

**RENATO WILLIAN MARTINS SÁ**

**Função dos astrócitos e ectonucleotidasas na sinalização purinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão induzida por sal**

São Paulo

2020

**RENATO WILLIAN MARTINS SÁ**

**Função dos astrócitos e ectonucleotidases na sinalização purinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão induzida por sal**

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

2020

**RENATO WILLIAN MARTINS SÁ**

**Função dos astrócitos e ectonucleotidases na sinalização purinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão induzida por sal**

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.

Orientador: Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes

Versão Corrigida.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Controle Neural da Circulação do Instituto de Ciências Biomédicas (ICB) da Universidade de São Paulo (USP) com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES, Código de Financiamento 001) – e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): processo nº 2016/03359-8 (Bolsa-auxílio de doutorado), 2018/11203-3 (Bolsa-BEPE) e 2016/21991-3 (Auxílio Regular de Pesquisa).

## RESUMO

Sá, R. W. M. **Função dos astrócitos e ectonucleotidases na sinalização purinérgica do núcleo paraventricular do hipotálamo na hipertensão induzida por sal.** [tese (Doutorado em Fisiologia Humana)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

No presente estudo investigamos se a hipertensão neurogênica decorrente da sobrecarga de sal (SS) estimula a liberação de ATP no PVN e quais mecanismos seriam responsáveis por este fenômeno. Duas hipóteses foram levantadas: (1) um maior conteúdo de ATP no PVN durante a SS é resultado de uma falha das ectonucleotidases em metabolizar o ATP; e (2) a SS estimularia os astrócitos do PVN a liberar ATP. Para testar nossas hipóteses utilizamos ratos Wistar pesando entre 290-350 g (n = 12) para estudos *in vivo* de medida de pressão arterial por radiotelemetria e análise de parâmetros da modulação autonômica do sistema cardiovascular e ratos Sprague-Dawley com peso entre 290-350 g (n = 41) para os estudos *in vitro* com utilização de biossensores para detecção de purinas e imunohistoquímica. Ambos grupos foram divididos em um grupo SS que recebeu solução de NaCl 2% em substituição à água da torneira por 4 ou 7 dias e outro grupo controle que recebeu água. A progressão da hipertensão em ratos acordados expostos à SS foi monitorada por radiotelemetria ao longo de sete dias. A expressão do RNAm das ectonucleotidases ecto-nucleotídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPD) 1, 2 e 3 e ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) no PVN foi analisada com a técnica RT- qPCR. Utilizando biossensores amperométricos medimos a liberação de ATP e adenosina, bem como a atividade das ectonucleotidases no PVN em fatias hipotalâmicas. A função dos astrócitos do PVN foi avaliada por meio da interferência gênica com o vetor AVV-sGFAP-dnSNARE-EGFP. Os níveis de pressão arterial média (PAM) dos ratos SS aumentaram progressivamente até ao 7º de exposição ao sal [PAM:  $97 \pm 4$  mmHg (dia 0) vs  $129 \pm 4$  mmHg (dia 7)  $p < 0,0001$ ]. A potência da banda LF aumentou progressivamente do dia 0 ao dia 7 em ratos SS [LF:  $1,21 \pm 0,22$  mmHg<sup>2</sup> (dia 0) vs  $5,01 \pm 0,96$  mmHg<sup>2</sup> (dia 6),  $p < 0,0001$ ]. Apenas o nível de mRNA da E-NTPD3 foi maior no grupo SS do que no controle no dia 7 [ $0,99 \pm 0,5 \Delta\Delta Ct$  (controle) vs.  $3,09 \pm 0,5\Delta\Delta Ct$  (SS)  $p = 0,0247$ ]. O grupo de ratos SS apresentou aumento na liberação de ATP

( $19,16 \pm 6,9 \mu\text{M}$ ,  $p < 0,0001$ ) quando comparado ao grupo controle ( $1,13 \pm 0,8 \mu\text{M}$ ), porém não na liberação de adenosina [ $1,19 \pm 0,6 \mu\text{M}$  (SS) vs  $2,15 \pm 0,9 \mu\text{M}$  (controle)]. A atividade das ectonucleotidases foi avaliada *in vitro* quantificando a produção máxima de adenosina em resposta à aplicação exógena de ATP ( $50\mu\text{M}$ ). Nenhuma diferença foi detectada comparando as respostas entre os dois grupos. A intensidade da imunofluorescência da proteína glial fibrilar glial (GFAP) foi maior no PVN de ratos SS do que nos controles [ $6,9 \pm 1,3$  a.u. (controle) vs  $27,2 \pm 6,2$  a.u. (SS)]. A transfecção unilateral do PVN com vetor dnSNARE diminuiu a liberação de ATP nos ratos SS quando comparado com o lado não transfectado como controle [ $13,88 \pm 0,07 \mu\text{M}$  (lado não transfectado) vs.  $6,64 \pm 1,64 \mu\text{M}$  (lado transfectado)]. Em conclusão, nossos resultados mostram que a sobrecarga de sal com solução hipertônica de NaCl 2% não afeta a atividade das ectonucleotidases, enzimas que degradam o ATP, mas potencialmente estimula os astrócitos do PVN a liberarem o trifosfato de adenosina por via exocitótica. **Palavras-chave:** ATP, adenosina, astrócitos, sal, hipertensão arterial.

## ABSTRACT

Sá, R. W. M. **Role of astrocytes and ectonucleotidases in purinergic signaling of the paraventricular nucleus of hypothalamus in salt-induced hypertension.** [Ph. D. thesis (Human Physiology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2020.

In the present study we investigated whether salt-load (SS) stimulates the release of ATP in the PVN environment, and which mechanism would be responsible for this phenomenon. Two hypotheses have been raised: (1) a higher content of ATP in PVN during SS is a result of a failure of ectonucleotidases to metabolize ATP; and (2) SS can stimulate PVN astrocytes to release ATP. Male Wistar rats 290-350 g (n = 12) were used for *in vivo* studies and Sprague Dawley rats 290-350 g (n = 41) for *in vitro*. Animals were divided in 2 group: 1) SS: group that received hypertonic saline solution (2% NaCl) in replacement of tap water for 4 or 7 days, and 2) control group. A radiotelemetry system was used to measure the progression of hypertension in SS rats over the seven days of salt loading. mRNA expression of ecto-nucleotide triphosphate diphosphohydrolase (E-NTPD) 1, 2 and 3 and ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) in PVN was analyzed by RT-qPCR. The release of ATP, adenosine and the activity of ectonucleotidases were measured via amperometric biosensors overlaid on the PVN region of hypothalamic slices. The function of PVN astrocytes was assessed by interference with the AVV-sGFAP-dnSNARE-EGFP vector. Mean arterial pressure (MAP) of SS rats increased progressively from day 2 to 7 [MAP:  $97 \pm 4$  mmHg (day 0) vs  $129 \pm 4$  mmHg (day 7),  $p < 0.0001$ ]. The power of the LF component increased progressively from day 0 to day 7 in SS rats [LF:  $1.21 \pm 0.22$  mmHg<sup>2</sup> (day 0) vs  $5.01 \pm 0.96$  mmHg<sup>2</sup> (day 6),  $p < 0.0001$ ]. E-NTPD3 mRNA expression was higher in the SS group than in control [ $0.99 \pm 0.5$   $\Delta\Delta$ Ct (control) vs.  $3.09 \pm 0.5$   $\Delta\Delta$ Ct (SS)  $p = 0.0247$ ]. SS rats showed an increase in ATP release [ $1.13 \pm 0.8$   $\mu$ M (control) vs.  $19.16 \pm 6.9$   $\mu$ M (SS),  $p < 0,0001$ ], but not in adenosine [ $2.15 \pm 0.9$   $\mu$ M (control) vs.  $1.19 \pm 0.6$   $\mu$ M (SS)]. The activity of ectonucleotidases was tested *in vitro* by quantifying the maximum production of adenosine in response to exogenous application of ATP (50 $\mu$ M). No difference was detected when comparing the responses between the groups. PVN glial fibrillar protein (GFAP) immunofluorescence intensity was higher in SS rats than

in control [ $6.9 \pm 1.3$  a.u. (control) vs  $27.2 \pm 6.2$  a.u. (SS)]. PVN unilateral transfection with dn-SNARE vector decreased the release of ATP in SS rats when compared to the non-transfected side as a control [ $13.88 \pm 0.07$   $\mu$ M (non-transfected side) vs.  $6.64 \pm 1.64$   $\mu$ M (transfected side)]. In conclusion, our results showed that SS gradually increases the BP as well as the sympathetic influence on the cardiovascular system and stimulates the glial release of ATP in the PVN by exocytosis. As conclusion, our results show that high salt intake of hypertonic NaCl solution (2%) does not affect ectonucleotidases activity but stimulates PVN astrocytes to release ATP via exocytosis mechanism.

Keywords: ATP, adenosine, astrocytes, salt, hypertension.



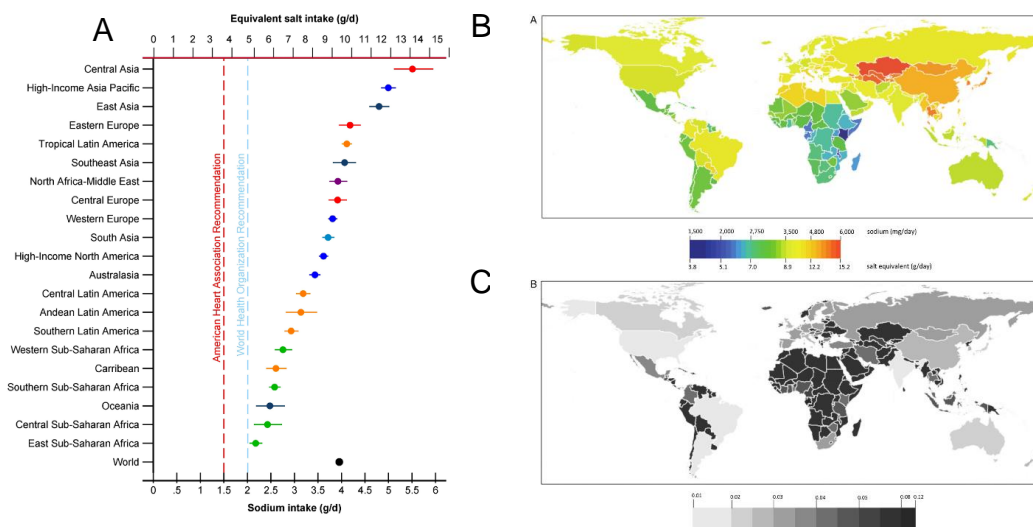
# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 SAL E HIPERTENSÃO ARTERIAL

Os altos níveis de pressão arterial (PA), conhecido, como hipertensão arterial (HA), é a principal causa de doenças cardiovasculares que é responsável por mais de 18 milhões de mortes por ano (Frieden and Jaffe 2018). A HA é degenerativa e de etiologia multifatorial que pode ser agravada pelos maus hábitos alimentares da população em geral, principalmente em grandes centros urbanos onde o consumo de dietas hipercalóricas, ricas em gorduras e carboidratos, é elevado. Associado às dietas hipercalóricas, há também um grande vilão que ainda não aparece como protagonista, mas que oferece sérios transtornos para o controle da pressão arterial: o cloreto de sódio (NaCl), ou mais comumente chamado de sal!

A ingestão de sal excede o nível recomendado em quase todos os países do mundo (Powles, Fahimi et al. 2003). Em 2010, por exemplo, a ingestão média global de sal foi 10 g/dia, ou 4 g/dia de sódio (Na<sup>+</sup>), mais do que o dobro do limite recomendado tanto pela *American Heart Association* quanto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) figura 1A. Na América do Sul, a ingestão média de sal correspondeu a 7 g/dia, enquanto na América do Norte e em países da Europa ocidental, incluindo o Reino Unido, França, Alemanha e Grécia, os valores chegaram a quase 9 g/dia. Na Ásia, o consumo médio foi superior a 13 g/dia, equivalente a mais de 5,5 g/dia de Na<sup>+</sup>.

**Figura 1.** Ingestão global de sódio.



Em A: ingestão média de sódio em 21 regiões. Em B: ingestão de sódio por país, para maiores de 20 anos, média de ambos os sexos e em C: incerteza relativa. Fonte: Powles et al. 2013.

### 1.1.1 HISTÓRICO

A hipertensão causada pela alta ingestão de sal foi sistematicamente estudada ao longo do último século, sobretudo a partir dos estudos de Ambard e Beaujard em 1904 que demonstraram pela primeira vez na história que hipertensos tendiam a reter  $\text{Na}^+$  quando ingeriam dieta com alto teor sal (*apud* MacGregor e Wardener 1998).

Ambard e Beaujard estudaram 6 pacientes com hipertensão essencial por um período de três semanas, onde a quantidade de sal na dieta variava de 3 g/dia até 14 g/dia. Na primeira circunstância, os pacientes apresentaram uma modesta queda dos níveis de pressão arterial (PA) e a quantidade  $\text{Na}^+$  excretada na urina superava a quantidade ingerida, tornando o balanço de  $\text{Na}^+$  positivo. Ao aumentarem a ingestão de sal para 14 g/dia, a PA tornou-se ainda maior do que o normal e a quantidade  $\text{Na}^+$  excretada na urina era menor do que a ingerida, sugerindo que parte do  $\text{Na}^+$  ingerido ficava retido no organismo dos pacientes.

A retenção de sal passou a ser então admitida na comunidade científica como uma das causas de edema e HA, e o consumo de dietas com restrição severa de sal (*rice and fruit diet*) passou a ser estimulado por médicos como tratamento da HA, até a produção dos primeiros diuréticos a partir da década de 1950 (DiNicolantonio and O'Keefe 2017).

Em 1947, o farmacologista britânico Ernest Basil Verney conduziu uma série de experimentos na *University College London* (UCL) demonstrando que a injeção intracarotídea de soluções hipertônicas de cloreto de sódio ( $\text{NaCl}$ ), mas não de uréia, causava inibição da diurese em cachorros, e esta resposta era diminuída em cerca de 90% após a remoção do lobo posterior (Verney 1947). Verney sugeriu então que o sistema circulatório dispunha de “osmossensores” que detectavam alterações na pressão osmótica do sangue e regulavam a secreção do hormônio antidiurético pela neurohipófise, conhecimento que serviu como base para todas as descobertas que viriam adiante sobre a função do sistema nervoso central (SNC) na regulação do balanço hídrico e eletrolítico e subsequentemente no controle da PA.

Quase uma década após a descoberta de Verney, surgiu um dos nomes mais importantes na ciência relacionada aos estudos sobre o sal e seus efeitos no sistema circulatório: Lewis K. Dahl. Médico e pesquisador do Laboratório Nacional

Brookhaven (Upton, NY) Dahl publicou em 1960 o primeiro estudo populacional demonstrando que a incidência da HA variava com a média de consumo diário de NaCl em populações ao redor do mundo (Dahl 1960). Em populações mais primitivas onde o acesso a alimentos com alto teor de sal era limitado, como no Alasca onde vivem os esquimós, raramente se encontrava indivíduos hipertensos. Ao passo que no norte do Japão, onde o consumo de NaCl ultrapassava 25 gramas por dia, cerca de 40% da população apresentava HA.

A metodologia empregada por Dahl em seu estudo foi recebida com certo ceticismo por parte da comunidade acadêmica dada a subjetividade na classificação do consumo diário de NaCl entre as populações estudadas, a propósito, o levantamento preciso destes dados ainda naquela época seria bastante desafiador. Tal desconfiança levou o grupo de estudo INTERSALT a publicar em 1988 uma nova correlação com base em dados de excreção urinária de sódio de 24 horas que reflete uma estimativa mais precisa da ingestão deste íon (Intersalt 1988), já que a capacidade do organismo em retê-lo é definitivamente limitada no longo prazo (De Luca Jr, Menani et al. 2013). No entanto, os resultados confirmaram o que previamente fora demonstrado por Dahl de que em locais onde a excreção urinária de sódio era maior, os níveis de pressão arterial sistólica (PAS) também tendiam a ser maiores.

Dahl também identificou que em todos locais havia indivíduos que consumiam de forma consistente grandes quantidades de sal, mas que não desenvolviam HA, sugerindo que o *background* genético determinava a sensibilidade ao sal. Alguns anos mais tarde, após observar que o mesmo acontecia em roedores, publicou um artigo de duas páginas na renomada revista britânica *Nature*, onde apresentava duas cepas de animais experimentais criadas a partir de endo-cruzamentos de ratos Sprague-Dawley: os ratos Dahl sal-sensíveis (Dahl-SS) que desenvolviam HA após serem submetidos a uma dieta hipersódica (NaCl a 8%) e os ratos Dahl sal-resistentes (Dahl-SR) que permaneciam normotensos quando submetidos à mesma dieta hipersódica (Dahl, Heine et al. 1962). Ambas as linhagens são modelos animais experimentais utilizados até hoje na investigação dos mecanismos envolvidos na sensibilidade genética ou na resistência à hipertensão induzida por sal (Guo, Menga et al. 2015, Hashmat, Rudemiller et al. 2016, Yoshimoto, Onishi et al. 2019).

### 1.1.2 MECANISMOS FISIOLÓGICOS DA HIPERTENSÃO INDUZIDA DE SAL

A partir da década de 1960 começaram a surgir os primeiros experimentos que examinaram os mecanismos fisiológicos envolvidos com a HA induzida por sal. Dahl et al (1967) uniram um rato Dahl-SR com rato Dahl-SS em experimentos de parabiose e observaram que o rato Dahl-SR desenvolvia rapidamente HA quando era alimentado com uma dieta rica em sal, enquanto que a hipertensão no rato Dahl-SS era moderada, sugerindo que mecanismos humorais contribuía de maneira importante para a hipertensão induzida por sal e poderiam ser transmitidos experimentalmente entre os sistemas circulatórios de ambas cepas (Dahl, Knudsen et al. 1967).

Em estudos subsequentes, Dahl et al (1972) transplantaram os rins de um rato Dahl-SS em um rato Dahl-SR e observaram que cepa receptora desenvolvia HA severa quando era alimentada com dieta hipersódica (NaCl a 8%) e concluíram que o genótipo dos rins também desempenhava uma função decisiva na sensibilidade ao sal (Dahl, Heine et al. 1972).

Estes achados estavam em sinergia com a visão de que um aumento na ingestão de NaCl poderia assim, em um rim susceptível, provocar HA. Os fisiologistas Arthur C. Guyton e Thomas G. Coleman eram os principais apoiadores desta teoria, e na década de 1970 publicaram um modelo matemático onde revisavam alguns princípios do funcionamento do sistema circulatório, e projetavam a curva pressão-natriurese e seu papel no controle a longo prazo da pressão arterial (Guyton 1980).

De acordo com este modelo, a HA pode resultar de um defeito na capacidade renal de excretar  $\text{Na}^+$ . Portanto, a PA se eleva para aumentar a taxa de filtração glomerular até que a excreção urinária de  $\text{Na}^+$  seja aumentada de forma a reequilibrar o balanço entre a ingesta e a excreção. A sensibilidade ao sal conferiria a esta curva um descolamento para esquerda, enquanto a resistência ao sal a deslocaria para a direita.

### 1.1.3 HIPERTENSÃO NEUROGÊNICA

Ao final da década de 1970 surgiam os primeiros relatos contrapondo a visão de que os rins exerciam de fato o protagonismo na gênese da HA induzida por sal, já que a dieta hipersódica aumentava o débito cardíaco nas linhagens Dahl-SS e Dahl-

SR, mas produzia vasodilatação nos ratos Dahl-SR e vasoconstrição nos ratos Dahl-SS (Ganguli, Tobian et al. 1979).

Estudos subsequentes demonstraram que a simpatectomia química com 6-hidroxidopamina ou a denervação da cadeia simpática lombar minimizava o desenvolvimento da hipertensão induzida por sal na cepa Dahl-SS (Takeshita, Mark et al. 1979). Friedman et al 1979 demonstraram que a interrupção da função adrenérgica periférica com injeções subcutâneas de guanetidina evitou o desenvolvimento da HA em ratos Dahl-SS (Friedman, Tassinari et al. 1979).

Seguindo a mesma linha de evidências, Gordon et al., 1981 demonstraram que ratos Dahl-SS apresentavam uma ligeira diminuição na sensibilidade do barorreflexo e o bloqueio ganglionar da cadeia simpática promovido pela infusão intravenosa de 20 mg/kg de clorisdamina normalizava a pressão arterial de ratos Dahl-SS e Dahl-SR, sustentando a visão que distúrbios no sistema nervoso autônomo, sobretudo na subdivisão simpática, estariam diretamente envolvidos na gênese da HA durante a alta ingestão de sal (Gordon, Matsuguchi et al. 1981).

Ainda no final da década de 1970, outros estudos foram além ao demonstrar a importância de algumas regiões cerebrais na regulação das respostas cardiovasculares induzidas pela alta ingestão de sal. Lesões eletrolíticas na região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) hipotalâmico (Brody and Johnson 1979), no núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) (Goto, Ikeda et al. 1981) ou no hipotálamo anteromedial (Azar, Ernsberger et al. 1981) impediam ou minimizavam a hipertensão induzida por sal em ratos Dahl-SS.

A região AV3V compreende duas estruturas interligadas: o núcleo preóptico mediano (MnPO) que apresenta formação completa de barreira hematoencefálica (BHE), e o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), onde essa estrutura é fragmentada. A presença de capilares fenestrados nesta última estrutura bem como no órgão subfornicial (SFO), localizado na porção dorsal da lâmina terminal, tornam a BHE altamente permeável ao íon  $\text{Na}^+$  e expõe as membranas dos neurônios e astrócitos às variações de pressão osmótica sanguínea (Kinsman, Nation et al. 2017, Nomura, Hiyama et al. 2019). Portanto, o OVLT e o SFO são denominados órgãos circumventriculares (CVOs) devido a localização periventricular e funcionam como duas estações sensoriais primárias do SNC que enviam os sinais decorrentes das

alterações de osmolaridade sanguínea e outros fatores humorais (como angiotensina-II circulante) para outros núcleos hipotalâmicos que controlam a atividade do sistema nervoso autônomo, dentre eles o PVN.

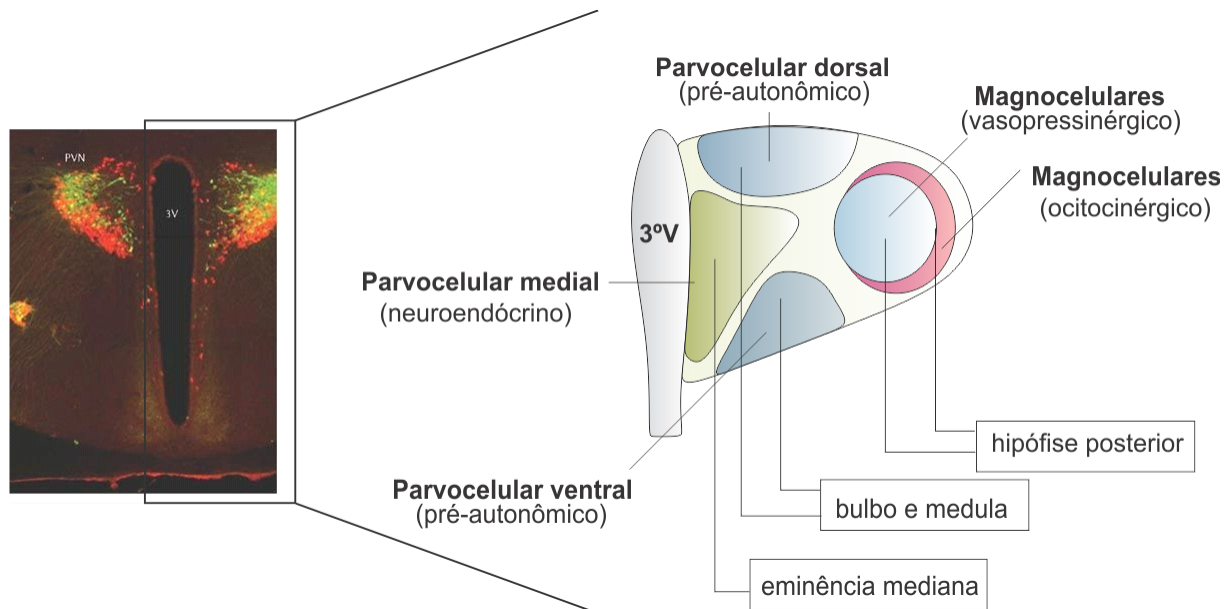
## 1.2 NÚCLEO PARAVENTRICULAR DO HIPOTÁLAMO (PVN)

Atualmente já é bem compreendido que a alta ingestão de sal pode aumentar tanto a osmolaridade quanto o conteúdo de  $\text{Na}^+$  plasmático (hipernatremia) e desencadear resposta de sede, redução do apetite ao  $\text{Na}^+$  e secreção de arginina vasopressina (AVP) na corrente sanguínea, aumentando a PA e produzindo efeito antiurético (Gizowski and Bourque 2018). Também estimula uma reação não uniforme do sistema nervoso simpático, definida como uma simpatoexcitação lombar e adrenal e simpatoinibição renal, que em conjunto tendem a redistribuir o fluxo sanguíneo da circulação sistêmica para os rins, produzindo efeito natriurético como *feedback* negativo e aumento da resistência vascular periférica e da PA (Weiss, Claassen et al. 1996, Kinsman, Browning et al. 2017). Uma parcela importante dessas reações é regulada por grupamentos neuronais do PVN que desempenham funções essenciais no contexto fisiológico de integração e processamento de informações neuroendócrinas e autonômicas.

Situado na porção ventral do diencefalo e adjacente ao terceiro ventrículo, o PVN é composto de duas classes principais de neurônios: os magnocelulares e parvocelulares. Morfologicamente, os magnocelulares apresentam corpo celular maior comparativamente aos parvocelulares e estão localizados na porção lateral do PVN. Constituem o eixo hipotálamo-neurohipofisário e seus fenótipos podem ser vasopressinérgicos ou oxitonérgicos. Suas terminações axonais se projetam para a hipófise posterior e são responsáveis pela secreção de AVP e oxitocina (OT) na corrente sanguínea. Uma subpopulação de neurônios parvocelulares localizados na porção medial do PVN, paralelamente à borda do terceiro ventrículo, se projeta para eminência mediana e são responsáveis pela liberação do hormônio liberador de corticotrofina (CRH) e do hormônio liberador de tireotrofina (TRH). Estimulam a hipófise a secretar corticotrofina (ACTH) e tireotrofina (TSH), respectivamente (Benarroch 2005).

Já os neurônios parvocelulares pré-autonômicos localizados na porção ventral e dorsal do PVN se projetam para uma série de regiões no tronco cerebral e na medula espinhal que exercem uma importante função no controle neural da circulação, via sistema nervoso autônomo. Tais regiões incluem o bulbo ventrolateral rostral (RVLM) e caudal (CVLM), onde se localizam os neurônios catecolaminérgicos C1 e A1, a porção compacta do núcleo ambíguo (NAc), o núcleo do trato solitário (NTS), a área pressora caudal (APC) e a coluna intermediolateral (IML) da medula espinhal (Geerling, Shin et al. 2010). São neurônios imunorreativos a AVP, OT, CRH, Tirosina Hidroxilase (TH), angiotensina, entre outros (Geerling, Shin et al. 2010).

**Figura 2.** Núcleo Paraventricular do Hipotálamo.



À esquerda: imunofluorescência de neurônios vasopressinérgicos (verde) e ocitocinérgicos (vermelho) do PVN. À direita: representação esquemática das subpopulações neuronais do PVN, adaptado de Kandel, Schwartz et al. 2000 e Ludwig e Leng, 2006.

Em um estudo publicado pelo nosso grupo de pesquisa foi demonstrado que a integridade do PVN bem como das aferências que partem dos CVOs tem um papel importante na resposta simpatoexcitória durante elevação da osmolaridade plasmática (Antunes, Yao et al. 2006). Subsequentemente foi avaliado a importância das projeções vasopressinérgicas do PVN para a medula espinhal. Os resultados demonstraram que a injeção intratecal de um antagonista do receptor V1a para vasopressina deprimiu aproximadamente 25% a resposta de simpatoexcitatória do

nervo lombar estimulado por solução hipertônica de NaCl, indicando que a simpático-excitação causada pela hiperosmolaridade é mediada, em parte, por vias neuronais vasopressinérgicas entre o PVN e a medula espinal.

Ao nível sináptico o microambiente neuronal do PVN é controlado por uma série de *inputs* interoceptivos, humorais, límbicos e intrahipotalâmicos que foram sistemicamente revisados na literatura (Benarroch 2005). No que se refere aos neurotransmissores e neuromoduladores que são liberados no PVN durante a hiperosmolaridade pode-se destacar a angiotensina-II (Chen and Toney 2001), o glutamato (Antunes, Yao et al. 2006) e AVP (Ribeiro, Panizza et al. 2015). Mais recentemente, estudos do nosso laboratório identificou um novo candidato como potencial neurotransmissor: o trifosfato de adenosina (ATP) (Ferreira-Neto, Ribeiro et al. 2017)

### 1.3 NEUROTRANSMISSÃO PURINÉRGICA

O ATP é uma molécula constituída por uma purina, a adenina, ligada a um açúcar, a ribose, conjugada com três radicais fosfato. A hidrólise da ligação do último radical fosfato libera cerca de 7 Kcal/mol de substância que é então usado pela células para o cumprimento de suas funções vitais. No entanto, além de ser fonte primária de energia o ATP e seus derivados também foram identificados como importantes moléculas de sinalização extracelular. Essa conclusão partiu de estudos demonstrando que o nucleotídeo monofosfato de adenosina (AMP) e o nucleosídeo adenosina exerciam efeito cronotrópico negativo no coração e dilatador em vasos coronarianos (Drury and Szent-Györgyi 1929). Anos mais tarde, Pamela Horton demonstrou que o ATP era liberado por nervos sensoriais na orelha de coelhos ao serem estimulados de forma antidrômica (Holton 1959).

Mas somente alguns anos mais tarde que a ideia do ATP como neurotransmissor começou a ser disseminada na literatura, sobretudo a partir das publicações do neurocientista britânico Geoffrey Burnstock que foi presidente do Centro de Neurociência Autônoma da Faculdade de Medicina da *University College London* (UCL).

Em suas primeiras publicações, Burnstock observou por meio de uma preparação de músculo liso intestinal *-taenia coli-* que o estímulo elétrico transmural



provocava hiperpolarização e relaxamento do músculo liso. Além disso, notava-se que a hiperpolarização se cessava com a tetrodotoxina (TTX) que é uma neurotoxina que bloqueia canais de  $\text{Na}^+$  dependentes de voltagem e inibe a condução nervosa sem afetar a atividade muscular lisa. Portanto, sugeria que o estímulo transmural ativava potenciais juncionais inibitórios de nervos que não eram nem adrenérgicos nem colinérgicos (NANC), já que o tecido tinha sido previamente incubado com 6-hidroxi-dopamina e atropina (Burnstock, Campbell et al. 1963).

Em uma série de trabalhos subsequentes, Burnstock e seu grupo de pesquisa observaram que o ATP satisfazia todos os critérios moleculares para a definição desta purina como neurotransmissor, uma vez que era sintetizado e armazenado nos terminais dos nervos NANC e sua liberação ocorria durante a estimulação nervosa por um mecanismo dependente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Além disso, o ATP era inativado por ectoenzimas e tinha sua sinalização bloqueada por um antagonista e, portanto, estes foram critérios que levaram Burnstock a cunhar o termo “sinalização purinérgica” (Burnstock, Campbell et al. 1970, Burnstock 1972). O grupo também demonstrou que o ATP não era apenas liberado pelos nervos NANC, mas também pelos terminais dos nervos simpáticos que inervavam o músculo liso da *taenia coli*. Assim, foi estabelecido que o ATP era co-liberado com a noradrenalina pelos nervos simpáticos (Burnstock 1990).

Ao longo dos anos vários estudos mostraram que diversos estímulos levam a liberação de ATP por células de mamíferos, inclusive alterações no volume celular (Hazama, Shimizu et al. 1999), estresse mecânico (Grygorczyk and Hanrahan 1997), hipóxia/hipercapnia (Marina, Turovsky et al. 2017) ou em resposta ao cAMP (Schwiebert, Egan et al. 1995). Uma vez liberado, o ATP interage com duas classes principais de receptores purinérgicos: os ionotrópicos P2X que apresentam dois domínios transmembranares e os metabotrópicos P2Y com 7 domínios transmembranares (Stojilkovic 2009). Os primeiros são canais iônicos permeáveis ao  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$  e formam sete diferentes subtipos de receptores: P2X<sub>1</sub> ao P2X<sub>7</sub>. Os metabotrópicos formam 8 subtipos: P2Y<sub>1</sub>, P2Y<sub>2</sub>, P2Y<sub>4</sub>, P2Y<sub>6</sub>, P2Y<sub>11</sub>, P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub>, sendo que os quatro primeiros estão acoplados à proteína G<sub>q</sub> e, portanto, quando estimulados ativam fosfolipase C (PLC) para produzirem inositol-trifosfato (IP3) e mobilizar  $\text{Ca}^{2+}$  a partir dos retículos, e os P2Y<sub>12</sub>, P2Y<sub>13</sub>, P2Y<sub>14</sub> se acoplam a

diferentes proteínas G, incluindo a Gs, a Gi e a Gi/o, que ativam distintas cascatas de sinalização intracelular (Stojilkovic 2009).

O ATP extracelular também pode ser metabolizado pelas ectonucleotidases podendo levar em última instância à formação do nucleosídeo adenosina. A adenosina também influencia a atividade celular por meio da sinalização a receptores purinérgicos P1. Estes se apresentam em quatro subtipos: A<sub>1</sub>, A<sub>2A</sub>, A<sub>2B</sub> e A<sub>3</sub>. Os receptores A<sub>1</sub> e A<sub>3</sub> estão acoplados à proteína Gi/o e exercem efeito inibitório, enquanto os receptores A<sub>2A</sub> e A<sub>2B</sub> estão acoplados à proteína Gs e, portanto, são excitatórios (Stojilkovic 2009). A adenosina no eixo hipotálamo-neurohipofisário parece exercer majoritariamente efeito inibitório por meio da sinalização de receptores A<sub>1</sub> (Stojilkovic 2009).

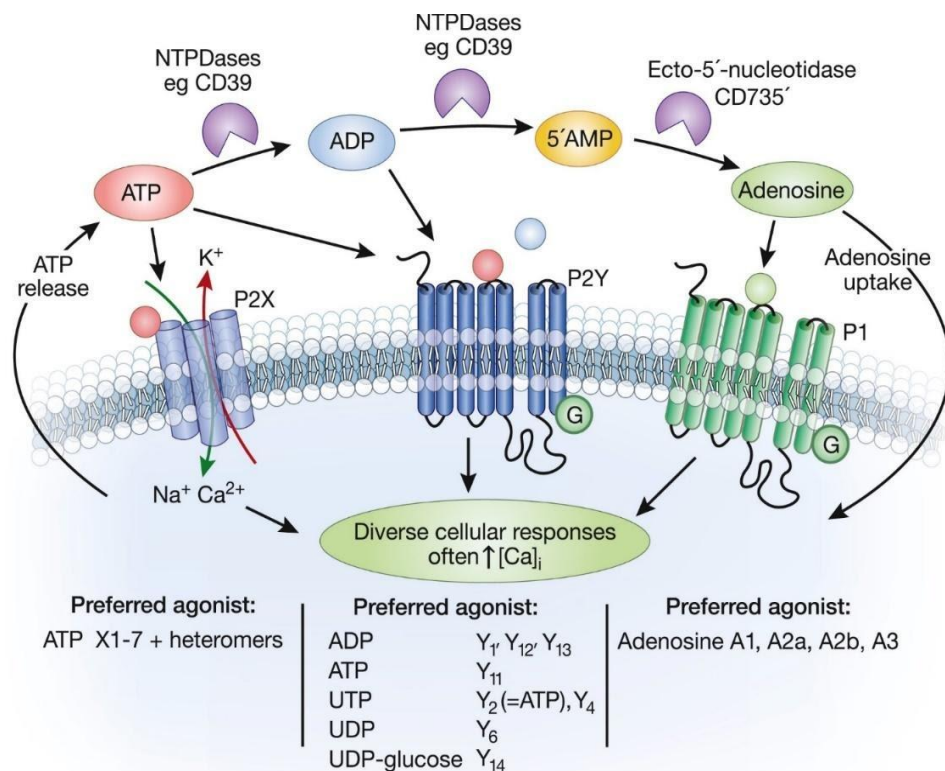
**Tabela 1.** Ectonucleotidases.

Família	Enzimas/gene	Características	Localização no SNC	Substratos	Afinidade (Km, $\mu$ M)	Produtos
E-NTPDases	E-NTPDase 1 (CD39)	Ancorada à	Córtex Cerebral;	NTP e NDP	ATP: 17	NMP + Pi
	E-NTPDase 2 (CD39/L1)	membrana por	Hipotálamo; Bulbo	NTP e NDP	ATP: 70	
	E-NTPDase 3 (CD39/L3)	domínios C	Olfativo; Bulbo (porção	NTP e NDP	ATP: 75	
	E-NTPDase 8	(COOH) e N	ventral e dorsal);		ATP: 81-226	
	E-NTPDase 4 (UDPase -hIALP70)		Membrana Plasmática	NTP e NDP,	UDP, GDP: 200-500	
	E-NTPDase 5 (CD39/L4)	Intracelular	da Microglia;	mas pouco	GDP: 130	
	E-NTPDase 6 (CD39/L2)		Microvasos Cerebrais;	ATP e ADP	-	
E-NTPDase 7 (LALP1)		Parede Lateral do		-		
E-NPPs	E-NPP 1 (PC-1)	Ancorada à	Córtex Cerebral;	NTP e NDP	ATP: 50-500	NMP + Pi + PPI
	E-NPP 2 (Autotaxina)	membrana por	Hipotálamo; Bulbo	ADP-ribose	100	AMP + ribose-5-fosfato
	E-NPP 3 (Gp130 <sup>RB13-6</sup> )	Domínio N-	Olfativo; Bulbo (porção	Lisofosfatidilc	200	Ácido lisofosfatídico
	E-NPP 4	Terminal	ventral e dorsal);	olina		
	E-NPP 5		?	-	-	-
	E-NPP 6					
	E-NPP 7					
Prostatic acid phosphatase	TM-PAP (ACPP isoforma 1)	Transmembrana	Não expressada no	ATP-AMP	?	ADP-Adenosina
	sPAP (ACPP isoforma 2)	Secretada	SNC	ATP-AMP		
Fosfatase Alcalina (AP)	TNAP (Tecido não-específico AP)	Glicofosfatidilino sitol	Hipotálamo; Tálamo;	NTP, NDP, NMP	ATP: 40	Nucleosídeo + Pi
			Bulbo Olfativo; Bulbo (porção ventral e dorsal); Córtex Cerebral;			
-	<b>Ecto-5'-Nucleotidase (CD73)</b>	Glicofosfatidilino sitol	Hipocampo; córtex cingular; cerebelo	NMP	AMP: 1-50	Nucleosídeo + Pi

NMP: Nucleosídeo Monofosfato; NDP: Nucleosídeo Difosfato; NTP: Nucleosídeo Trifosfato; Pi: Fosfato inorgânico; PPI: Pirofosfato inorgânico. Referências: Langer et al. (2008); Zimmermann et al. (2009); Zimmermann et al. (2012); Mathieu (2012); Morandini et al. (2014).

Como é apresentado na tabela 1, as ectonucleotidasas abrangem várias famílias de enzimas que metabolizam o ATP em outros nucleotídeos, como ADP e AMP, e a adenosina. Existem ectonucleotidasas pertencentes às famílias ectonucleosídeo trifosfato difosfoidrolase (E-NTPD), ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase (E-NPP), além da fosfatase alcalina (AP) e da ecto-5'-nucleotidase (E-5'-NT) (Langer, Hammer et al. 2008). Alguns subtipos dentro das famílias E-NTPDases (NTPDase<sub>1,2,3 e 8</sub>) e E-NPP (E-NPP<sub>1 e 3</sub>) hidrolisam moléculas de ATP e adenosina difosfato (ADP) em moléculas de adenosina monofosfato (AMP) resultando em aumento da concentração extracelular de AMP e fosfato inorgânico (Zimmermann, Zebisch et al. 2012). A fosfatases alcalina e a ecto-5'-nucleotidase catalisam as reações de degradação de AMP em adenosina e ambas são ancoradas à membrana celular por meio do glicosilfosfatidilinositol (Zimmermann, Zebisch et al. 2012).

**Figura 3.** Papel das E-NTPDs e E-5'-NT na sinalização purinérgica.



O ATP extracelular pode ser metabolizado pelas NTPDases (ou CD39) levando a formação dos nucleotídeos ADP e AMP. O AMP, por sua vez, pode ser transformado em adenosina pela Ecto-5'-nucleotidase (ou CD735). O ATP e ADP interagem com receptores P2X e P2Y que são essencialmente excitatórios, enquanto a adenosina interage com receptores pré-sinápticos que podem ser tanto excitatórios (A2A e A2B) quanto inibitórios (A1 e A3). Fonte: Menzies et al. (2017)

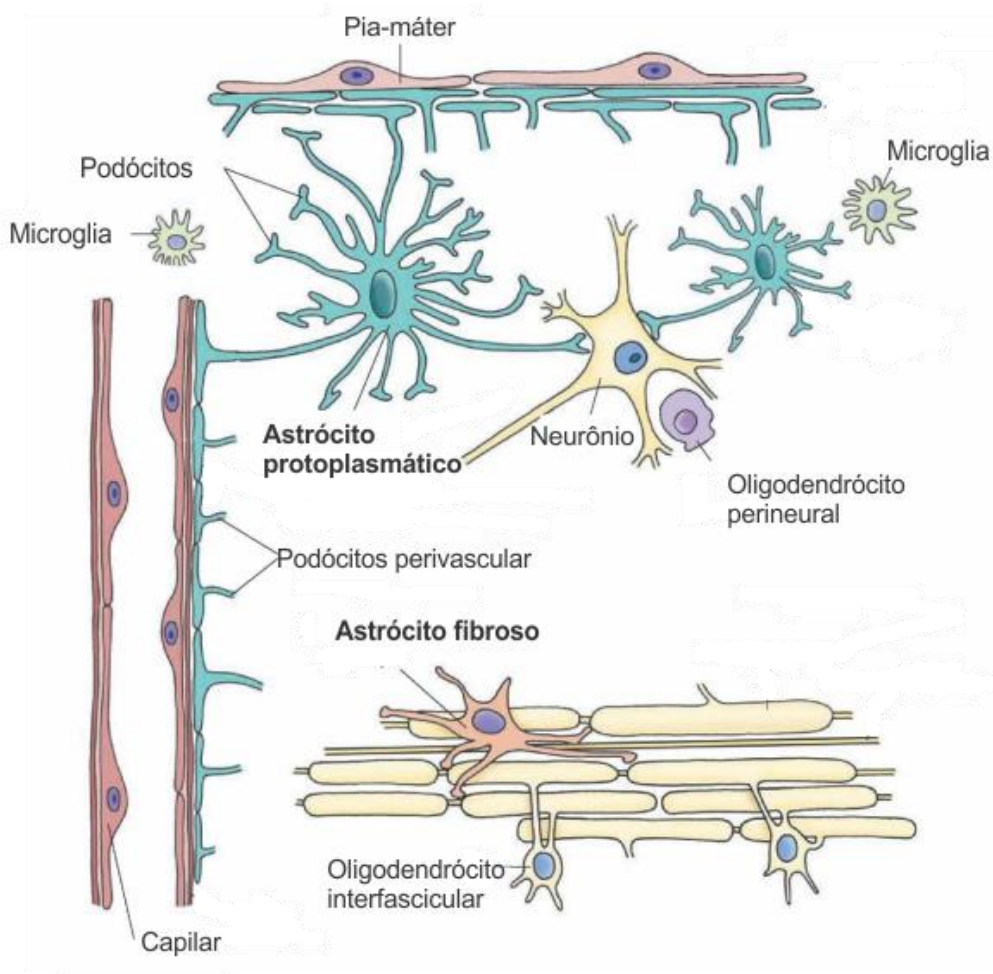
Um outro componente importante que participa da sinalização purinérgica são as células da glia e várias linhas de pesquisa sugerem que os astrócitos podem ser a principal fonte de ATP no SNC (Anderson, Bergher et al. 2003, Coco, Calegari et al. 2003, Hamilton and Attwell 2010, Bohmbach, Schwarz et al. 2018). Este consenso teve como base experimentos iniciais demonstrando que os astrócitos requerem ATP não apenas como substrato energético, mas também como um mensageiro parácrino para a propagação das ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Guthrie, Knappenberger et al. 1999). Nesse contexto, um mecanismo provável para a propagação intercelular de  $\text{Ca}^{2+}$  nos astrócitos seria a liberação de ATP através das conexinas ou hemicanais (Stout, Costantin et al. 2002).

## 1.6 SINALIZAÇÃO PURINÉRGICA EM ASTRÓCITOS

Os astrócitos formam a maioria das células da glia no SNC e de acordo com suas características morfológicas e localização podem ser classificados em duas classes principais: os astrócitos protoplasmáticos, cujos processos citoplasmáticos são mais espessos e numerosos e estão localizados na substância cinzenta, e os astrócitos fibrosos, que apresentam processos citoplasmáticos longos e estreitos e são encontrados principalmente na substância branca. Contudo, vários outros subtipos foram identificados de acordo com a especificidade da região cerebral, incluindo glia de *Bergmann*, glia ependimária, glia marginal, glia radial, glia perivascular, glia velada e tanicitos (Kim, Park et al. 2019).

Estas células desempenham uma função central na homeostase cerebral pois estão envolvidas com a regulação do fluxo sanguíneo local, na constituição da barreira hematoencefálica, dão suporte estrutural e metabólico aos neurônios e também são responsáveis pela captação de glutamato e potássio ( $\text{K}^+$ ) extracelular (Franke, Verkhratsky et al. 2012, Yang, Gao et al. 2013). Além de estabelecerem um ambiente neuroquímico apropriado, os astrócitos podem modular a atividade neuronal por um mecanismo que se inicia com deflagração de ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular acarretando na liberação de gliotransmissores (Hamilton and Attwell 2010).

**Figura 4.** Características morfológicas e localização dos astrócitos protoplasmáticos e fibrosos.



Os astrócitos protoplasmáticos, cujos processos citoplasmáticos são mais espessos e numerosos e estão localizados na substância cinzenta, e os astrócitos fibrosos, que apresentam processos citoplasmáticos longos e estreitos e são encontrados principalmente na substância branca. Disponível em: <http://what-when-how.com/neuroscience/histology-of-the-nervous-system-the-neuron-part-2/>.

Os astrócitos estão ativamente envolvidos na modulação de sinalização neuronal. Essas células juntamente com os neurônios formam a sinapse tripartite, sendo que um único astrócito no cérebro humano pode, dentro de seu domínio, acomodar até 2 milhões de sinapses (Hol and Pekny 2015). A função dos astrócitos na liberação de gliotransmissores emergiu a partir de estudos demonstrando que o glutamato podia evocar ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular em cultura *in vitro* de astrócitos (Cornell-Bell, Finkbeiner et al. 1990) e que estas ondas podiam ser propagadas entre os astrócitos por meio de junções comunicantes, elevando inclusive a concentração intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  em neurônios adjacentes (Nedergaard 1994).

Estudos subsequentes demonstraram que o glutamato liberado por terminais neuronais também evocava ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  em astrócitos que, por sua vez, estimulava a liberação glial de glutamato, como uma alça de *feedback* positivo que potencializa o efeito excitatório deste transmissor (Porter and McCarthy 1996). Outros gliotransmissores foram identificados ao longo dos anos incluindo a D-serina (Mothet, Pollegioni et al. 2005), a taurina (Kimmelberg, Goderie et al. 1990), o lactato (Tang, Lane et al. 2014), o ácido gama-aminobutírico (GABA) (Kozlov, Angulo et al. 2006), e o ATP (Guthrie, Knappenberger et al. 1999).

Os mecanismos da liberação glial de ATP bem como de outros gliotransmissores podem ser classificados em dois grupos: (1) mecanismos não-exocitóticos, que envolvem difusão através de canais iônicos regulados por volume (VRAC), por hemicanais, através do receptor purinérgico  $\text{P2X}_7$  e por meio de transportadores de aminoácidos excitatórios (EAATs); e (2) exocitótico, o qual envolve o acúmulo de ATP nas vesículas sinápticas e subsequente inserção na membrana plasmática guiada pelas proteínas que formam o complexo SNARE (Hamilton and Attwell 2010).

Um importante avanço nos estudos sobre a interação entre os neurônios e a glia no SNC ocorreu a partir da criação do modelo animal experimental com camundongos transgênicos que expressam proteína vesicular SNARE dominante negativa (dn-SNARE) (Pascual, Casper et al. 2005). Neste modelo experimental a proteína dn-SNARE é expressa no citosol dos astrócitos e interfere na formação do complexo SNARE entre a proteína sinaptobrevina (VAMP3), presente na membrana vesicular, com as proteínas associadas à membrana plasmática - syntaxina e sinaptosomal (SNAP-23). A dn-SNARE se liga à syntaxina e a SNAP-23 competindo o sítio de ligação com a VAMP3, impedindo a ancoragem e a fusão de vesículas carregadas com gliotransmissores na membrana plasmática dos astrócitos.

A interferência na formação do complexo SNARE e na fusão de vesículas na membrana plasmática de astrócitos passou a ser possível inclusive em estudos realizados em ratos (Sheikhbahaei, Turovsky et al. 2018). A possibilidade é dada pela microinjeção de vetores virais no SNC que direcionam a expressão da proteína dn-SNARE sobre o sítio promotor GFAP, tornando a expressão seletiva em astrócitos. Esta abordagem, por sua vez, exerce uma vantagem sobre à transgenia por

possibilitar o estudo da gliotransmissão em regiões cerebrais específicas, e não no SNC em sua totalidade. Este método foi utilizado recentemente em dois estudos que demonstraram pela primeira vez que os astrócitos localizados na superfície ventral do bulbo liberam gliotransmissores, sobretudo o ATP, que exercem um papel importante no controle da respiração (Sheikhabaei, Turovsky et al. 2018), bem como na regulação do fluxo sanguíneo cerebral (Marina, Christie et al. 2020).

#### 1.4 NEUROTRANSMISSÃO PURINÉRGICA NO PVN

Nas últimas cinco décadas a sinalização purinérgica se tornou um aspecto importante na neurotransmissão em muitos núcleos encefálicos envolvidos em diferentes condições fisiopatológicas (Burnstock 2007), influenciando inclusive respostas autonômicas e neuroendócrinas ao nível do PVN (Knott, Marrero et al. 2008, Cruz, Bonagamba et al. 2010, Ferreira-Neto, Yao et al. 2013).

A contribuição do nosso laboratório começou a partir de 2013 quando foi demonstrado que a administração exógena de ATP no PVN promovia aumento dose-dependente da atividade do nervo simpático lombar em ratos (Ferreira-Neto, Yao et al. 2013). Curiosamente, o antagonismo local de tanto dos receptores purinérgicos do tipo P2 (com administração de PPADS) bem como dos receptores não-NMDA (AMPA/Kainato) para glutamato (com CNQX) atenuaram a simpato-excitação, sugerindo, portanto, a existência de uma interação purino-glutamatérgica (Ferreira-Neto, Yao et al. 2013).

Posteriormente, estudos mais detalhados dos mecanismos ao nível sináptico por meio da técnica de eletrofisiologia de registro neuronal *whole-cell patch clamp* foi demonstrado que o ATP exógeno elevava a frequência de potenciais de ação dos neurônios do PVN que se projetavam para o RVLM e, além disso, aumentava as correntes de entrada mediadas via ativação dos receptores AMPA por um mecanismo que dependia de  $Ca^{2+}$  intracelular (Ferreira-Neto, Antunes et al. 2015). Contudo, havia ainda uma questão importante a ser respondida sobre em qual condição fisiológica poderia envolver a liberação endógena do ATP no microambiente neuronal do PVN?

Os autores notaram que os neurônios do PVN identificados com projeção direta ao RVLM, ao serem expostos em meio com solução hipertônica (manitol 1%) exibiam um aumento similar da amplitude das correntes de entrada via ativação dos receptores

AMPA, e o PPADS normalizava este efeito (Ferreira-Neto, Antunes et al. 2015). Surgia-se então o primeiro indicativo que o ATP poderia ser liberado no PVN durante um desafio hiperosmótico e mais ainda, que esses neurônios hipotalâmicos tinham conexões diretas com o tronco-encefálico, como parte de uma via integrativa neuronal autonômica.

Na sequência dos estudos, experimentos mais recentes demonstraram que o estímulo hiperosmótico agudo com solução hipertônica de NaCl (3M) ou manitol (10%), injetadas intravenosamente em animais experimentais, promoveu uma intensa ativação em neurônios do PVN, identificados pela imunomarcagem da proteína FOS e grande parte desses neurônios eram purinérgicos, pois expressavam receptores P2X<sub>2</sub>. Além disso, no mesmo conjunto de experimentos foi demonstrado que a simpatoexcitação decorrente do estímulo hiperosmótico foi significativamente atenuada pelo antagonismo dos receptores P2 do PVN com o uso de PPADS (Ferreira-Neto, Ribeiro et al. 2017).

Embora os estudos acima conectam diretamente a hiperosmolaridade com ativação de vias purinérgicas em neurônios do PVN e respostas simpatoexcitórias, é importante destacar que todos os experimentos até então foram feitos com desafio osmótico agudo, mas nenhum, que seja do nosso conhecimento, havia ainda demonstrado se a sobrecarga de sal ao longo do tempo induziria de fato a liberação de ATP no PVN e se essa purina teria alguma função importante na hipertensão induzida por sal. Ademais, uma pergunta relevante que norteou o desenvolvimento do presente estudo foi sobre a origem e qual(s) mecanismo(s) envolvido(s) na liberação de ATP no ambiente neuronal do PVN na hipertensão induzida por sobrecarga de sal.

Dessa forma, aventamos em primeiro lugar a hipótese de que a sobrecarga de sal poderia estimular o acúmulo de ATP no PVN como resultado de uma falha das ectonucleotidases em hidrolisar o ATP em adenosina. No entanto, alternativamente seria possível que a sobrecarga de sal também estimulasse os astrócitos do PVN a liberarem ATP, levando como consequência a ativação dos neurônios do PVN.

Para responder tais questões, foi concedido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) uma Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) que nos possibilitou trabalhar em parceria com o Professor Alexander V. Gourine, em seu laboratório no Departamento de Neurociência, Fisiologia e



Farmacologia da *University College London* (UCL) entre outubro de 2018 à outubro de 2019. Avaliamos em primeiro lugar a liberação glial de ATP e adenosina utilizando biossensores que detectam em tempo real a presença destas purinas em fatias coronais do hipotálamo incluindo o PVN. Numa etapa subsequente investigamos se a sobrecarga de sal ativaria os astrócitos do PVN bem como de outras regiões cerebrais, como no córtex e no hipocampo. Por fim, também exploramos se as vias não-excitóticas astrocíticas (como conexinas e receptores P2X7) bem como excitóticas, por meio da expressão viral da proteína SNARE dominante negativa (dn-SNARE) no citosol dos astrócitos do PVN, poderiam estar envolvidas com a liberação glial de ATP nesse microambiente neuronal.

## **6. CONCLUSÃO**

Nossos resultados mostram que a sobrecarga de sal dada pelo suprimento de solução hipertônica com NaCl 2% não afeta a atividade das ectonucleotidases, mas estimula os astrócitos do PVN a liberarem ATP por uma via excitatória.

## REFERÊNCIAS

- Abdala, A. P., F. D. McBryde, N. Marina, E. B. Hendy, Z. J. Engelman, M. Fudim, P. A. Sobotka, A. V. Gourine and J. F. R. Paton (2012). "Hypertension is critically dependent on the carotid body input in the spontaneously hypertensive rat." The Journal of Physiology **590**(17): 4269-4277.
- Anderson, C. M., J. P. Bergher and R. A. Swanson (2003). "ATP-induced ATP release from astrocytes." Journal of Neurochemistry **88**(1): 246-256.
- Antunes, V. R., S. T. Yao, A. E. Pickering, D. Murphy and J. F. R. Paton (2006). "A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation." The Journal of Physiology **576**(2): 569-583.
- Antunes, V. R., S. T. Yao, A. E. Pickering, D. Murphy and J. F. R. Paton (2006). "A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation." The Journal of Physiology **576**(2): 569-583.
- Azar, S., P. Ernsberger, S. Livingston and P. Azar (1981). "Paraventricular-suprachiasmatic lesions prevent salt-induced hypertension in Dahl rats " Clinical Science **61**(7): 49-51.
- Benarroch, E. E. (2005). "Paraventricular nucleus, stress response, and cardiovascular disease." Clinical Autonomic Research **15**(4): 254-263.
- Bohmbach, K., M. K. Schwarz, S. Schoch and C. Henneberger (2018). The structural and functional evidence for vesicular release from astrocytes in situ, Elsevier Inc. **136**: 65-75.
- Bourque, C. W. (2008). "Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation." Nature Reviews Neuroscience **9**: 519-531.
- Brody, M. J. and A. K. Johnson (1979). "Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation, and hypertension." Frontiers in Endocrinology **6**: 249-292.
- Burnstock, G. (1972). "Purinergetic nerves." Pharmacological Reviews **24**: 509-581.
- Burnstock, G. (1990). "Noradrenaline and ATP as cotransmitters in sympathetic nerves." Neurochemistry International **17**(2): 357-368.
- Burnstock, G. (2007). "Physiology and pathophysiology of purinergetic neurotransmission." Physiological reviews **87**(2): 659-797.
- Burnstock, G., G. Campbell, M. Bennett and M. E. Holman (1963). "Inhibition of the smooth muscle of the taenia coli." Nature **200**(4906): 581-582.

- Burnstock, G., G. Campbell, D. Satchell and A. Smythe (1970). "Evidence that adenosine triphosphate or a related nucleotide is the transmitter substance released by non-adrenergic inhibitory nerves in the gut." British Journal of Pharmacology **40**(4): 668–688.
- Busnardo, C., N. C. Ferreira-Junior, J. C. Cruz, B. H. Machado, F. M. Correa and L. B. Resstel (2013). "Cardiovascular responses to ATP microinjected into the paraventricular nucleus are mediated by nitric oxide and NMDA glutamate receptors in awake rats." Exp Physiol **98**(10): 1411-1421.
- Chen, Q. H. and G. M. Toney (2001). "AT1-receptor blockade in the hypothalamic PVN reduces central hyperosmolality-induced renal sympathoexcitation." American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **281**(6): 1844-1853.
- Choe, K. Y., S. Y. Han, P. Gaub, B. Shell, D. L. Voisin, B. A. Knapp, P. A. Barker, C. H. Brown, J. T. Cunningham and C. W. Bourque (2015). "High Salt Intake Increases Blood Pressure via BDNF-Mediated Downregulation of KCC2 and Impaired Baroreflex Inhibition of Vasopressin Neurons." Neuron **85**(3): 549-560.
- Coco, S., F. Calegari, E. Pravettoni, D. Pozzi, E. Taverna, P. Rosa, M. Matteoli and C. Verderio (2003). "Storage and release of ATP from astrocytes in culture." Journal of Biological Chemistry **278**(2): 1354-1362.
- Colwell, C. S. (2010). "Preventing dehydration during sleep." Nature Neuroscience **13**(4): 403-404.
- Cornell-Bell, A. H., S. M. Finkbeiner, M. S. Cooper and S. J. Smith (1990). "Glutamate induces calcium waves in cultured astrocytes: long-range glial signaling." Science **247**(4941): 470-473.
- Cruz, J. C., L. G. H. Bonagamba and B. H. Machado (2010). "Modulation of arterial pressure by P2 purinoceptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of awake rats." Autonomic Neuroscience **158**(1): 79-85.
- Dahl, L. K. (1960). "Possible role of salt intake in the development of essential hypertension." Essential hypertension, Springer, Berlin, Heidelberg: 53-65.
- Dahl, L. K., M. Heine and L. Tassinari (1962). "Role of genetic factors in susceptibility to experimental hypertension due to chronic excess salt ingestion." Nature **194**(4827): 480-482.
- Dahl, L. K., M. Heine and K. Thompson (1972). "Genetic influence of renal homografts on the blood pressure of rats from different strains." Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine **140**(3): 852-856.

Dahl, L. K., K. D. Knudsen, M. Heine and G. Leitl (1967). "Effects of chronic excess salt ingestion: Genetic influence on the development of salt hypertension in parabiotic rats: Evidence for a humoral factor." The Journal of Experimental Medicine **126**(4): 687-699.

De Luca Jr, L. A., J. V. Menani and A. K. Johnson (2013). Neurobiology of body fluid homeostasis: transduction and integration, CRC Press.

DiNicolantonio, J. J. and P. J. H. O'Keefe (2017). "The History of the Salt Wars." The American journal of medicine **130**(9): 1011-1014.

Drury, A. N. and A. Szent-Györgyi (1929). "The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart." The Journal of physiology **68**(3): 213-237.

Elgot, A., O. El Hiba and H. Gamrani (2012). "Structural and neurochemical plasticity in both supraoptic and paraventricular nuclei of hypothalamus of a desert rodent *Meriones shawi* after a severe dehydration versus opposite treatment by rehydration: GFAP and vasopressin immunohistochemical study." Neurosci Lett **515**(1): 55-60.

Faraco, G., D. Brea, L. Garcia-Bonilla, G. Wang, G. Racchumi, H. Chang, I. Buendia, M. M. Santisteban, S. G. Segarra, K. Koizumi, Y. Sugiyama, M. Murphy, H. Voss, J. Anrather and C. Iadecola (2018). "Dietary salt promotes neurovascular and cognitive dysfunction through a gut-initiated TH17 response." Nat Neurosci **21**(2): 240-249.

Ferreira-Neto, H. C., V. R. Antunes and J. E. Stern (2015). "ATP STIMULATES RAT HYPOTHALAMIC SYMPATHETIC NEURONS BY ENHANCING AMPA RECEPTOR-MEDIATED CURRENTS." Journal of Neurophysiology **jn-01011**.

Ferreira-Neto, H. C., I. M. R. Ribeiro, T. Moreira, S. Yao and V. R. Antunes (2017). "Purinergic P2 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus are involved in hyperosmotic-induced sympathoexcitation." Neuroscience **349**: 253-263.

Ferreira-Neto, H. C., I. M. R. Ribeiro, T. S. Moreira, S. T. Yao and V. R. Antunes (2017). "Purinergic P2 receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus are involved in hyperosmotic-induced sympathoexcitation." Neuroscience **349**: 253-263.

Ferreira-Neto, H. C., S. T. Yao and V. R. Antunes (2013). "Purinergic and glutamatergic interactions in the hypothalamic paraventricular nucleus modulate sympathetic outflow." Purinergic signalling **9**(3): 337-349.

Franke, H., A. Verkhratsky, G. Burnstock and P. Illes (2012). "Pathophysiology of astroglial purinergic signalling." Purinergic Signalling **8**(3): 629–657.

Frieden, T. R. and M. G. Jaffe (2018). "Saving 100 million lives by improving global treatment of hypertension and reducing cardiovascular disease risk factors." The Journal of Clinical Hypertension **20**(2): 208-211.

Friedman, R., L. M. Tassinari, M. Heine and J. Iwai (1979). "Differential development of salt-induced and renal hypertension in Dahl hypertension-sensitive rats after neonatal sympathectomy." Clinical and Experimental Hypertension **1**(6): 779-799.

Gamrani, H., A. Elgot, O. El Hiba and M. Fèvre-Montange (2011). "Cellular plasticity in the supraoptic and paraventricular nuclei after prolonged dehydration in the desert rodent *Meriones shawi*: Vasopressin and GFAP immunohistochemical study." Brain Res **1375**: 85-92.

Ganguli, M., L. Tobian and J. Iwai (1979). "Cardiac output and peripheral resistance in strains of rats sensitive and resistant to NaCl hypertension." Hypertension **1**(1): 3-7.

Geerling, J. C., J.-W. Shin, P. C. Chimenti and A. D. Loewy (2010). "Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem." Journal of Comparative Neurology **518** (9): 1460-1499.

Geerling, J. C., J.-W. Shin, P. C. Chimenti and A. D. Loewy (2010). "Paraventricular Hypothalamic Nucleus: Axonal Projections to the Brainstem." The Journal of Comparative Neurology **518**(9): 1460 –1499.

Gizowski, C. and C. W. Bourque (2018). "The neural basis of homeostatic and anticipatory thirst." Nature Reviews Nephrology **14**(1): 11-25.

Gomes, P. M., R. W. M. Sá, G. L. Aguiar, M. H. S. Paes, A. C. Alzamora, W. G. Lima, L. B. d. Oliveira, S. D. Stocker, V. R. Antunes and L. M. Cardoso (2017). "Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats." Scientific Reports **7**(1): 1-14.

Gordon, F. J., H. Matsuguchi and A. L. Mark (1981). "Abnormal Baroreflex Control of Heart Rate in Prehypertensive and Hypertensive Dahl Genetically Salt-Sensitive Rats." Hypertension **3**(pt 2): 135-141.

Goto, A., T. Ikeda, L. Tobian, J. Iwai and M. A. Johnson (1981). "Brain lesions in the paraventricular nuclei and catecholaminergic neurons minimize salt hypertension in Dahl salt-sensitive rats." Clinical Science **61**: 53-55.

Gourine, A. V., E. V. Melenchuk, D. M. Poputnikov, V. N. Gourine and K. M. Spyer (2002). "Involvement of purinergic signalling in central mechanisms of body temperature regulation in rats." Br J Pharmacol **135**(8): 2047-2055.

Grygorczyk, R. and J. W. Hanrahan (1997). "CFTR-independent ATP release from epithelial cells triggered by mechanical stimuli." American Journal of Physiology - Cell Physiology **272**(3 41-3).

Gu, J. W., A. P. Bailey, W. Tan, M. Shparago and E. Young (2008). "Long-term High Salt Diet Causes Hypertension and Decreases Renal Expression of Vascular Endothelial Growth Factor in Sprague-Dawley Rats." J Am Soc Hypertens **2**(4): 275-285.

Guo, L., J. Menga, C. Xuan, J. Geb, W. Sun, S. T.O'Rourke and C. Sun (2015). "High salt-diet reduces SLC14A1 gene expression in the choroid plexus of Dahl salt sensitive rats." Biochemical and Biophysical Research Communications **461**(2): 254-259.

Guthrie, P. B., J. Knappenberger, M. Segal, M. V. L. Bennett, A. C. Charles and S. B. Kater (1999). "ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves." The Journal of neuroscience **19**(2): 520-528.

Guthrie, P. B., J. Knappenberger, M. Segal, M. V. L. Bennett, A. C. Charles and S. B. Kater (1999). "ATP Released from Astrocytes Mediates Glial Calcium Waves." Journal of Neuroscience **19**(2): 520-528.

Guyenet, P. G., R. L. Stornetta, G. Bochorishvili, S. D. DePuy, P. G. Burke and S. B. Abbott (2013). "C1 neurons: the body's EMTs." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **305**(3): R187-R204.

Guyton, A. C. (1980). "Circulatory Physiology III: Arterial Pressure and Hypertension." WB Saunders, Philadelphia.

Guyton, A. C., T. G. Coleman, A. W. Cowley, K. W. Scheel, R. D. Manning and R. A. Norman (1972). "Arterial pressure regulation: Overriding dominance of the kidneys in long-term regulation and in hypertension." The American Journal of Medicine **52**(5): 584-594.

Hamilton, N. B. and D. Attwell (2010). "Do astrocytes really exocytose neurotransmitters?" Nature Reviews Neuroscience **11**(4): 227-238.

Hashmat, S., N. Rudemiller, H. Lund, J. M. Abais-Battad, S. V. Why and D. L. Mattson (2016). "Interleukin-6 inhibition attenuates hypertension and associated renal damage in Dahl salt-sensitive rats." American Journal of Physiology - Renal Physiology **311**(3): 555-561.

Hazama, A., T. Shimizu, Y. Ando-Akatsuka, S. Hayashi, S. Tanaka, E. Maeno and Y. Okada (1999). "Swelling-induced, CFTR-independent ATP release from a human epithelial cell line. Lack of correlation with volume-sensitive Cl<sup>-</sup> channels." Journal of General Physiology **114**(4): 525-533.

Hol, E. M. and M. Pekny (2015). "Glial fibrillary acidic protein (GFAP) and the astrocyte intermediate filament system in diseases of the central nervous system." Current opinion in cell biology **32**: 121-130.

Holton, P. (1959). "The liberation of adenosine triphosphate on antidromic stimulation of sensory nerves." The Journal of Physiology **145**(3): 494-504.

Huang, B. S., B. N. V. Vliet and F. H. H. Leenen (2004). "Increases in CSF [Na<sup>+</sup>] precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high-salt diet." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **287**: 160-166.

Intersalt (1988). "Intersalt Cooperative Research Group. "Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24 hour urinary sodium and potassium excretion."." BMJ: British Medical Journal: 319-328.

Japundzic, N., M.-L. Grichois, P. Zitoun and D. Laude (1990). "Spectral analysis of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of autonomic blockers." Journal of the Autonomic Nervous System **30**: 91-100.

Julien, C. (2006). "The enigma of Mayer waves: Facts and models." Cardiovascular Research **70**(1): 12-21.

Kim, Y., J. Park and Y. K. Choi (2019). "The Role of Astrocytes in the Central Nervous System Focused on BK Channel and Heme Oxygenase Metabolites: A Review." Antioxidants **8**(5): 121.

Kimelberg, H. K., S. K. Goderie, S. Higman, S. Pang and R. A. Waniewski (1990). "Swelling-induced release of glutamate, aspartate and taurine from astrocyte cultures." Journal of Neuroscience **10**(5): 1583-1591.

King, A. J., J. W. Osborn and G. D. Fink (2007). "Splanchnic circulation is a critical neural target in angiotensin II salt hypertension in rats." Hypertension **50**(3): 547-556.

Kinsman, B. J., K. N. Browning and S. D. Stocker (2017). "NaCl and osmolarity produce different responses in organum vasculosum of the lamina terminalis neurons, sympathetic nerve activity and blood pressure." The Journal of Physiology **595**(18): 6187–6201.

Kinsman, B. J., H. N. Nation and S. D. Stocker (2017). "Hypothalamic Signaling in Body Fluid Homeostasis and Hypertension." Current Hypertension Reports **6**(19): 1-9.

Knott, T. K., H. G. Marrero, E. E. Custer and J. R. Lemos (2008). "Endogenous ATP potentiates only vasopressin secretion from neurohypophysial terminals." Journal of Cellular Physiology **217**(1): 155–161.



Kozlov, A. S., M. C. Angulo, E. Audinat and S. Charpak (2006). "Target cell-specific modulation of neuronal activity by astrocytes." Proceedings of the National Academy of Sciences **103**(26): 10058-10063.

Langer, D., K. Hammer, P. Koszalka, J. Schrader, S. Robson and H. Zimmermann (2008). "Distribution of ectonucleotidases in the rodent brain revisited." Cell and Tissue Research **334**(2): 199-217.

Li, D.-P., S.-R. Chen and H.-L. Pan (2010). "Adenosine inhibits paraventricular pre-sympathetic neurons through ATP-dependent potassium channels." Journal of Neurochemistry **113**(2): 530-542.

Li, K., H. Rüdiger and T. Ziemssen (2019). "Spectral Analysis of Heart Rate Variability: Time Window Matters." Frontiers in Neurology **10**(545): 1-12.

Li, L., A. Lundkvist, D. Andersson, U. Wilhelmsson, N. Nagai, A. C. Pardo, C. Nodin, A. Ståhlberg, K. Aprico and K. Larsson (2008). "Protective role of reactive astrocytes in brain ischemia." Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism **28**(3): 468-481.

Ludwig, M. and G. Leng (2006). "Dendritic peptide release and peptide-dependent behaviours." Nat Rev Neurosci **7**(2): 126-136.

MacGregor, G. A. and H. E. d. Wardener (1998). "Salt, Diet and Health."

Marina, N., R. Ang, A. Machhada, V. Kasymov, A. Karagiannis, P. S. Hosford, V. Mosienko, A. G. Teschemacher, P. Vihko, J. F. R. Paton, S. Kasparov and A. V. Gourine (2015). "Brainstem Hypoxia Contributes to the Development of Hypertension in the Spontaneously Hypertensive Rat." Hypertension **65**(4): 775-783.

Marina, N., I. N. Christie, A. Korsak, M. Doronin, A. Brazhe, P. Hosford, J. Wells, S. Sheikhabaei, I. Humoud, J. F. R. Paton, M. F. Lythgoe, A. Semyanov, S. Kasparov and A. V. Gourine (2020). "Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow." Nature Communications **9**(11): 131.

Marina, N., I. N. Christie, A. Korsak, M. Doronin, A. Brazhe, P. Hosford, J. Wells, S. Sheikhabaei, I. Humoud, J. F. R. Paton, M. F. Lythgoe, A. Semyanov, S. Kasparov and A. V. Gourine (2020). "Astrocytes monitor cerebral perfusion and control systemic circulation to maintain brain blood flow." Nature Communications **9**(11): 131-131.

Marina, N., E. Turovsky, I. N. Christie, P. S. Hosford, A. Hadjihambi, A. Korsak, R. Ang, S. Mastitskaya, S. Sheikhabaei, S. M. Theparambil and A. V. Gourine (2017). "Brain metabolic sensing and metabolic signaling at the level of an astrocyte." Glia.

- McKinley, M., D. Denton and R. Weisinger (1978). "Sensors for antidiuresis and thirst—osmoreceptors or CSF sodium detectors?" Brain research **141**(1): 89-103.
- Mills, N. J., K. Sharma, K. Huang and R. Teruyama (2018). "Effect of dietary salt intake on epithelial Na<sup>+</sup> channels (EN aCs) in the hypothalamus of Dahl salt-sensitive rats." Physiological reports **6**(16): e13838.
- Moreira, J. D., P. Chaudhary, A. A. Frame, F. Puleo, K. M. Nist, E. A. Abkin, T. L. Moore, J. C. George and R. D. Wainford (2019). "Inhibition of microglial activation in rats attenuates paraventricular nucleus inflammation in Gai2 protein-dependent, salt-sensitive hypertension." Experimental physiology **104**(12): 1892-1910.
- Mori, M., H. Tsushima and T. Matsuda (1994). "Antidiuretic effects of ATP induced by microinjection into the hypothalamic supraoptic nucleus in water-loaded and ethanol-anesthetized rats." Jpn J Pharmacol **66**(4): 445-450.
- Mothet, J.-P., L. Pollegioni, G. Ouanounou, M. Martineau, P. Fossier and G. Baux (2005). "Glutamate receptor activation triggers a calcium-dependent and SNARE protein dependent release of the gliotransmitter D-serine." Proceedings of the National Academy of Sciences **102**(15): 5606-5611.
- Nedergaard, M. (1994). "Direct Signaling from Astrocytes to Neurons in Cultures of Mammalian Brain Cells." Science **263**(5154): 1768-1771.
- Noda, M. and H. Sakuta (2013). "Central regulation of body-fluid homeostasis." Trends in Neurosciences - Cell Press **36**(11): 661-673.
- Nomura, K., T. Y. Hiyama, H. Sakuta, T. Matsuda, C.-H. Lin, K. Kobayashi, K. Kobayashi, T. Kuwaki, K. Takahashi, S. Matsui and M. Noda (2019). "[Na<sup>+</sup>] Increases in Body Fluids Sensed by Central Nax Induce Sympathetically Mediated Blood Pressure Elevations via H<sup>+</sup>-Dependent Activation of ASIC1a." Neuron **101**: 1-16.
- Parati, G., J. P. Saul, M. Di Rienzo and G. Mancia (1995). "Spectral Analysis of Blood Pressure and Heart Rate Variability in Evaluating Cardiovascular Regulation." Hypertension **25**(6): 1276-1286.
- Pascual, O., K. B. Casper, C. Kubera, J. Zhang, R. Revilla-Sanchez, J.-Y. Sul, H. Takano, S. J. Moss, K. McCarthy and P. G. Haydon (2005). "Astrocytic Purinergic Signaling Coordinates Synaptic Networks." Science **310**(5745): 113-116.
- Porter, J. T. and K. D. McCarthy (1996). "Hippocampal Astrocytes In Situ Respond to Glutamate Released from Synaptic Terminals." The Journal of Neuroscience **16**(16): 5073-5081.
- Powles, J., S. Fahimi, R. Micha, S. Khatibzadeh, P. Shi, M. Ezzati, R. E. Engell, S. S. Lim, G. Danaei and D. Mozaffarian (2003). "Global, regional and national sodium

intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide." BJM Open **3**(12).

Powles, J., S. Fahimi, R. Micha, S. Khatibzadeh, P. Shi, M. Ezzati, R. E. Engell, S. S. Lim, G. Danaei and D. Mozaffarian (2013). "Global, regional and national sodium intakes in 1990 and 2010: a systematic analysis of 24 h urinary sodium excretion and dietary surveys worldwide." BJM Open **3**(12).

Ribeiro, N., H. d. N. Panizza, K. M. d. Santos, H. C. Ferreira-Neto and V. R. Antunes (2015). "Salt-induced sympathoexcitation involves vasopressin V1a receptor activation in the paraventricular nucleus of the hypothalamus." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **309**(11): 1369-1379.

Ribeiro, N., R. W. M. Sá and V. R. Antunes (2020). "Depletion of C1 Neurons Attenuates the Salt-Induced Hypertension in Unanesthetized Rats." Brain Research: 147107.

Rodrigues, S. L., P. R. Souza Júnior, E. B. Pimentel, M. P. Baldo, D. C. Malta, J. G. Mill and C. L. Szwarcwald (2015). "Relationship between salt consumption measured by 24-h urine collection and blood pressure in the adult population of Vitória (Brazil)." Braz J Med Biol Res **48**(8): 728-735.

Sakuta, H., E. Nishihara, T. Y. Hiyama, C. H. Lin and M. Noda (2016). "Nax signaling evoked by an increase in [Na<sup>+</sup>] in CSF induces water intake via EET-mediated TRPV4 activation." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **311**(2): R299-306.

Schmidt-Pogoda, A., J. K. Strecker, M. Liebmann, C. Massoth, C. Beuker, U. Hansen, S. König, S. Albrecht, S. Bock, J. Breuer, C. Sommer, N. Schwab, H. Wiendl, L. Klotz and J. Minnerup (2018). "Dietary salt promotes ischemic brain injury and is associated with parenchymal migrasome formation." PLoS One **13**(12): e0209871.

Schwiebert, E. M., M. E. Egan, T. H. Hwang, S. B. Fulmer, S. S. Allen, G. R. Cutting and W. B. Guggino (1995). "CFTR regulates outwardly rectifying chloride channels through an autocrine mechanism involving ATP." Cell **81**(7): 1063-1073.

Sharma, K., M. Haque, R. Guidry, Y. Ueta and R. Teruyama (2017). "Effect of dietary salt intake on epithelial Na<sup>+</sup>." J Physiol **595**(17): 5857-5874.

Sheikhabaei, S., E. A. Turovsky, P. S. Hosford, A. Hadjihambi, S. M. Theparambil, B. Liu, N. Marina, A. G. Teschemacher, S. Kasparov, J. C. Smith and A. V. Gourine (2018). "Astrocytes modulate brainstem respiratory rhythm-generating circuits and determine exercise capacity." Nature Communications **9**(1): 370.

Sheikhabahaei, S., E. A. Turovsky, P. S. Hosford, A. Hadjihambi, S. M. Theparambil, B. Liu, N. Marina, A. G. Teschemacher, S. Kasparov, J. C. Smith and A. V. Gourine (2018). "Astrocytes modulate brainstem respiratory rhythm-generating circuits and determine exercise capacity." Nature Communications **9**(1): 370-370.

Simmonds, S. S., J. Lay and S. D. Stocker (2014). "Dietary salt intake exaggerates sympathetic reflexes and increases blood pressure variability in normotensive rats." Hypertension **64**(3): 583-589.

Souza, M., F. Vechiato, L. Debarba, R. Leao, M. Dias, A. Pereira, J. Cruz, L. Elias, J. Antunes-Rodrigues and S. Ruginsk (2020). "Effects of hyperosmolality on hypothalamic astrocytic area, mRNA expression and glutamate balance in vitro." Neuroscience.

Stojilkovic, S. S. (2009). "Purinergic regulation of hypothalamopituitary functions." Trends in Endocrinology and Metabolism **20**(9): 460-468.

Stout, C. E., J. L. Costantin, C. C. Naus and A. C. Charles (2002). "Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels." Journal of Biological Chemistry **277**(12): 10482-10488.

Suadicani, S. O., C. F. Brosnan and E. Scemes (2006). "P2X7 receptors mediate ATP release and amplification of astrocytic intercellular Ca<sup>2+</sup> signaling." Journal of Neuroscience **26**(5): 1378-1385.

Sá, R. W. M., A. S. Haibara, P. M. Gomes, G. L. Aguiar, R. S. L. Nascimento, M. L. Pedrosa, A. C. Alzamora, L. B. d. Oliveira and L. M. Cardoso (2017). "Changes in cardiovascular responses to chemoreflex activation of rats recovered from protein restriction are not related to AT1 receptors." Experimental Physiology **102**(1): 34-47.

Takeshita, A., A. L. Mark and M. J. Brody (1979). "Prevention of salt-induced hypertension in the Dahl strain by 6-hydroxydopamine." American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology **236**(1): 48-52.

Tang, F., S. Lane, A. Korsak, J. F. R. Paton, A. V. Gourine, S. Kasparov and A. G. Teschemacher (2014). "Lactate-mediated glia-neuronal signalling in the mammalian brain." Nature communications **5**(1): 1-14.

Toney, G. M. and S. D. Stocker (2010). "Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: implications for cardiovascular disease." The Journal of Physiology **588**(2010): 3375-3384.

Trudel, E. and C. W. Bourque (2010). "Central clock excites vasopressin neurons by waking osmosensory afferents during late sleep." Nature Neuroscience volume **13**(4): 467-474.

Turlejski, T., I. Humoud, R. Desai, K. J. Smith and N. Marina (2016). "Immunohistochemical evidence of tissue hypoxia and astrogliosis in the rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats." Brain Research **1650**: 178-183.

Verney, E. B. (1947). "Croonian Lecture - The antidiuretic hormone and the factors which determine its release." Proceedings of the Royal Society of London. Series B-Biological Sciences **135**(878): 25-106.

Weiss, M. L., D. E. Claassen, T. Hirai and M. J. Kenney (1996). "Nonuniform sympathetic nerve responses to intravenous hypertonic saline infusion." Journal of the Autonomic Nervous System **57**: 109-115.

Yang, M., F. Gao, H. Liu, W. H. Yu, F. Zhuo, G. P. Qiu, J. H. Ran and S. Q. Sun (2013). "Hyperosmotic induction of aquaporin expression in rat astrocytes through a different MAPK pathway." Journal of cellular biochemistry **114**(1): 111-119.

Yoshimoto, M., Y. Onishi, N. Mineyama, S. Ikegame, M. Shirai, J. W. Osborn and K. Miki (2019). "Renal and Lumbar Sympathetic Nerve Activity During Development of Hypertension in Dahl Salt-Sensitive Rats." Hypertension **74**(4): 888-895.

Zimmermann, H., M. Zebisch, N. Sträter, H. Zimmermann, M. Zebisch and N. Sträter (2012). "Cellular function and molecular structure of ecto-nucleotidases  
Madin-Darby canine kidney MS Mass spectrometry NDP Nucleoside diphosphate  
NLD Nuclease-like domain NMP Nucleoside monophosphate NMN Nicotinamide  
mononucleotide NMR Nuclear magnetic resonance NPP Nucleotide  
pyrophosphatase/ phosphodiesterase NR Nicotinamide riboside NTP Nucleoside  
triphosphate." Purinergic Signalling **8**: 437-502.