação de vasopressina (VP) em resposta ao aumento da osmolaridade (Ciura, Bourque, 2006; Sharif-Naeini, 2006; Ciura, Bourque, 2011).

Além das alterações na condutância de neurônios osmosensores causadas por mudanças em sua conformação física, a presença de canais sensíveis à  $\text{Na}^+$  ( $\text{Na}_x$ ) nestes neurônios parece lhes conferir uma especificidade no reconhecimento das alterações na osmolaridade causadas por flutuações na concentração deste íon. De fato, receptores  $\text{Na}_x$  já foram descritos nos neurônios dos CVOs, em neurônios ocitocinérgicos (OT), vasopressinérgicos (VP) e em células da glia de ratos (Nehmé et al., 2012).

Recentemente Kinsman et al. (2017) compararam as respostas provocadas pela injeção central de cloreto de sódio (NaCl) e outros solutos, como sorbitol e manitol, em

concentrações hiperosmolares. A solução hiperosmótica contendo  $\text{Na}^+$  provocou elevações na pressão arterial, atividade simpática e frequência de disparos de neurônios do OVLT de maior magnitude quando comparados a essas mesmas respostas observadas para os demais compostos testados em condições hiperosmolar.

Uma vez estimulados os CVOs enviam sinais elétricos as regiões do SNC com os quais mantêm conexões e que estão envolvidos na regulação do balanço hidroeletrólítico. No caso do aumento da concentração plasmática de sódio estes núcleos ativam mecanismos que possibilitam o reestabelecimento da osmolaridade a partir de dois principais efeitos: estimulando a sede e aumentando a reabsorção renal de água.

### 1.3 Regulação da osmolaridade plasmática

Sabe-se que a geração da sensação de sede e a busca por água são respostas fisiológicas complexas que envolvem a articulação de diversas regiões encefálicas envolvidas no controle autonômico e comportamental.

Os sinais primários para desencadeamento e supressão da sensação de sede foram identificados a partir de duas distintas populações neuronais presentes nos CVOs, mais especificamente no SFO. Utilizando-se técnicas de optogenética foi possível demonstrar que a foto-estimulação de neurônios excitatórios, CamKII/nNos, no SFO induziu a ingestão hídrica em camundongos; enquanto a ativação de neurônios inibitórios, que expressavam Vgat, inibiu a ingestão de água mesmo em animais em privação hídrica por 24 horas (Oka et al., 2015). Ainda, a presença de receptores para angiotensina do tipo 1 e receptores Nax no SFO indicam os possíveis mecanismos envolvidos na ativação destes neurônios responsáveis por regular a sensação de sede (Simpson et al., 1978; Hiyama, 2004; Coble et al., 2014).

O comportamento de busca e ingestão de água é coordenado por diversas regiões do SNC entre elas o hipocampo, o córtex insular e o córtex cingulado (Robinson, Mishkin, 1996; McKinley et al., 2006); essas regiões são responsáveis pela decifração de padrões perceptuais e pela geração de respostas comportamentais e emocionais. Além disso, diversas outras regiões encefálicas participam da geração e controle da sede como os núcleos da rafe, cuja inibição ou lesão causam o aumento da ingestão hídrica (Coscina et al., 1972; Barofsky et al., 1980; Klitenick, Wirtshafter, 1989) e o núcleo parabraquial lateral (LPBN), envolvido no controle da ingestão hídrica em modelos utilizando angiotensina II (ANG II) como estímulo (Menani, Johnson; 1995).



Já o estímulo para o incremento da reabsorção renal de água se dá por meio da ativação de dois núcleos hipotalâmicos: o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e o núcleo supraóptico (SON) (Miselis, 1981; Simerly et al., 1988). Estes núcleos possuem neurônios magnocelulares (NMC) que se projetam para a neurohipófise e são responsáveis pela produção e liberação de VP e OT (Pow, Morris, 1989; Langraf et al., 1990). A liberação de VP a partir dos NMC é extremamente sensível às alterações de osmolaridade; de fato, elevações tão sutis quanto 1% são suficientes para desencadear a liberação de VP (Ludwig et al., 1994; Ludwig, Leng, 2006).

A VP liberada sistemicamente age diretamente nos vasos sanguíneos e por meio de sua ligação a receptores do tipo V1 leva a vasoconstrição, aumentando, desta forma, a resistência periférica total e a pressão arterial. Já nos rins, a ligação da VP a receptores do tipo V2 localizados na membrana basolateral das células principais do túbulo distal ativa a proteína G, desencadeando uma cascata que inclui a ativação da adenilciclase, o aumento da concentração intracelular de AMPc e, como resultado final, a inserção de aquaporinas 2 na membrana apical destas células (Boron, Boulpaep, 2009). Na ausência de VP as células dos segmentos distais do néfron possuem aquaporinas integrais somente na sua membrana basolateral (aquaporinas 3 e 4); a inserção de aquaporinas 2 na membrana apical destas células cria canais de água nos dois lados da célula, permitindo que a água seja reabsorvida e atravesse a célula (Nielsen et al., 1999). O aumento de reabsorção de água no néfron, estimulada pela ação da VP, permite o reestabelecimento da osmolaridade plasmática, uma vez que aumenta o aporte de solvente disponível para diluir o soluto mais concentrado em situações de hiperosmolaridade.

Ainda a VP é ainda capaz de aumentar a reabsorção de água por meio da ampliação do gradiente osmótico através dos compartimentos renais, neste sentido, este hormônio age estimulando a reabsorção de cloreto de sódio (NaCl) na alça ascendente de Henle e na porção cortical do túbulo coletor, além de promover uma maior permeabilidade à ureia na porção medular do túbulo coletor; estes efeitos garantem a geração de um gradiente osmótico que favorece ainda mais a reabsorção da água (Boron, Boulpaep, 2009). Por último, devido aos seus efeitos vasculares desencadeados após a ligação a receptores V1, a VP é responsável por causar vasoconstrição das artérias renais, o que teria como objetivo final reduzir o fluxo sanguíneo renal e, conseqüentemente a perda de água (Moss et al., 2014).

Além das respostas descritas acima, o aumento da osmolaridade desencadeia alterações relacionadas ao controle autonômico que serão melhor discutidos na seção seguinte.

#### 1.4 Hipertensão arterial, hiperosmolaridade e hiperatividade simpática

Os padrões de vida atuais têm expostos os seres humanos a constantes desafios da osmolaridade plasmática em decorrência do consumo cada vez mais frequente de dietas com elevado teor de sódio e, ao mesmo tempo em que o consumo de sódio cresce, aumenta também a prevalência de doenças cardiovasculares ditas sal-sensíveis, como a hipertensão arterial sistêmica (HAS) (Campese et al., 1982; Carlson et al., 2001; He et al., 2008; Appel, 2011).

A HAS é uma patologia multifatorial associada a disfunções renais, vasculares e centrais (Arquivos Brasileiros de Cardiologia, 2017). No mais recente Guia publicado em conjunto pela American Heart Association e pela American College of Cardiology (Whelton et al., 2017) foram propostos novos valores pressóricos para a classificação do estágio 1 da HAS que agora passam a ser de 130–139 mm Hg e 80–89 mmHg para pressão sistólica e diastólica, respectivamente. Esta alteração se deve a observações epidemiológicas sistemáticas que demonstraram a presença de um alto risco para comprometimento do sistema cardiovascular em faixas pressóricas mais baixas do que as usadas anteriormente para designar a HAS:  $\geq 140$  e 90 mmHg para sistólica e diastólica, respectivamente (Whelton et al., 2017).

Segundo os novos parâmetros utilizados para classificar a HAS a prevalência desta doença entre a população norte americana é de 43% (Whelton et al., 2017), já dados do Portal Brasil (2011) relatam que a hipertensão arterial atinge, em média, 25% da população brasileira, chegando a mais de 50% na terceira idade; além disso, um dado alarmante é que os números da patologia vêm crescendo entre os mais jovens e já atinge 5% das crianças brasileiras.

A ingestão de sódio está ligada a elevação dos níveis pressóricos observados na HAS. Em um estudo realizado no Reino Unido envolvendo crianças e adolescentes de 4 a 18 anos ficou demonstrado que um aumento de 1 g/dia no consumo de sal está relacionado a uma elevação de 0,4 mmHg na pressão arterial sistólica e 0,6 mmHg na pressão diastólica (He et al., 2008). Appel et al. (2011) apontam, a partir da meta-análise de testes populacionais, que uma redução no sódio urinário de  $\approx 1800$  mg/dL é capaz de

diminuir os valores de pressão arterial sistólica e diastólica em 2,0 e 1,0 mmHg, respectivamente, em indivíduos não hipertensos e, 5,0 e 2,7 mmHg em indivíduos hipertensos. Já entre crianças, a diminuição da ingestão de sódio reduziu a PA sistólica/diastólica em 1,2/3 mmHg, respectivamente.

Além disso alguns indivíduos são mais suscetíveis às alterações da pressão arterial quando expostos ao sódio sendo considerados sensíveis ao sal (Felder et al., 2013). Apesar de apresentar outras definições, com diferentes pontos de corte para os valores pressóricos, uma classificação bastante aceita para a sensibilidade ao sódio é que se trata da elevação da pressão arterial > 10 mmHg, secundária ao aumento no consumo de sódio (200 a 250 mEq Na<sup>+</sup>/dia, durante 7 dias) (Carlson et al., 2001, Felder et al., 2013).

Entre os diversos mecanismos possivelmente envolvidos na sensibilidade ao sódio o sistema nervoso autônomo (SNA) parece desempenhar um papel importante. Estudos realizados com seres humanos demonstraram que o aumento do consumo diário de sódio na dieta ( $\cong$  200 mEq) gera uma elevação e uma diminuição dos níveis plasmáticos de norepinefrina em indivíduos sensíveis e resistentes ao sal, respectivamente (Fujita et al., 1980; Campese et al., 1982). Além disso, foi observado um maior risco para desenvolvimento de patologias que acometem o sistema cardiovascular em indivíduos sal sensíveis, mesmo quando não previamente hipertensos (Weinberger et al., 1996; Weinberger et al., 2001).

A associação entre a hiperosmolaridade e a elevação dos níveis pressóricos têm sido amplamente investigada e discutida por vários autores. Em 1984 Bunag, Miyajima demonstraram que a resposta pressora desencadeada por estímulo hiperosmótico é resultado da sinergia entre os efeitos da liberação periférica de vasopressina e o aumento da atividade do sistema nervoso simpático (SNS). Posteriormente, o aumento da atividade do nervo simpático lombar (ANSL) em resposta a hiperosmolaridade foi observado em uma grande quantidade de estudos utilizando-se diferentes tipos de abordagens experimentais (Garcia-Estan et al., 1980; Brooks et al., 2005; Scrogin et al., 1999; Antunes et al., 2006; Ribeiro et al., 2015; Santos Moreira, 2017).

Os mecanismos pelos quais a hiperosmolaridade é capaz de influenciar o padrão de atividade dos nervos simpáticos e elevar a pressão arterial ainda não são totalmente conhecidos; porém alterações morfofuncionais dos núcleos envolvidos com o controle autonômico parecem desempenhar um importante papel no desenvolvimento desta condição. Para Brooks (2005), pesquisas devem ser conduzidas no sentido de elucidar

como a hiperosmolaridade poderia desencadear a ativação crônica de componentes simpatoexcitatórios culminando em doenças sal-sensíveis, como a HAS.

Simmonds et al. (2014) demonstraram que ratos alimentados com uma dieta composta por NaCl 4% durante 14 dias não apresentaram aumento significativo dos valores pressóricos, no entanto, observou-se uma maior variabilidade da pressão arterial destes animais e uma respostas pressora e simpática de maior magnitude após a administração intracerebroventricular (icv) de salina hipertônica ou estimulação do nervo ciático, comparada aos animais que receberam uma dieta com baixo teor de sódio; sugerindo assim que a exposição crônica ao sódio é capaz de modular as respostas reflexas mediadas pelo SNC.

O PVN é um núcleo chave na regulação da pressão arterial frente a desafios osmóticos dado sua participação na geração de respostas tanto neuroendócrinas como autonômicas; isto se deve ao fato de ser um núcleo formado por NMC que, como citado anteriormente, produzem e liberam VP e, por neurônios parvocelulares (NPC) que se projetam para centros reguladores da atividade autonômica, tais como a coluna intermediolateral (CIML) e o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) (Cechetto, Saper, 1998; Stocker et al., 2004a). De fato, a inibição do PVN previne a simpatoexcitação induzida por estímulo hiperosmótico ou secundária a desidratação (Scrogin et al., 1999; Stocker et al., 2004a; Stocker et al., 2004b; Antunes et al., 2006).

A ativação dos NPC já foi descrita em resposta tanto a hiperosmolaridade plasmática (Bains, Ferguson, 1995) quanto a estimulação dos CVOs, os quais atuam na regulação da atividade dos neurônios do PVN através de eferências angiotensinérgicas e glutamatérgicas (Bains et al, 1992; Chen, Toney, 2001; Llewellyn et al., 2012). Além disso, durante elevações da osmolaridade plasmática, uma série de neuromoduladores podem interagir ao nível do PVN influenciando a atividade simpática; incluindo, entre eles o ATP e a própria VP.

A inibição dos receptores purinérgicos P2 reduz a simpatoexcitação lombar e a potencialização das correntes excitatórias glutamatérgicas, provocadas pela hiperosmolaridade, nos NPC com projeções para o RVLM (Ferreira-Neto et al., 2015; Ferreira-Neto et al., 2017). Já a VP, cuja liberação em resposta ao aumento da osmolaridade plasmática também se dá no próprio PVN (Ludwig et al, 1994; Ludwig & Leng, 2006), é capaz de ativar os NPC contribuindo para o desenvolvimento da resposta simpatoexcitatória observada tanto em modelos de desafio hiperosmótico agudo quanto crônico (Son et al. 2013; Ribeiro et al., 2015).

A função neuromoduladora da VP já havia sido descrito em diversos grupamentos neuronais tais como os motoneurônios da medula espinhal e os próprios NMC (Toshihiko et al., 1981; Ma, Dun; 1985 Gouzenes et al., 1998; Ragenbass, 2008) e, recentemente ficou demonstrado que efeito pressor provocado pela injeção de apelina no RVLM depende da ativação de receptores vasopressinérgicos V1a (Griffiths et al., 2017); estes resultados poderiam ser justificados por estudos anteriores, realizados in vitro, que indicam um papel excitatório da VP sobre os neurônios do RVLM (Yang et al., 2001).

A modulação da atividade dos neurônios do RVLM é um tema bastante interessante devido à crescente importância atribuída a um grupamento neuronal presente nesta região denominado C1, estes neurônios exercem um papel fundamental na regulação de uma série de variáveis fisiológicas, entre elas a pressão arterial, principalmente em situações de desafios da homeostase, sendo inclusive referidos como na literatura como “*body's emergency medical technicians*” (Guyenet et al, 2013). As características destes neurônios e sua função sobre a regulação da pressão arterial serão discutidos na próxima seção.

### 1.5 Papel do grupamento C1 no controle cardiovascular

Datam do início dos anos 70 os primeiros relatos de Guertzenstein que apontaram a presença de uma região na superfície ventral do bulbo (VLM) envolvida na regulação da pressão arterial. A VLM descreve o quadrante ventrolateral da formação reticular bulbar e está anatomicamente dividida em 3 regiões: bulbo ventrolateral rostral (RVLM), bulbo ventrolateral intermediário (IVLM) e bulbo ventrolateral caudal (CVLM) (Guyenet et al., 2013).

Inicialmente, experimentos realizados principalmente na divisão rostral desta região, demonstraram que a inibição bilateral realizada com o aminoácido inibitório glicina era capaz de causar queda da pressão arterial; além disso, a observação de que o contrário também é verdadeiro, ou seja, a injeção de aminoácidos excitatórios nesta região era capaz de elevar os valores pressóricos, fez com que a mesma fosse definida como “*área pressora*” central (Guertzenstein 1974; Willette et al., 1983).

Estudos posteriores, anatômicos ou utilizando estimulação antidrômica, demonstraram a presença de projeções dos neurônios do RVLM para os neurônios pré-ganglionares simpáticos localizados na CIML (Amendt et al., 1979; Barman, Gebber,

1985), permitindo uma maior compreensão dos mecanismos pelos quais a região do RVLM estaria envolvida na regulação a pressão arterial.

Os neurônios do RVLM são classicamente associados ao controle barorreflexo e a manutenção dos tónus vasomotores periféricos (Dampney, 1994). A constatação de que estes neurônios apresentam atividade tônica, com constantes disparos de potenciais de ação sincronizados com os disparos de nervos simpáticos (Barman, Gebber, 1985; Guyenet, Haselton, 1989; Moraes et al., 2013), levou a proposta de uma atividade “marca-passo” dos mesmos (Sun et al., 1988); esta teoria, no entanto, continua a ser debatida graças a trabalhos que sustentam que a atividade constante dos neurônios do RVLM seria resultado da ação tônica de *inputs* excitatórios procedentes de outras regiões centrais e não especificamente de propriedades intrínsecas neuronais (Lipski, et al., 1996; Lipski et al., 1998).

Nas regiões do RVLM e IVLM encontra-se localizado um grupamento específico de neurônios adrenérgicos conhecido como C1 (Milner et al., 1987; Guyenet et al., 2013). No RVLM, os neurônios C1 se encontram dispostos desde a porção caudal do núcleo motor facial (-11,4 mm- bregma) até o final do núcleo ambíguos (12,6 mm- bregma), já no IVLM estes neurônios se encontram entre o final do núcleo ambíguos (-12,6 mm-bregma) e o ponto médio da área postrema (3,8 mm-bregma) (Guyenet et al., 2013).

Os neurônios do grupamento C1 são caracterizados por apresentam a enzima Phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT), capaz de sintetizar adrenalina a partir da noradrenalina (Ruggiero et al., 1985; Bernstein, Bohn, 1989). A presença de PNMT é observada em outros grupamentos neuronais, como o C2 e o C3; no entanto, o C1 é o maior deles contendo 70% dos neurônios adrenérgicos do SNC (Guyenet et al., 2013).

Além dos neurônios do grupamento C1, a região do RVLM possui neurônios denominados não-C1 (Lipski et al., 1996; Schreihöfer, Guyenet, 1997). O aprimoramento das técnicas experimentais fez com que fosse possível investigar separadamente a participação dos neurônios C1 e não-C1 sobre o controle da pressão arterial; entre estas técnicas pode-se citar o emprego de vetores virais e o uso da toxina anti-DβH-saporina.

A toxina anti-DβH-saporina liga-se a enzima dopamina-β-hidroxilase, que converte dopamina em noradrenalina, quando a mesma é exteriorizada na membrana dos neurônios catecolaminérgicos durante a exocitose e, uma vez internalizada, transporta a toxina até o corpo celular levando a morte neuronal por inibição da síntese proteica (Picklo et al., 1994; Guyenet, 2013). Neurônios resistentes à ação da anti-DβH-saporina são considerados não-noradrenérgicos e não-adrenérgicos; de fato, a injeção de anti-DβH-

saporina nos segmentos torácicos da medula espinal, por exemplo, não afeta neurônios não-C1 enquanto causa a depleção de neurônios C1 na região do RVLM (Schreihofner et al., 2000; Schreihofner, Guyenet, 2000).

O estudo direcionado das funções dos neurônios do grupamento C1 demonstrou que esses neurônios são barossensíveis (Schreihofner, Guyenet, 1997) e que, ao contrário do que se suspeitava, não desempenham um papel determinante sobre o controle tônico da pressão arterial; uma vez que a depleção dos mesmos não altera os valores pressóricos de ratos em condições basais (Schreihofner et al., 2000; Schreihofner, Guyenet, 2000). Por outro lado, a lesão dos neurônios C1 gera um prejuízo na resposta simpatoexcitatória e pressora provocada pela estimulação local do RVLM e, na resposta barorreflexa observada após a infusão iv de hidralazina ou nitroprussiato (Schreihofner et al., 2000; Schreihofner, Guyenet, 2000; Madden et al., 2006); sugerindo a participação dos neurônios do C1 no controle da atividade simpática e pressão arterial durante algumas condições específicas.

Uma série de estudos conduzidos nos últimos anos demonstrou a ativação dos neurônios do grupamento C1 em resposta a situações de desafios orgânicos tais como hipoxia, dor, inflamação, hipotensão e hipoglicemia, o que fez com que alguns autores se referissem a esses neurônios como "técnicas medicas emergenciais" do corpo (Silva et al., 2016; Li et al., 2015; Madden, 2006; Schiltz, Sawchenko, 2007; Guyenet et al., 2013).

Embora estudos recentes indiquem que os neurônios do C1 possam não estar envolvidos no controle da pressão arterial em condições basais, as alterações morfofuncionais no RVLM vêm sendo relacionadas a gênese de disfunções do sistema cardiovascular, entre elas a hipertensão neurogênica, que será melhor discutido no próximo tópico.

## 1.6 RVLM e hipertensão neurogênica

A hipertensão neurogênica pode ser definida como a elevação dos valores de pressão arterial desencadeada por um componente neuronal, sendo o aumento da atividade do SNS um fator determinante para o desenvolvimento desta condição (Esler 2000; Fisher, Paton, 2012). Estudos incluindo diferentes abordagens experimentais vêm sendo realizados com o intuito de investigar a participação dos neurônios do RVLM no desenvolvimento da hipertensão arterial neurogênica, tendo em vista a participação dos neurônios desta região na regulação da atividade simpática.

Em 1994 Varner et al. demonstraram que a destruição bilateral do RVLM, causada pela injeção de altas concentrações de *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA), foi capaz de prevenir a elevação dos valores pressóricos provocada pela transecção dos nervos depressores aórticos. Posteriormente, utilizando o mesmo modelo, Han et al. (1998) demonstraram que o desenvolvimento da hipertensão arterial foi acompanhado por um aumento da frequência de disparos espontâneos dos neurônios RVLM.

Os SHR apresentam, entre outras características, uma hiperativação simpática relacionada ao desenvolvimento espontâneo da hipertensão arterial nesta linhagem (Coote, Sato, 1977; Simms et al., 2009). É interessante notar que foi relatada uma maior atividade da enzima PNMT nas regiões A1 e A2 de SHR em condições basais (Saavedra et al., 1978) e que, a destruição dos neurônios catecolaminérgicos causada pela injeção icv de 6-hydroxydopamine previne a elevação da pressão arterial nesta linhagem (Oparil et al., 1996).

Estudos comparativos utilizando SHR demonstraram uma maior frequência de disparos em neurônios do RVLM dos animais desta linhagem (espontaneamente hipertensos), comparados a linhagem normotensa Wistar- Kyoto (Chan et al, 1991). Além disso, recentemente Moraes et al. (2014) comprovaram, através de registros em *whole cell patch-clamp*, que SHR no estágio pré-hipertensivo apresentaram maior resistência vascular, atividade simpática e frequência de disparos de neurônios C1 e não- C1 no RVLM, comparados aos Wistar-Kyoto e, que esta diferença não estaria relacionada a propriedades intrínsecas neuronais e sim a alterações na transmissão sináptica nesta região.

O aumento da pressão arterial secundária a exposição ao sódio também parece estar relacionada ao desenvolvimento de alterações funcionais no RVLM, principalmente referentes a neurotransmissão excitatória. De fato, o antagonismo dos receptores ionotrópicos de glutamato, por meio da injeção de ácido quinurênico no RVLM, não altera os valores pressóricos em animais normohidratados enquanto causa uma queda significativa da pressão arterial em ratos privados de água por 48 horas (Brooks et al., 2004). Além disso, resultados semelhantes foram observados para ratos Dahl sensíveis ao sal, nos quais a injeção de ácido quinquênio no RVLM gerou uma queda da pressão arterial não observada nos animais controle, resistentes ao sal (Ito et al., 2001).



## **9 Conclusões**

A observação de nossos resultados nos permite apontar duas principais conclusões: 1) Os neurônios do grupamento neuronal C1 estão diretamente envolvidos no desenvolvimento da hipertensão arterial secundária a sobrecarga de sódio e; 2) O desafio hiperosmótico através da ingestão de solução NaC 2% promove uma elevação da pressão arterial de maior magnitude em ratos SHR que está relacionada, pelo menos em parte, à ação periférica da vasopressina.

## REFERÊNCIAS

- Aldred KL, Harris PJ & Eitle E (2000). Increased proximal tubular NHE-3 and H<sup>+</sup>-ATPase activities in spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens* 18, 623–628.
- Amendt K, Czachurski J, Dembowski K, Seller H. Bulbosplinal projections to the intermediolateral cell column: a neuroanatomical study. *J Auton Nerv Syst* 1: 103–107, 1979.
- Antunes VR, Yao ST, Pickering AE, Murphy D & Paton JFR. A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation. *J Physiol* 576.2: 569-583, 2006.
- Appel LJ, Frohlich ED, Hall JE, Pearson TA, Sacco RL, Seals DR, Sacks FM, Smith SC Jr, Vafiadis DK, Van Horn LV. The importance of population-wide sodium reduction as a means to prevent cardiovascular disease and stroke. *American Heart Association. Circulation*. 2011 Mar 15;123(10):1138-43. doi: 10.1161/CIR.0b013e31820d0793. Epub 2011 Jan 13.
- Arquivos Brasileiros de Cardiologia, Vol 208, número 02, 2017.
- Baertschi AJ, Vallet PG. Osmosensitivity of the hepatic portal vein area and vasopressin release in rats. *J Physiol*. 1981 Jun;315:217-30.
- Bains JS, Ferguson AV. Paraventricular nucleus neurons projecting to the spinal cord receive excitatory input from the subfornical organ. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 268: R625–R633, 1995
- Bains JS, Potyok A, Ferguson AV. Angiotensin II actions in paraventricular nucleus: functional evidence for neurotransmitter role in efferents originating in subfornical organ. *Brain Research*. Volume 599, Issue 2, 25 December 1992, Pages 223-229.
- Bansal V, Fisher TE. Osmotic activation of a Ca<sup>2+</sup>-dependent phospholipase C pathway that regulates  $\Delta$ N TRPV1-mediated currents in rat supraoptic neurons. *Physiol Rep*. 2017 Apr; 5(8). pii: e13259. doi: 10.14814/phy2.13259.
- Barman, SM, Gebber, GL. Axonal projection patterns of ventrolateral medullo spinal sympathoexcitatory neurons. *J Neurophysiol*. 1985. 53, 1551–1566.
- Barofsky AL, Grier HC, Pradhan TK: Evidence for regulation of water intake by median raphe serotonergic neurons. *Physiol Behav* 24:951- 955, 1980.
- Bergstrom G, Johansson I, Wickman A, Gan L, Thorup C: Brief losartan treatment in young spontaneously hypertensive rats abates long-term blood pressure elevation by effects on renal vascular structure. *J Hypertens* 2002; 20: 1413–1421.
- Bernstein-Goral H, Bohn MC. Phenylethanolamine N-methyltransferase-immunoreactive terminals synapse on adrenal preganglionic neurons in the rat spinal cord. *Neuroscience*. 1989;32(2):521-37.
- Blaustein MP, Leenen FH, Chen L, Golovina VA, Hamlyn JM, Pallone TL, Van Huysse JW, Zhang J, Wier WG. How NaCl raises blood pressure: a new paradigm for the pathogenesis of salt-dependent hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2012 Mar 1;302(5):H1031-49. doi: 10.1152/ajpheart.00899.2011. Epub 2011 Nov 4.

- Boron WF, Boulpaep EL. Medical physiology: a cellular and molecular approach.
- Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 9: 519-531, 2008.
- Bourque CW, Oliet SHR. Osmoreceptors in the central nervous system. *Annu Rev Physiol* 59:601–19, 1997.
- Brooks VL, Haywood JR, Johnson AK. Translation of salt retention to central activation of the sympathetic nervous system in hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005 May-Jun;32(5-6):426-32
- Brooks VL, Freeman KL, Clow KA. Excitatory amino acids in rostral ventrolateral medulla support blood pressure during water deprivation in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004 May;286(5):H1642-8. Epub 2004 Jan 8.
- Bunag RD & Miyajima E. Sympathetic hyperactivity elevates blood pressure during acute cerebroventricular infusions of hypertonic salt in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 6: 844-851, 1984.
- Burrell LM, Phillips PA, Risvanis J, Aldred KL, Hutchins AM, Johnston CI: Attenuation of genetic hypertension after short-term vasopressin V1A receptor antagonism. *Hypertension* 1995; 26: 828–834.
- Campese VM, Romoff MS, Levitan D, Saglikes Y, Friedler RM, Massry SG. Abnormal relationship between sodium intake and sympathetic nervous system activity in salt-sensitive patients with essential hypertension. *Kidney Int*. 1982 Feb;21(2):371-8.
- Cannon WB. *The Wisdom of the Body*. 1932. W.W. Norton & Company, Inc., New York.
- Carlson SH, Roysomutti S, Peng N, Wyss JM. The role of the central nervous system in NaCl-sensitive hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Am J Hypertens*. 2001 Jun;14(6 Pt 2):155S-162S.
- Carlson, S. H., Beitz, A. & Osborn, J. W. Intra-gastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *Am. J. Physiol.* 272, R750–758 (1997).
- Carter DA, Murphy D. Rapid changes in poly (A) tail length of vasopressin and oxytocin mRNAs form a common early component of neurohypophyseal peptide gene activation following physiological stimulation. *Neuroendocrinology*. 1991 Jan;53(1):1-6.
- Cechetto F & Saper CB. Neurochemical organization of the hypothalamic projection to the Spinal Cord in the rat. *J Comp Neurol* 272: 579-604, 1998.
- Chaar et al., 2015b Early training-induced reduction of angiotensinogen in autonomic areas – the main effect of exercise on brain renin-angiotensin system in hypertensive rats. *Plos One* September 2015.
- Chan RK, Chan YS, Wong TM. Electrophysiological properties of neurons in the rostral ventrolateral medulla of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Brain Res*. 1991 May 17;549(1):118-26.
- Chen QH, Toney GM. AT (1)-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2001 Dec;281(6):R1844-53.

Choi-Kwon, S. & Baertschi, A. J. Splanchnic osmosensation and vasopressin: mechanisms and neural pathways. *Am. J. Physiol.* 261, E18–E25 (1991).

Ciura S, Bourque CW. Transient receptor potential vanilloid 1 is required for intrinsic osmoreception in organum vasculosum lamina terminalis neurons and for normal thirst responses to systemic hyperosmolality. *J Neurosci* 26: 9069-9075, 2006.

Ciura S, Liedtke W, Bourque CW. Hypertonicity sensing in organum vasculosum lamina terminalis neurons: Amechanical process involving TRPV1 but not TRPV4. *J Neurosci* 31: 14669-14676, 2011.

Coble JP, Johnson RF, Cassell MD, Johnson AK, Grobe JL, Sigmund CD. Activity of protein kinase C- $\alpha$  within the subfornical organ is necessary for fluid intake in response to brain angiotensin. *Hypertension*. 2014 Jul;64(1):141-8. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03461. Epub 2014 Apr 28.

Colombari DS, Pedrino GR, Freiria-Oliveira AH, Korim WS, Maurino IC, Cravo SL. Lesions of medullary catecholaminergic neurons increase salt intake in rats. *Brain Res Bull.* 2008 Aug 15;76(6):572-8. doi: 10.1016/j.brainresbull.2008.04.001. Epub 2008 May 7.

Collis MG, DeMey C, Vanhoutte PM. Renal vascular reactivity in the young spontaneously hypertensive rat. *Hypertension*. 1980 Jan-Feb;2(1):45-52.

Coote JH, Sato Y. Reflex regulation of sympathetic activity in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 1977 Jun; 40(6):571-7.

Coscina DV, Grant LD, Balagura S, et al: Hyperdipsia after serotonin depleting midbrain lesions. *Nat New Biol* 235:63-64, 1972.

Cunningham ET, Sawchenko PE. Anatomical Specificity of Noradrenergic Inputs to the Paraventricular and Supraoptic Nuclei of the Rat Hypothalamus. *The journal of comparative neurology* 274:60-76 (1988).

Dampney, RA. Functional organization of central pathways regulating the cardiovascular system. *Physiol.Rev.* 1994. 74,323–364.

Day TA and Renaud LP. Electrophysiological evidence that noradrenergic afferents selectively facilitate the activity of supraoptic vasopressin neurons. *Brain Res* 303: 233–240, 1984.

Dilley JR, Arendshorst WJ. Enhanced tubuloglomerular feedback activity in rats developing spontaneous hypertension. *Am J Physiol.* 1984 Oct;247(4 Pt 2):F672-9.

Egan G, Silk T, Zamarripa F, Williams J, Federico P, Cunnington R, Carabott L, Blair-West J, Shade R, McKinley M, Farrell M, Lancaster J, Jackson G, Fox P, Denton D. Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Dec 9;100(25):15241-6. Epub 2003 Dec 1.

Esler, M. The sympathetic system and hypertension. *Am J Hypertens.* 2000.13, 99S–105S.

Felder RA, MJ, Williams SM, and Jose PA. Diagnostic tools for hypertension and salt sensitivity testing. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2013 January; 22(1): 65–76. doi:10.1097/MNH.0b013e32835b3693.

Ferreira-Neto HC, Antunes VR, Stern JE. ATP stimulates rat hypothalamic sympathetic neurons by enhancing AMPA receptor-mediated currents. *J Neurophysiol.* 2015 Jul;114(1):159-69. doi: 10.1152/jn.01011.2014. Epub 2015 Apr 22.

Ferreira-Neto HC, Ribeiro IM, Moreira TS, Yao ST, Antunes VR. Purinergic P2 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus are involved in hyperosmotic-induced sympathoexcitation. *Neuroscience.* 2017 May 4;349:253-263. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.02.054. Epub 2017 Mar 6.

Fisher JP & Paton JF (2012). The sympathetic nervous system and blood pressure in humans: implications for hypertension. *J Hum Hypertens* 26, 463–475.

Flynn FW, Culver B, Newton SV. Salt intake by normotensive and spontaneously hypertensive rats: two-bottle and lick rate analyses. *Physiol Behav.* 2003 Apr;78(4-5):689-96.

Fregly MJ. NaCl intake and preference threshold of spontaneously hypertensive rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1975 Sep;149(4):915-20.

Fujita T, Henry WL, Bartter FC, Lake CR, Delea CS. Factors influencing blood pressure in salt-sensitive patients with hypertension. *Am J Med.* 1980 Sep;69(3):334-44.

Garcia-Estan J, Carbonell LF, Garcia-Salom M, Salazar FJ, Quesada T. Hemodynamic effects of hypertonic saline in the conscious rat. *Life Sci.* 1989;44:1343-1350.

Geraldes V, Goncalves-Rosa N, Liu B, Paton JFR, Rocha I. Essential role of RVL medullary neuronal activity in the long term maintenance of hypertension in conscious SHR. *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical* 186 (2014) 22–31

Gomart S, Damoiseaux C, Jespers P, Makanga M, Labranche N, Pochet S, Michaux C, Berkenboom G, Naeije R, McEntee K, Dewachter L. Pulmonary vasoreactivity in spontaneously hypertensive rats--effects of endothelin-1 and leptin. *Respir Res.* 2014 Feb 5;15:12. doi: 10.1186/1465-9921-15-12.

Gomes PM, Sá RWM, Aguiar GL, Paes MHS, Alzamora AC, Lima WG, de Oliveira LB, Stocker SD, Antunes VR, Cardoso LM. Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats. *Sci Rep.* 2017 Jul 18;7(1):5655. doi: 10.1038/s41598-017-05984-9.

Gouzènes L, Desarménien MG, Hussy N, Richard P, Moos FC. Vasopressin regularizes the phasic firing pattern of rat hypothalamic magnocellular vasopressin neurons. *J Neurosci.* 1998 Mar; 1; 18(5):1879-85.

Griffiths PR, Lolait SJ, Harris LE, Paton JFR, O'Carroll AM. Vasopressin V1a receptors mediate the hypertensive effects of [Pyr<sup>1</sup>]apelin-13 in the rat rostral ventrolateral medulla. *J Physiol.* 2017 Jun 1;595(11):3303-3318. doi: 10.1113/JP274178. Epub 2017 Apr 21.

Guertzenstein PG, Silver A. (1974). Fall in blood pressure produced from discrete regions of the ventral surface of the medulla by glycine and lesions. *J. Physiol.* 242,489–503. doi:10.1113/jphysiol.1974.sp010719.

Guyenet PG, Haselton JR, Sun MK. Sympathoexcitatory neurons of the rostroventrolateral medulla and the origin of the sympathetic vasomotor tone. *Prog Brain Res.* 1989;81:105-16.

Guyenet PG. The sympathetic control of blood pressure. *Nat Rev Neurosci* 7: 335–346, 2006.

Guyenet PG, Schreihof AM, Stornetta RL. Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by the rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rats. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 940:259-69.

Guyenet PG, Stornetta RL, Bochorishvili G, Depuy SD, Burke PG, Abbott SB. C1 neurons: the body's EMTs. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013 Aug 1;305(3):R187-204. doi: 10.1152/ajpregu.00054.2013. Epub 2013 May 22.

Harrap SB, Van der Merwe WM, Griffin SA, Macpherson F, Lever AF: Brief angiotensin converting enzyme inhibitor treatment in young spontaneously hypertensive rats reduces blood pressure long-term. *Hypertension* 1990; 16: 603–614.

Han YM, Chan YS, Lo KS, Wong TM. Spontaneous activity and barosensitivity of the barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of hypertensive rats induced by transection of aortic depressor nerves. *Brain Res.* 1998 Dec 7;813(2):262-7. Hansen FH, Vågnes ØB, Iversen BM. Enhanced response to AVP in the interlobular artery from the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2005 May;288(5):F1023-31. Epub 2004 Dec 14.

He FJ, Marrero NM, Macgregor GA: Salt and blood pressure in children and adolescents. *J Hum Hypertens* 22: 4-11, 2008.

Hiyama TY, Watanabe E, Okado H, Noda M. The subfornical organ is the primary locus of sodium-level sensing by Na(x) sodium channels for the control of salt-intake behavior. *J Neurosci* 24: 9276-9281.

Hutchinson JS, Mendelsohn FA, Doyle AE. Blood pressure responses of conscious normotensive and spontaneously hypertensive rats to intracerebroventricular and peripheral administration of captopril. *Hypertension.* 1980 Jul-Aug;2(4):546-50.

Ip WK, Medzhitov R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. *Nat Commun.* 2015;6:6931. doi: 10.1038/ncomms793

Ito S, Komatsu K, Tsukamoto K, Sved AF. Tonic excitatory input to the rostral ventrolateral medulla in Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension.* 2001 Feb;37(2 Pt 2):687-91.

Judy WV, Watanabe AM, Henry DP, Besch HR Jr, Murphy WR, Hockel GM. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 1976 Jun;38(6 Suppl 2):21-9.

Kato K, Shirasaka T, Kunitake T, Hanamori T, Kannan H. Participation of arterial baroreceptors input and peripheral vasopressin in the suppression of renal sympathetic nerve activity induced by central salt loading in conscious rats. *J Auton Nerv Syst.* 1999 May 28;76(2-3):83-92.

Kanbar R, Depuy SD, West GH, Stornetta RL, Guyenet PG. Regulation of visceral sympathetic tone by A5 noradrenergic neurons in rodents. *J Physiol* 589.4 (2011) pp 903–917

Kim JS, Kim WB, Kim YB, Lee Y, Kim YS, Shen FY, Lee SW, Park D, Choi HJ, Hur J, Park JJ, Han HC, Colwell CS, Cho YW, Kim YI. Chronic hyperosmotic stress converts GABAergic inhibition into excitation in vasopressin and oxytocin neurons in the rat. *J Neurosci.* 2011 Sep 14;31(37):13312-22. doi: 10.1523/JNeurosci.1440-11.2011.

King TL, Ruyle BC, Kline DD, Heesch CM, Hasser EM. Catecholaminergic neurons projecting to the paraventricular nucleus of the hypothalamus are essential for cardiorespiratory adjustments to hypoxia. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* Published 1 October 2015 Vol. 309 no. 7, R721-R731 DOI:10.1152/ajpregu.00540.2014

Kizer JS, Palkovits M, Brownstein MJ. Releasing factors in the circumventricular organs in the rat brain. *Endocrinol* 98(2):311-7, 1976.

Kinsman BJ, Browning KN, Stocker SD. NaCl and osmolarity produce different responses in organum vasculosum of the lamina terminalis neurons, sympathetic nerve activity and blood pressure. *J Physiol*. 2017 Sep 15;595(18):6187-6201. doi: 10.1113/JP274537. Epub 2017 Aug 2.

Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakan H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA. Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature*. 2013;496:518–522. doi: 10.1038/nature11868.

Klitenick MA, Wirtshafter D. Elicitation of feeding drinking and gnawing following microinjections of muscimol into the median raphe nucleus of rats. *Behav Neural Biol* 51:436-441, 1989.

Kondo N, Arima H, Banno R, Kuwahara S, Sato I, Oiso Y. Osmoregulation of vasopressin release and gene transcription under acute and chronic hypovolemia in rats. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2004 Mar;286(3):E337-46. Epub 2003 Nov 12.

Konopacka A, Qiu J, Yao ST, Greenwood MP, Greenwood M, Lancaster T, Inoue W, Mecawi AS, Vechiato FM, de Lima JB, Coletti R, Hoe SZ, Martin A, Lee J, Joseph M, Hindmarch C, Paton J, Antunes-Rodrigues J, Bains J, Murphy D. Osmoregulation requires brain expression of the renal Na-K-2Cl cotransporter NKCC2. *J Neurosci*. 2015 Apr 1;35(13):5144-55. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4121-14.2015.

Lais LT, Brody MJ. Vasoconstrictor hyperresponsiveness: an early pathogenic mechanism in the spontaneously hypertensive rat. *Eur J Pharmacol*. 1978 Jan 15;47(2):177-89.

Langraf R, Malkinson T, Horn T, Veale WL, Lederis K, and Pittman QJ. Release of vasopressin and oxytocin by paraventricular nucleus stimulation in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 258: R155–R159, 1990.

Ledingham JM, Simpson FO, Hamada M. Salt appetite, body sodium, handling of a NaCl load, renin, and aldosterone in genetically and spontaneously hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1990;16 Suppl 7:S6-8.

Li AJ, Wang Q, Elsarelli MM, Brown RL, Ritter S (2015b) Hindbrain catecholamine neurons activate orexin neurons during systemic glucoprivation in male rats. *Endocrinology*, August 2015, 156(8):2807–2820.

Lipski J, Kanjhan R, Kruszevska B, Smith M. Barosensitive neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat in vivo: Morphological properties and relationship to C1 adrenergic neurons. *Neurosci* 69: 601–618, 1995.

Lipski, J., Kanjhan, R., Kruszevska, B., and Rong, W. Properties of presympathetic neurones in the rostral ventrolateral medulla in the rat: an intracellular study “in vivo.” *J. Physiol*. 1996. 490(Pt 3), 729–744. doi: 10.1113/jphysiol.1996.sp021181

Lipski, J., Kawai, Y., Qi, J., Comer, A., and Win, J. Whole cell patch-clamp study of putative vasomotor neurons isolated from the rostral ventrolateral medulla. *Am. J. Physiol.* 1998. 274(4 Pt 2), R1099–R1110

Littlejohn NK, Siel RB Jr, Ketsawatsomkron P, Pelham CJ, Pearson NA, Hilzendeger AM, Buehrer BA, Weidemann BJ, Li H, Davis DR, Thompson AP, Liu X, Cassell MD, Sigmund CD, Grobe JL. Hypertension in mice with transgenic activation of the brain renin-angiotensin system is vasopressin dependent. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2013 May 15;304(10):R818-28. doi: 10.1152/ajpregu.00082.2013. Epub 2013 Mar 27.

Llewellyn T, Zheng H, Liu X, Xu B, Patel KP. Median preoptic nucleus and subfornical organ drive renal sympathetic nerve activity via a glutamatergic mechanism within the paraventricular nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2012 Feb 15;302(4):R424-32. doi: 10.1152/ajpregu.00403.2011. Epub 2011 Dec 7.

Ludwig M, Callahan MF, Neumann I, Landgraf R, Morris M. Systemic osmotic stimulation increases vasopressin and oxytocin release within the supraoptic nucleus. *J Neuroendocrinol.* 1994 Aug;6(4):369-73.

Ludwig M, Leng G. Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Feb;7(2):126-36.

Ma RC, Dun NJ. Vasopressin depolarizes lateral horn cells of the neonatal rat spinal cord in vitro. *Brain Res.* 1985 Nov 25;348(1):36-43.

Malheiros-Lima MR, Takakura AC, Moreira TS. Depletion of rostral ventrolateral medullary catecholaminergic neurons impairs the hypoxic ventilatory response in conscious rats. *Neuroscience.* 2017 May 20;351:1-14. doi: 10.1016/j.neuroscience.2017.03.031. Epub 2017 Mar 29.

Madden CJ, Sved AF. Cardiovascular regulation after destruction of the C1 cell group of the rostral ventrolateral medulla in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003 Dec;285(6):H2734-48. Epub 2003 Aug 21.

Madden CJ, Stocker SD, Sved AF. Attenuation of homeostatic responses to hypotension and glucoprivation after destruction of catecholaminergic rostral ventrolateral medulla neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2006 Sep;291(3):R751-9.

May CN, McAllen RM. Brain angiotensinergic pathways mediate renal inhibition by central hypertonic NaCl in conscious sheep. *Am J Physiol.* 1997 Feb;272(2 Pt 2):R593-600.

Mecawi AS, Ruginsk SG, Elias LL, Varanda WA, Antunes-Rodrigues J. Neuroendocrine Regulation of Hydromineral Homeostasis. *Compr Physiol.* 2015 Jul 1;5(3):1465-516. doi: 10.1002/cphy.c140031.

Menani JV, Johnson AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 269: R1044–R1049, 1995.

McKinley MJ, Denton DA, Oldfield BJ, De Oliveira LB, Mathai ML. Water intake and the neural correlates of the consciousness of thirst. *Semin Nephrol.* 2006 May;26 (3):249-57.



Milner TA, Pickel VM, Park DH, Joh TH, Reis DJ. Phenylethanolamine N-methyltransferase-containing neurons in the rostral ventrolateral medulla of the rat. I. Normal ultrastructure. *Brain Res*. 1987 May 12;411(1):28-45.

Miselis RR. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. *Brain Res* 230: 1–23, 1981.

Moraes, D. J., da Silva, M. P., Bonagamba, L. G., Mecawi, A. S., Zoccal, D. B., Antunes-Rodrigues, J., et al. (2013). Electrophysiological properties of rostral ventrolateral medulla presympathetic neurons modulated by respiratory network in rats. *J. Neurosci.* 33, 19233–19237. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3041-13.2013

Moraes DJ, Machado BH, Paton JF. Specific respiratory neuron types have increased excitability that drive presympathetic neurons in neurogenic hypertension. 2014. *Hypertension* 63, 1309–1318. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.02283

Moss NG, Kopple TE, William J. Arendshorst. Renal vasoconstriction by vasopressin  $V_{1a}$  receptors is modulated by nitric oxide, prostanoids, and superoxide but not the ADP ribosyl cyclase CD38. *American Journal of Physiology - Renal Physiology* Published 15 May 2014 Vol. 306 no. 10, F1143-F1154 DOI: 10.1152/ajprenal.00664.2013.

Nehmé B, Henry M, Mouginot D, Drolet G. The Expression Pattern of the Na (+) Sensor, Na(X) in the Hydromineral Homeostatic Network: A Comparative Study between the Rat and Mouse. *Front Neuroanat.* 2012 Jul 19;6:26. doi: 10.3389/fnana.2012.00026. eCollection 2012.

Nielsen S, Kwon TH, Christensen BM, Promeneur D, Frøkiaer J, Marples D. Physiology and pathophysiology of renal aquaporins. *J Am Soc Nephrol.* 1999 Mar;10 (3):647-63.

Oka Y, Ye M, Zuker CS. Thirst driving and suppressing signals encoded by distinct neural populations in the brain. *Nature.* 2015 Apr 16;520 (7547):349-52. doi: 10.1038/nature14108. Epub 2015 Jan 26.

Oliet, S. H. & Bourque, C. W. Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* 364, 341–343 (1993).

Okada H, Suzuki H, Kanno Y, Yamamura Y, Saruta T. Chronic and selective vasopressin blockade in spontaneously hypertensive rats. *Am J Physiol.* 1994 Dec;267(6 Pt 2):R1467-71.

Oparil S, Chen YF, Peng N, Wyss JM. Anterior hypothalamic norepinephrine, atrial natriuretic peptide, and hypertension. *Front Neuroendocrinol.* 1996 Apr;17(2):212-46.

Prabha Kc1, Kannan V, Balan1, Steven S, Tjoe1, Richard J. Martin1, Joseph C. LaManna2, Musa A. Haxhiu, Thomas E. Dick. Increased vasopressin transmission from the paraventricular nucleus to the rostral medulla augments cardiorespiratory outflow in chronic intermittent hypoxia-conditioned rats. *J Physiol* 588.4 (2010) pp 725–740 725.

Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press; 1996.

Pereira-Derderian DT, Vendramini RC, Menani JV, Chiavegatto S, De Luca LA Jr. Water deprivation-partial rehydration induces sensitization of sodium appetite and alteration of hypothalamic transcripts. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2016 Jan 1;310(1):R15-23. doi: 10.1152/ajpregu.00501.2014. Epub 2015 Nov 4.

Picklo JM, Wiley RG, Lappi DA, Robertson D. Noradrenergic lesioning with an anti-dopamine  $\beta$ -hydroxylase immunotoxin. *Brain Research*. Volume 666, Issue 2, 15 December 1994, Pages 195-200.

Portal Brasil. Governo do Brasil: Saúde anuncia dados da hipertensão no País. 2011. Disponível em: <http://www.brasil.gov.br/saude/2011/04/saude-anuncia-dados-da-hipertensao-no-pais>.

Pow CV, Morris JF. Dendrites of hypothalamic magnocellular neurons release neurohipophysial peptides by exocytosis. *Neuroscience*. 1989;32:435-9.

Pyatin VF, Tatarnikov VS, Glazkova EN. Control of respiratory and hypotensive response during hypoxic chemoreflex by A5 region neurons in rats. *Bull Exp Biol Med*. 2006 Dec;142(6):654-6.

Radiological Society of Norte America Press Release. Migraines Linked to High Sodium Levels in Cerebrospinal Fluid Released: November 28, 2017. Disponível em: [https://press.rsna.org/timssnet/media/pressreleases/14\\_pr\\_target.cfm?ID=1986](https://press.rsna.org/timssnet/media/pressreleases/14_pr_target.cfm?ID=1986)

Raggenbass M. Overview of cellular electrophysiological actions of vasopressin. *Eur J Pharmacol*. 2008 Apr 7; 583(2-3):243-54. doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.074. Epub 2008 Jan 30.

Ramakers, C., et al. Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neurosci. Lett*. v. 339(1), p.62-6, 2003.

Ribeiro N, Panizza HD, Santos KM, Ferreira-Neto HC, Antunes VR. Salt-induced sympathoexcitation involves vasopressin V1a receptor activation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015 Sep 9:ajpregu.00312.2015. doi: 10.1152/ajpregu.00312.2015.

Robinson BW, Mishkin M: Alimentary responses to forebrain stimulation in monkeys. *Exp Brain Res* 4:330-366, 1996.]

Ross CA, Ruggiero DA, Park DH, Joh TH, Sved AF, Fernandez-Pardal J, Saavedra JM, and Reis DJ. Tonic vasomotor control by the rostral ventrolateral medulla: effect of electrical or chemical stimulation of the area containing C1 adrenaline neurons on arterial pressure, heart rate, and plasma catecholamines and vasopressin. *J Neurosci* 4: 474-494, 1984.

Ruggiero DA, Ross CA, Anwar M, Park DH, Joh TH, Reis DJ. Distribution of neurons containing phenylethanolamine N-methyltransferase in medulla and hypothalamus of rat. *J Comp Neurol*. 1985 Sep 8;239(2):127-54.

Saavedra JM, Grobecker H, Axelrod J. Changes in central catecholaminergic neurons in the spontaneously (genetic) hypertensive rat. *Circ Res*. 1978 Apr;42(4):529-34

Sandgren JA, Linggongoro DW, Zhang SY, Sapouckey SA, Claflin KE, Pearson NA, Leidinger MR, Pierce GL, Santillan MK, Gibson-Corley KN, Sigmund CD, Grobe JL. Angiotensin AT1A Receptors Expressed in Vasopressin-Producing Cells of the Supraoptic Nucleus Contribute to the Osmotic Control of Vasopressin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2018 Jan 24. doi: 10.1152/ajpregu.00435.2017. [Epub ahead of print

Santos Moreira MC, Naves LM, Marques SM, Silva EF, Rebelo AC, Colombari E, Pedrino GR. Neuronal circuits involved in osmotic challenges. *Physiol Res*. 2017 Jul 18;66(3):411-423. Epub 2017 Feb 28.

Scheffe, J.H., et al. Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J. Mol. Med.*, v. 84(11), p. 901-10, 2006.

Schiltz JC, Sawchenko PE. Specificity and generality of the involvement of catecholaminergic afferents in hypothalamic responses to immune insults. *J Comp Neurol*. 2007 May 20;502(3):455-67.

Schreihofner AM, Guyenet PG. Identification of C1 presympathetic neurons in rat rostral ventrolateral medulla by juxtacellular labeling in vivo. *J Comp Neurol* 387: 524–536, 1997.

Schreihofner AM, Stornetta RL, Guyenet PG. Regulation of sympathetic tone and arterial pressure by rostral ventrolateral medulla after depletion of C1 cells in rat. *Journal of Physiology* (2000), 529.1, pp.221–236.

Schreihofner AM, Guyenet PG. Sympathetic reflexes after depletion of bulbospinal catecholaminergic neurons with anti-DbetaH-saporin. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Aug; 279(2):R729-42.

Scrogin KE, Grygielko ET, Brooks VL. Osmolality: a physiological long-term regulator of lumbar sympathetic nerve activity and arterial pressure. *Am J Physiol*. 1999 Jun;276(6 Pt 2): R1579-86.

Scrogin KE, McKeogh DF, Brooks VL. Is osmolality a long-term regulator of renal sympathetic nerve activity in conscious water-deprived rats? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2002 Feb;282(2): R560-8.

Schiltz JC, Sawchenko PE. Specificity and generality of the involvement of catecholaminergic afferents in hypothalamic responses to immune insults. *J Comp Neurol*. 2007 May 20;502(3):455-67.

Schlenker EH, Prestbo A. Elimination of the post-hypoxic frequency decline in conscious rats lesioned in pontine A5 region. *Respir Physiol Neurobiol*. 2003;138(2-3):179-91.

Sharif-Naeni R, Witty MF, S´egu´ela P, Bourque CW. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. *Nat Neurosci* 9: 93-98, 2006.

Shi P<sup>1</sup>, Stocker SD, Toney GM. Organum vasculosum laminae terminalis contributes to increased sympathetic nerve activity induced by central hyperosmolality. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2007 Dec;293(6):R2279-89. Epub 2007 Sep 26.

Silva TM, Takakura AC, Moreira TS. Acute hypoxia activates hypothalamic paraventricular nucleus-projecting catecholaminergic neurons in the C1 region. *Exp Neurol*. 2016 Nov;285(Pt A):1-11. doi: 10.1016/j.expneurol.2016.08.016. Epub 2016 Aug 25.

Simpson JB, Epstein AN, Camardo JS Jr. Localization of receptors for the dipsogenic action of angiotensin II in the subfornical organ of rat. *J Comp Physiol Psychol*. 1978;92:581–601.

Smith DW, Buller KM, Day TA. Role of Ventrolateral Medulla Catecholamine Cells in Hypothalam Neuroendocrine Cell Responses to Systemic Hypoxia. *The Journal of Neuroscience*, December 1995, 15(12): 7979-7988

Simerly RB and Sawanson LW. Projections of the medial preoptic nucleus: a *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin anterograde tract tracing study in the rat. *J Comp Neurol* 270: 209–242, 1988.

Simmonds SS, Lay J, Stocker SD. Dietary salt intake exaggerates sympathetic reflexes and increases blood pressure variability in normotensive rats. *Hypertension*. 2014 Sep;64(3):583-9.

Simms AE, Paton JF, Pickering AE & Allen AM (2009). Amplified respiratory-sympathetic coupling in the spontaneously hypertensive rat: does it contribute to hypertension? *J Physiol* 587, 597–610.

Sladek CD, Blair ML, Mangiapane M. Evidence against a pressor role for vasopressin in spontaneous hypertension. *Hypertension*. 1987 Apr;9(4):332-8.

Son SJ, Filosa JA, Potapenko ES, Biancardi VC, Zheng H, Patel KP, Tobin VA, Ludwig M, Stern JE. Dendritic Peptide Release Mediates Interpopulation Crosstalk between Neurosecretory and Preautonomic Networks. *Neuron*. 2013 Jun 19;78(6):1036-49. doi: 10.1016/j.neuron.2013.04.025.

Stewen P, Mervaala E, Karppanen H, Nyman T, Saijonmaa O, Tikkanen I, Fyhrquist F. Sodium load increases renal angiotensin type 1 receptors and decreases bradykinin type 2 receptors. *Hypertens Res*. 2003 Jul;26(7):583-9.

Stocker SD, Simmons JR, Stornetta RL, Toney GM & Guyenet PG. Water deprivation increases Fos immunoreactivity in PVN autonomic neurons with projections to the spinal cord and rostral ventrolateral medulla. *J Comp Neurol* 494: 673-685, 2004a.

Stocker SD, Keith KJ, Toney GM. Acute inhibition of the hypothalamic paraventricular nucleus decreases renal sympathetic nerve activity and arterial blood pressure in water-deprived rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2004b Apr; 286(4):R719-25. Epub 2003 Dec.

Stocker SD, Osborn JL, Carmichael SP. Forebrain osmotic regulation of the sympathetic nervous system. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2008 May;35(5-6):695-700. Epub 2007 Dec 7.

Stocker SD, Lang SM, Simmonds SS, Wenner MM, Farquhar WB. Cerebrospinal Fluid Hypnatremia Elevates Sympathetic Nerve Activity and Blood Pressure via the Rostral Ventrolateral Medulla. *Hypertension*. 2015 Dec;66(6):1184-90. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.115.05936. Epub 2015 Sep 28.

Stocker SD, Monahan KD, Kirsteen N. Browning. Neurogenic and Sympathoexcitatory Actions of NaCl in Hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2013 December; 15(6): 538–546. doi:10.1007/s11906-013-0385-9.

Stornetta RL, Inglis MA, KE Viar, Guyenet PG. Afferent and efferent connections of C1 cells with spinal cord or hypothalamic projections in mice. *Brain Struct Funct* (2016) 221:4027–4044

Sun MK, Hackett JT, Guyenet PG. (1988). Sympathoexcitatory neurons of rostral ventrolateral medulla exhibit pacemaker properties in the presence of glutamate-receptor antagonist. *BrainRes*. 438,23–40.doi:10.1016/0006- 8993(88)91320-0

Szczepańska-Sadowska E, Paczwa P, Loń S, Ganten D. Increased pressor function of central vasopressinergic system in hypertensive renintransgenic rats. *J Hypertens*. 1998 Oct;16(10):1505-14.

Takeda Y, Yoneda T, Demura M, Furukawa K, Miyamori I, Mabuchi H. Effects of high sodium intake on cardiovascular aldosterone synthesis in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2001 Mar;19(3 Pt 2):635-9.

Teranishi Y, Sugino H, Ozono R, Ishioka N, Kumazaki T, Tsuru H. Contribution of endogenous vasopressin to regional hemodynamics in borderline-hypertensive Hiroshima rats. *Hypertens Res.* 2002 Mar;25(2):241-8.

Thrasher TN. Circumventricular organs, thirst and vasopressin secretion. In *Vasopressin*, ed. SCHRIER RW, p. 311. *New York: Raven Press*; 1985.

Toney GM, Stocker SD. Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: implications for cardiovascular disease. *J Physiol.* Sep 15, 2010; 588(Pt 18): 3375–3384.

Toshihiko Suzue, Noboru Yanaihara<sup>§</sup>, Masanori Otsuka. Actions of vasopressin, gastrin releasing peptide and other peptides on neurons of newborn rat spinal cord in vitro. *J Neuroendocrinol.* 1994 Aug;6(4):369-73.

Trepiccione F, Zacchia M, Capasso G. The role of the kidney in salt-sensitive hypertension. *Clin Exp Nephrol.* 2012 Feb;16(1):68-72. doi: 10.1007/s10157-011-0489-y. Epub 2011 Nov 1.

Varner KJ, Vasquez EC, Brody MJ. Lesions in rostral ventromedial or rostral ventrolateral medulla block neurogenic hypertension, *Hypertension* 24 \_1994. 91–96.

Weinberger MH. Salt sensitivity of blood pressure in humans. *Hypertension.* 1996; 27:481–490.

Weinberger MH, Fineberg NS, Fineberg SE, Weinberger M. Salt sensitivity, pulse pressure, and death in normal and hypertensive humans. *Hypertension.* 2001 Feb;37(2 Pt 2):429-32.

Weindl, A. Neuroendocrine aspects of circumventricular organs. *Front Neuroendoc* 3: 3-32, 1973.

Weiss ML, Claassen DE, Hirai T, Kenney MJ. Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion. *J Auton Nerv Syst.* 1996 Feb 5; 57(1-2):109-15.

Whelton PK, et al. Guideline for the Prevention, Detection, Evaluation, and Management of High Blood Pressure in Adults. 2017 High Blood Pressure Clinical Practice Guideline.

Willette RN, Barcas PP, Krieger AJ, Sapru HN. Vasopressor and depressor areas in the rat medulla. Identification by microinjection of L-glutamate. *Neuropharmacology* 22: 1071–1079, 1983.

Wu C, Yosef N, Thalhamer T, Zhu C, Xiao S, Kishi Y, Regev A, Kuchroo VK. Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1. *Nature.* 2013;496:513–517. doi: 10.1038/nature11984.

Wyss JM, Carlson SH. The role of the nervous system in hypertension. *Curr Hypertens Rep.* 2001 Jun;3(3):255-62.

Yamada Y, Yamanouchi Y, Chihara T, et al: OPC-21268, a vasopressin V1 antagonist, produces hypotension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 1994; 23: 200–204.

Yang Z, Bertram D, Coote JH. The role of glutamate and vasopressin in the excitation of RVL neurones by paraventricular neurones. *Brain Res.* 2001 Jul 20;908(1):99-103.

Yang Z, Bertram D, Coote JH. The role of glutamate and vasopressin in the excitation of RVL neurones by paraventricular neurones. *Brain Res.* 2001 Jul 20;908(1):99-103.

Ye ZY, Li DP, Byun HS, Li L, Pan HL. NKCC1 upregulation disrupt chloride homeostasis in the hypothalamus and increases neuronal activity-sympathetic drive in hypertension. *J Neurosci*. 2012 Jun 20;32(25):8560-8. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1346-12.2012.

Young S. Oh, Lawrence J. Appel, Zorina S. Galis, David A. Hafler, Jiang He, Amanda L. Hernandez, Bina Joe, S. Ananth Karumanchi, Christine Maric-Bilkan, David Mattson, Nehal N. Mehta, Gwendolyn Randolph, Michael Ryan, Kathryn Sandberg, Jens Titze, Eser Tolunay, Glenn M. Toney, David G. Harrison. National Heart, Lung, and Blood Institute Working Group Report on Salt in Human Health and Sickness Building on the Current Scientific Evidence. *Hypertension*. 2016;68:281-288; originally published online June 20, 2016.

Zhang Z, Bourque CW. Calcium permeability and flux through osmosensory transduction channels of isolated rat supraoptic nucleus neurons. *Eur J Neurosci* 23: 1491-1500, 2006.