

Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Associação ampla UFSCar/UNESP

Gabriela Maria Lucera

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CENTRAIS ANGIOTENSINÉRGICOS E
MINEROCORTICÓIDES NO AUMENTO DO APETITE AO SÓDIO INDUZIDO
POR PRIVAÇÃO HÍDRICA EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Araraquara, 2020

**Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
Associação ampla UFSCar/UNESP**

GABRIELA MARIA LUCERA

**ENVOLVIMENTO DOS RECEPTORES CENTRAIS ANGIOTENSINÉRGICOS E
MINELAROCORTICÓIDES NO AUMENTO DO APETITE AO SÓDIO INDUZIDO
POR PRIVAÇÃO HÍDRICA EM RATOS COM HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

**Dissertação apresentada ao
Programa Interinstitucional
de Pós-Graduação em
Ciências Fisiológicas
PIPGCF UFSCar/UNESP,
como parte dos requisitos
para obtenção do Título de
Mestre em Ciências
Fisiológicas.**

**Orientadora: Profa. Dra.
Débora Simões de Almeida
Colombari**

Araraquara, 2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Gabriela Maria Lucera, realizada em 27/04/2020:

Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari
UNESP

pl

Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade
UNESP

pl

Profa. Dra. Cassia Marta de Toledo Bergamaschi
UNIFESP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Carina Aparecida Fabrício de Andrade, Cassia Marta de Toledo Bergamaschi e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.

Profa. Dra. Debora Simões de Almeida Colombari

Ao meu Pai, Dimas

À minha mãe, Valéria

À minha irmã, Mariana

Aos meus sobrinhos, Manoela e Felipe

Aos meus pais, Dimas e Valéria, pelo incentivo desde pequena aos estudos, pelo apoio e amor durante toda minha formação e pelos sacrifícios realizados ao longo do caminho para que meu sonho fosse concretizado.

À Prof. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari por ter me acolhido e acreditado no meu potencial. Eu não poderia ter escolhido melhor orientação, obrigada por ensinar com amor.

Ao meu amigo e companheiro, Rafael Caporal, por todo apoio e amor.

Aos meus amigos e colegas de laboratório em especial: Jéssica, Isabela e Emilson

Aos professores do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara e do programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas por todo ensinamento.

À Silas Pereira Barbosa, por todo suporte e ensino no laboratório.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara Silvana A. D. Malavolta, Carla Molina, Mikail D. dos Santos e Ana V. de Oliveira por todo o suporte e auxílio.

Aos sujeitos utilizados nesta pesquisa, sem os quais não seria possível sua realização, meu profundo respeito.

Às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Código de Financiamento 001), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo auxílio financeiro.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Apetite ao sódio em ratos normotensos submetidos à privação hídrica (PH) de 24 horas seguida de 2 horas com acesso apenas à água (reidratação parcial – RP) depende da ativação do sistema renina - angiotensina (SRA). Animais 2 rins – 1 clipe (2R1C) apresentam uma hiperativação do sistema renina–angiotensina–aldosterona (SRAA) e aumento da ingestão de sódio induzida pela PH-RP. Portanto, os objetivos do presente estudo foram: 1) verificar a participação dos receptores de angiotensina II (ANG II) na ingestão de sódio durante a PH em animais 2R1C; 2) verificar a participação dos receptores da aldosterona (ALDO) na ingestão de sódio durante a PH em animais 2R1C; 3) verificar a existência de um sinergismo entre ANG II e ALDO na ingestão de sódio durante a PH em animais 2R1C. Para isso, utilizamos ratos Holtzman (peso inicial 150–180 g) para indução da hipertensão renovascular e cirurgia fictícia (sham). Foi feito um implante de cânula–guia no ventrículo lateral (VL) em ambos após 6 semanas da cirurgia renal. Para distinção da sede e apetite ao sódio, 5 dias após a recuperação do implante, os animais 2R1C e sham foram submetidos ao protocolo de PH–RP com injeções centrais de veículo (1% de etanol em salina, 2 µl) ou salina (NaCl 0,15 M, 1µl), RU28318 (100 ng/2 µl) ou losartan (66 ug/ 1µl), e para verificar o sinergismo foi feita a administração simultânea de RU28318 + losartan e como controle veículo + salina com intervalo de 10 min entre as injeções. Depois de 3 dias o teste foi contrabalanceado em cada grupo experimental. O bloqueio de receptores AT1 para ANG II reduziu a ingestão de água durante o teste da sede nos animais 2R1C e sham, o mesmo efeito não foi observado durante o bloqueio de receptores mineralocorticoides (MR) para ALDO. O duplo bloqueio dos dois receptores reduziu a ingestão de água nos animais 2R1C e sham durante o teste da sede. A ingestão de NaCl 0,3 M foi parcialmente reduzido durante o teste de apetite ao sódio com o bloqueio de receptores AT1 nos animais 2R1C. Efeito semelhante foi observado com o bloqueio de receptores MR nos animais 2R1C. O duplo bloqueio dos receptores suprimiu completamente a ingestão de sódio nos animais 2R1C. Estes resultados mostram que o apetite ao sódio induzido pela PH em animais 2R1C é mediado pela ativação de receptores AT1 e MR, possivelmente por uma maior atividade do SRAA, e que existe um sinergismo entre a ANG II e ALDO para o apetite ao sódio nos ratos 2R1C.

Palavras-chaves: hipertensão renovascular; angiotensina II; aldosterona; apetite ao sódio; privação hídrica, receptor do subtipo 1 de angiotensina II, receptor mineralocorticoide.

ABSTRACT

Sodium appetite in normotensive rats submitted to water deprivation (WD) for 24 h followed by 2 h with access to water only (partial rehydration–PR) depends on the activation of the renin-angiotensin system (RAS). Two-kidney-1-clip (2K1C) rats show a hyperactivation of the renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) and an increase in sodium intake induced by WD-PR. Therefore, the aim of the present study were: 1) to verify the participation of angiotensin II (ANG II) receptors in sodium intake induced by WD in 2K1C rats; 2) to verify the participation aldosterone (ALDO) receptors in sodium intake during WD in 2K1C rats, 3) to verify if there is a synergism between ANG II and ALDO in sodium intake during WD in 2K1C rats. For this end, we used Hotlzman male rats (initial weight 150-180 g) to induce renovascular hypertension and sham surgery. A guide cannula was implanted in the lateral ventricle (LV) in both groups after 6 weeks of renal surgery. To distinguish thirst and sodium appetite, 5 days after implant recovery, 2K1C and sham rats were submitted to WD-PR protocol with LV injections of vehicle (1% ethanol in saline, 2 μ l) or saline (0.15 M NaCl), RU28318 (100 ng/2 μ l) or losartan (66 μ g/1 μ l), and to verify synergism, administration of RU+losartan or vehicle+saline were performed 10 min apart in a group of rats. After 3 days the tests were counterbalanced in each group. The blockade of ANG II AT1 receptors reduced water intake during thirst test in sham and 2K1C rats, which as not observed during the blockade of ALDO mineralocorticoid receptors (MR). Simultaneous blockade of the two receptors reduced water intake in sham and 2K1C rats during the thirst test. The 0.3 M NaCl intake was partially reduced during the sodium appetite test with AT1 receptors blockade in 2K1C rats. A similar effect was observed with the blockade of MR receptor in 2K1C rats. Double receptor blockade completely blocked sodium appetite in 2K1C rats. These results show that the sodium appetite induce by WD in 2K1C rats is mediated by the activation of the AT1 and MR, possibly by a greater activation of the RAAS, and that ANG II and ALDO have a synergism to induce sodium appetite in 2K1C rats.

Keywords: renovascular hypertension, angiotensin II, aldosterone, sodium appetite, water deprivation, angiotensin type 1 receptor, mineralocorticoid receptor.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na ingestão de sódio e água após o bloqueio de receptores AT1 no VL com losartan (66 µg/1 µl) em animais 2R1C (n = 9) ou sham (n = 8) em privação hídrica de 24 horas ou hidratados.

Figura 2: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na ingestão de sódio e água após o bloqueio de receptores MR no VL com RU28318 (100 ng/2 µl) em animais 2R1C (n = 7) ou sham (n = 9) em privação hídrica de 24 horas ou hidratados.

Figura 3: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na ingestão de sódio e água após o duplo bloqueio de receptores centrais MR e AT1 no VL com RU28318 (100 ng/2 µl) e losartan (66 µg/1 µl) em animais 2R1C (n = 5) ou sham (n = 5) em privação hídrica de 24 horas.

Figura 4: Desenho experimental do protocolo sobre alteração na PAM e FC após a injeção de losartan (66 µg/1 µl) no VL de animais 2R1C ou sham hidratados.

Figura 5: Desenho experimental do protocolo sobre alteração na PAM e FC após a injeção de RU28318 (100 ng/2 µl) no VL de animais 2R1C ou sham hidratados.

Figura 6: Ingestão diária de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em animais sham e 2R1C durante as seis primeiras semanas de desenvolvimento da hipertensão renovascular. Os valores foram expressos em média ± EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias seguido do teste Student-Newman-Keuls; p < 0,05.

Figura 7: Ingestão cumulativa de água durante o teste de sede em animais (A) sham e (B) 2R1C hidratados ou privados tratados com losartan (66 µg/1 µl) ou salina no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média ± EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; p < 0,05.

Figura 8: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água durante o teste de apetite ao sódio em ratos (A- B) sham e (C- D) 2R1C hidratados ou privados tratados com salina (1 µl) ou losartan (66 µg/1µl) no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média ± EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; p < 0,05.

Figura 9: Ingestão cumulativa de água durante o teste de sede em animais sham (A) e 2R1C (B) hidratados ou privado tratados com RU28318 (100 ng/2 µl) ou veículo (2 µl) no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média ± EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

Figura 10: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água durante o teste de apetite ao sódio em ratos (A- B) sham e (C- D) 2R1C hidratados ou privados tratados com veículo (2 µl) ou RU28318 (100 ng/2 µl) ou no VL. Os valores estão expressos em média ± EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

Figura 11: Ingestão cumulativa de água durante o teste da sede em animais sham (A) e 2R1C (B) privados tratados com RU28318 (100 ng/2 µl) + Losartan (66 µg/1 µl) ou veículo (2 µl) + salina (1 µl) no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média ± EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

Figura 12: Ingestão cumulativa de água e sódio durante o teste de apetite ao sódio em animais sham (A) e 2R1C (B) privados tratados com RU28318 (100 ng/2 µl) + Losartan (66 µg/1 µl) ou veículo (2 µl) + salina (1 µl) no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média ± EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

Figura 13: Efeito da injeção no ventrículo lateral (VL) de losartan (66 µg/1 µl) ou RU28318 (100 ng/2µl) na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) no VL em animais 2R1C e sham. Os valores estão expressos em média ± EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

Figura 14: Fotomicrografias de cortes coronais do A) prosencéfalo mostrando o sítio de injeção no ventrículo lateral (magnificação 1,25 X), B) do bulbo mostrando os neurônios marcados imunopositivamente ao HSD2 no núcleo do trato solitário (magnificação 10 X).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Peso corporal, pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e relação entre o rim esquerdo/direito dos animais 2R1C e sham.

LISTA DE ABREVIATURAS

2R1C – 2 rins -1- clipe
ALDO – Aldosterona
ANG II – Angiotensina II
AP – Área postrema
AT1 – Receptor angiotensinérgico
AT2 – Receptor angiotensinérgico
Bpm – Batimentos por minuto
ECA – Enzima conversora de angiotensina II
FC – Frequência cardíaca
HSD2 – 11 β – hidroxisteroide – desidrogenase 2
ICV – Intracerebroventricular
LEC – Líquido extracelular
LOS – Losartan
MR – Receptor mineralocorticoide
NTS – Núcleo do trato solitário
OSF – Órgão subfornical
OVL – Órgão vasculoso da lâmina terminal
PA – Pressão arterial
PAD – Pressão arterial diastólica
PAM – Pressão arterial média
PAS – Pressão arterial sistólica
PH – Privação hídrica
PH – RP – Privação hídrica – Reidratação parcial
RU – RU28318
Sham – Cirurgia fictícia
SHR – Ratos espontaneamente hipertensos
SNC – Sistema nervoso central
SRA – Sistema renina – angiotensina
SRAA – Sistema renina – angiotensina – aldosterona
VL – Ventrículo lateral

Sumário

1. Introdução	12
1.1 Hipertensão arterial e ingestão de sódio	12
1.2 Hipertensão renovascular	13
1.3 Equilíbrio hidroeletrolítico e hipertensão renovascular	15
2. Objetivos	17
3. Material e Métodos	18
3.1 Animais	18
3.2 Indução da hipertensão renovascular (2R1C)	18
3.3 Implante de cânula no ventrículo lateral (VL)	18
3.4 Registro de pressão arterial	19
3.5 Injeção de substâncias no ventrículo lateral (VL)	19
3.6 Ingestão de água e NaCl 0,3 M	19
3.7 Protocolo de Privação hídrica (PH) – Reidratação Parcial (RP)	19
3.8 Imunohistoquímica para marcação dos neurônios HSD2 no NTS	20
3.9 Eutanásia e histologia	21
3.10 Análise estatística	21
4. Protocolos Experimentais	21
4.1 Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 na ingestão de água e apetite ao sódio no protocolo de privação-hídrica (PH) e reidratação-parcial (RP)	22
4.2 Efeito do bloqueio de receptores mineralocorticoides (MR) na ingestão de água e apetite ao sódio no protocolo de privação - hídrica (PH) e reidratação-parcial (RP)	23
4.3 Efeito do duplo bloqueio de receptores mineralocorticoides (MR) e angiotensinérgicos do subtipo AT1 na ingestão de água e apetite ao sódio no protocolo de privação – hídrica (PH) e reidratação – parcial (RP)	24
4.4 Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 e mineralocorticoides do subtipo MR na PAM e FC de animais 2R1C e sham hidratados.	25
5. Resultados	26
5.1 Ingestão diária de água e NaCl 0,3 M de animais 2R1C e sham	26
5.2 Efeitos do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 no VL no apetite ao sódio e sede induzidos pela privação hídrica em animais 2R1C e sham	28
5.3 Efeitos do bloqueio de receptores centrais mineralocorticóide (MR) RU28318 no VL no apetite ao sódio e sede induzidos pela privação hídrica em animais 2R1C e sham.	31
5.4 Efeitos do duplo bloqueio de receptores centrais AT1 e MR no VL no apetite ao sódio e sede induzidos pela privação hídrica de 24 horas em animais 2R1C e sham.	34

5.5	Efeito da injeção de RU28318 e Losartan no VL na PAM e FC de ratos 2R1C ou sham hidratados.	37
5.6	Histologia	39
6.	Discussão	40
7.	Conclusão	46
8.	Referências	47

1. Introdução

1.1 Hipertensão arterial e ingestão de sódio

O bombeamento cardíaco gera a propulsão do sangue ao longo dos vasos sanguíneos garantindo a função primária do sistema cardiovascular de transporte de nutrientes e oxigenação dos tecidos. Durante a sístole, período de contração do músculo cardíaco, o sangue é ejetado produzindo uma força contra a parede vascular. Essa força é definida como pressão arterial sistólica (PAS) e em condições fisiológicas e de repouso é em torno de 120 mmHg. Durante o relaxamento cardíaco, período denominado de diástole, a pressão diminui devido ao atrito entre o sangue e a parede vascular, como consequência temos uma pressão diastólica (PAD) em torno de 80 mmHg.

Distúrbios na manutenção da pressão arterial levam ao estabelecimento de patologias como a hipertensão arterial. Segundo a 7ª diretriz brasileira de hipertensão arterial, a hipertensão arterial é definida como um aumento sustentado dos níveis pressóricos, com PAS \geq 140 e PAD \geq 90 mmHg e pode ser classificada em hipertensão primária (quando a causa não é conhecida) e secundária (quando a causa é conhecida). É uma doença crônica multifatorial mais prevalente em todo o mundo, afetando aproximadamente 1/3 da população adulta. Segundo a Organização Mundial da Saúde, 22% da população global apresenta aumento crônico da pressão arterial. Além disso, a hipertensão arterial é a principal causa de morte precoce por infarto do miocárdio, acidente vascular encefálico, falência renal dentre outras doença (World Health Organization, 2013) .

Além de estar associada com outras doenças, existem fatores de risco que podem contribuir para o seu desenvolvimento. Um desses fatores é o excesso do consumo de sódio (> 5 g por dia) (Willian *et al.*, 2018) Há evidências de que o excesso no consumo de sódio tem efeito de aumento pressórico e que a restrição de sódio apresenta um efeito redutor na pressão arterial(Willian *et al.*, 2018) . O sódio é o principal eletrólito do líquido extracelular (LEC) e sua constância é essencial para a manutenção do volume do LEC. Dessa maneira, a quantidade de sódio corporal deve ser regulada para garantir o funcionamento adequado de inúmeros processos fisiológicos, como por exemplo a excitabilidade neuronal e estabilidade da pressão arterial. A deficiência de sódio ou a inabilidade de retenção de sódio pelo organismo

é incompatível com a sobrevivência, podendo levar ao colapso do sistema circulatório (Gómez - Sanchez, 1997; Johson *et al.*, 2008; De Luca *et al.*, 2002; Thunhorst e Johnson, 1994).

A reposição de sódio perdido pelo organismo é feita através do comportamento ingestivo. O apetite ao sódio é um comportamento inato que é motivado pela deficiência de sódio corporal. Se refere ao estado e comportamentos associados com a procura e ingestão de substâncias salgadas (Richter, 1935). Dados da literatura já demonstraram um maior apetite ao sódio em modelos animais de hipertensão primária e secundária quando comparado a animais normotensos (Dinicolantino, 2004; Roncari *et al.*, 2018; Schoming, 1980)

1.2 Hipertensão renovascular

A hipertensão renovascular é um tipo de hipertensão secundária prevalente em 5% entre os pacientes hipertensos (7ª diretriz brasileira de hipertensão, 2018). Sua principal causa é o estreitamento por placas ateroscleróticas, depositadas unilateral ou bilateralmente, na artéria renal. Goldblatt em 1934 (Goldblatt *et al.*, 1934) desenvolveu um modelo animal experimental de hipertensão renovascular, denominado 2-rins-1-clipe (2R1C), capaz de mimetizar a estenose unilateral da artéria renal.

Nesse modelo, é colocado em volta da artéria renal um clipe de prata com um diâmetro padronizado em relação ao peso corporal do animal que reduz em aproximadamente 50% o fluxo sanguíneo para o um dos rins. A redução da perfusão renal estimula a liberação de renina pelas células justaglomerulares do rim clipado. As células justaglomerulares são células musculares lisas localizadas na parede adjacente da arteríola aferente. A renina liberada irá converter uma proteína plasmática inativa, o angiotensinogênio, produzido pelo fígado, em angiotensina I (ANG I). A angiotensina I circulante é convertida em angiotensina II (ANG II) pela enzima conversora de angiotensina (ECA) presente principalmente no endotélio pulmonar. Dessa maneira, o modelo de hipertensão 2R1C é caracterizado por uma hiperativação do sistema-renina-angiotensina (SRA) (Martinez-Maldonado, 1991).

A ANG II, que é considerada o hormônio primário na patofisiologia da hipertensão 2R1C (Martinez-Maldonado, 1991), tem suas através de dois subtipos de receptores: AT1 e AT2 (Gasparo e Unger, 2000). A ação sobre o receptor AT1 induz uma série de

efeitos que impactam o sistema cardiovascular e aumentam a pressão arterial. Efeitos como vasoconstrição, secreção de aldosterona, reabsorção de água e sódio e facilitação simpática são mediados pelos receptores AT1 periféricos (Kaschina e Unger, 2003). Outros efeitos do hormônio, como indução da sede e apetite ao sódio, secreção de vasopressina e aumento da atividade simpática são mediados pelos receptores AT1 localizados no sistema nervoso central (SNC) (Fitzsimons, 1998; Kaschina e Unger, 2003). Assim, devido ao excesso de ANG II circulante, estudos mostram que animais 2R1C apresentam disfunção no barorreflexo, aumento do estresse oxidativo e simpatoexcitação (Oliveira-Sales *et al.*, 2014, 2016; Welch *et al.*, 2003). A ação da ANG II no receptor AT2 periférico e central está relacionada com efeitos cardiovasculares protetores, inclusive em ratos 2R1C (Blanch *et al.*, 2014; Sumners *et al.*, 2015).

Outro hormônio, que também está elevado durante a hipertensão 2R1C, é a aldosterona (ALDO) (Leenen *et al.*, 1975). A ALDO é um hormônio esteroide produzido através da modificação enzimática do colesterol pelas glândulas adrenais. Além disso, é considerado um mineralocorticoide devido a sua participação no balanço hidroeletrolítico (Briet e Schiffrin, 2010). As glândulas adrenais estão localizadas acima do rim e possuem receptores AT1 e AT2 para ANG II. A ANG II estimula a secreção de ALDO ao se ligar ao seu receptor AT1 no córtex da glândula adrenal. A liberação de inositol 1,4,5 – trifosfato (IP3) pela ativação do receptor AT1 desencadeia a liberação de cálcio a partir de reservas intracelulares. A liberação de cálcio facilita a atividade de uma enzima localizada na mitocôndria e responsável por quebrar a pregnenolona para formar a aldosterona, estimulando assim a síntese e liberação de aldosterona (Boron e Boulpaep, 2015). Estudos tem sugerido a participação da aldosterona na simpatoexcitação, estresse oxidativo e alterações cardiovasculares encontradas no modelo 2R1C (Lincevicius *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2008). Portanto, o modelo de hipertensão renovascular 2R1C é um modelo dependente do sistema – renina-angiotensina–aldosterona (SRAA).

Além de participar no controle cardiovascular, o aumento da atividade do SRAA é um importante estímulo para a ingestão de água e sódio. De fato, além das disfunções autonômicas e cardiovascular, animais 2R1C apresentam um aumento transitório na ingestão diária de sódio e água quando comparado ao animal normotenso (Roncari *et al.*, 2018). *Dados recentes de nosso laboratório demonstraram que em ratos 2R1C (6 – 7 semanas de hipertensão), a privação hídrica de 24 horas promoveu um maior*

aumento na ingestão de sódio, sugerindo uma maior sensibilidade dos ratos 2R1C a este estímulo (Roncari et al., 2018). Entretanto, ainda não se sabe quais mecanismos estão envolvidos na potencialização da ingestão de sódio durante a privação hídrica em animais 2R1C.

1.3 Equilíbrio hidroeletrólítico e hipertensão renovascular

É possível que a maior ingestão de sódio hipertônico durante a privação hídrica em animais 2R1C seja decorrente da hiperativação do SRAA. Além de estar envolvido com o controle cardiovascular, o SRAA também participa no balanço hidroeletrólítico através das ações da ANG II e ALDO (Fitzsimons, 1998; Sakai, et al 1986). Ambos atuam nos rins, promovendo a reabsorção de sódio e no SNC estimulando a ingestão de sódio (Handa e Johns, 1985; Loffing e Korbmacher, 2009; Rice e Richter, 1943; Sato et al., 1996). A privação hídrica (PH) é um modelo de depleção dupla capaz de induzir sede e apetite ao sódio, dois comportamentos motivados que levam o animal à procura e ingestão de alimentos ou bebidas que contenham água e sal (Barney et al., 1983; Quartermain et al., 1967; Sato et al., 1996; Wagman, 1963). Esses comportamentos são respostas frente a perda de volume e aumento da osmolaridade plasmática de ambos os compartimentos gerados pela privação hídrica (De Luca et al., 2002). A ação da ANG II na sede durante a desidratação já está bem descrita na literatura (Fitzsimons, 1998). A privação hídrica de 12, 24, 36 e 48 horas leva à um aumento na ingestão de água e o bloqueio da enzima conversora de angiotensina II (ECA), prevenindo assim a formação de ANG II, com captopril sistêmico reduz a ingestão de água (Barney et al., 1983). A ANG II também está envolvida no apetite ao sódio durante a PH. A administração intracerebroventricular (icv) de losartan, um antagonista de receptor AT1 de ANG II, reduz a ingestão de sódio em animais em privação hídrica (Sato et al., 1996)

Além de atuar nos rins, controlando a extensão em que o rim excreta ou reabsorver sódio filtrado no glomérulo renal, estudos já demonstraram a participação da ALDO no mecanismo de apetite ao sódio (Epstein, 1991; Fluharty e Epstein, 1983; Sakai et al., 1986) Inicialmente, a ALDO foi descrita como não essencial para a ingestão de sódio, uma vez que animais adrenalectomizados passavam a ingerir grandes quantidade de salina hipertônica (Richter, 1935). Entretanto, um estudo posterior mostrou que o tratamento com altas doses sistêmica de mineralocorticoide em animais com a adrenal intacta estimulava o apetite ao sódio (Rice e Richter, 1943).

Além disso, o comportamento ingestivo causado pelo excesso de mineralocorticoide é específico para o sódio e a ingestão de água observada é secundária ao aumento da ingestão de sódio (Rice e Richter, 1943; Wolf e Handal, 1966). Outro estudo mostrou que a ingestão de sódio estimulada pela administração icv de ANG II era maior em animais previamente tratados sistemicamente com mineralocorticoide (Fluharty e Epstein, 1983). Ainda, o bloqueio simultâneo do receptor mineralocorticoide central e da angiotensina II periférica suprimiu o apetite ao sódio em animais depletados de sódio por furosemida (Sakai *et al.*, 1986). Esses estudos apontam para a existência de um sinergismo entre os dois hormônios na ingestão de sódio em animais depletados de sódio. Em um animal com deficiência de sódio, isto é, durante uma hipovolemia, ANG II e ALDO estão elevados e, portanto, atuam sinergicamente no SNC induzindo o apetite ao sódio (Epstein, 1991).

No SNC, a ANG II circulante se liga em receptores angiotensinérgicos, do subtipo AT1, localizados em áreas livres de barreira hematoencefálica, como por exemplo o órgão subfornical (OSF) e órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) (Johnson e Gross, 1993; De Luca *et al.*, 2002). A ALDO atua nos receptores mineralocorticoides (MR) centrais (Coirini *et al.*, 1983). Esses neurônios estão localizados na parte caudal do núcleo do trato solitário (NTS), adjacentes a área postrema (AP), e além de apresentarem o receptor MR para mineralocorticoide, possuem uma enzima denominada 11 β – hidroxisteroide–desidrogenase 2 (HSD2) que confere a essa população neuronal a especificidade à aldosterona (Geerling *et al.*, 2006). Chamados de neurônios HSD2, sua localização é restrita ao NTS e são ativados durante uma dieta crônica de privação de sódio e então inibidos após a ingestão de sódio (Geerling e Loewy, 2008). Além disso, ao contrário dos outros hormônios esteroides, a ALDO não consegue penetrar na barreira hematoencefálica e não existem evidências da produção de ALDO no SNC (Funder e Myle, 1996; Funder, 2005; Gross *et al.*, 1990; Pardridge, 1981).

Embora durante a privação hídrica os níveis de aldosterona não se alterem, o modelo de hipertensão renovascular 2R1C é dependente da hiperativação do SRAA. Dessa forma, mais estudos são necessários para verificar se há ativação de receptores de ANG II e/ou aldosterona no SNC atuando sozinhas, ou de forma sinérgica para potencializar a ingestão de sódio durante a privação hídrica nesses animais.

2. Objetivos

Os objetivos do presente estudo foram:

- 1) Verificar a participação dos receptores AT1 no prosencéfalo na ingestão de sódio de animais 2R1C em privação hídrica de 24 horas.
- 2) Verificar a participação de receptores MR no prosencéfalo na ingestão de sódio de animais 2R1C em privação hídrica de 24 horas.
- 3) Verificar se há um sinergismo entre ANG II e ALDO na ingestão de sódio de animais 2R1C em privação hídrica

3. Material e Métodos

3.1 Animais

Foram utilizados ratos Holtzman jovens (150-180 g) para a indução da hipertensão renovascular 2R1C e cirurgia sham fictícia. Os animais foram mantidos em caixas plásticas coletivas durante 5 semanas (três animais por caixa) e na 6^a semana foram transferidos para gaiolas individuais de aço inoxidável. Durante todo esse período os animais tiveram acesso livre à água, NaCl 0,3 M e ração granulada ad libitum em ambiente com temperatura (23 ± 2 °C) e umidade ($55 \pm 10\%$) controlados e ciclo claro/escuro de 12:12 horas. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo comitê de ética de uso animal (CEUA) da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP (Proc: CEUA # 12/2018).

3.2 Indução da hipertensão renovascular (2R1C)

Os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg, de peso corporal, ip) combinada com xilazina (7 mg/kg, de peso corporal, ip) para a realização de uma laparotomia para exposição do rim esquerdo. A seguir, a artéria renal esquerda foi cuidadosamente isolada, evitando-se danos aos nervos renais, e um clipe de prata com diâmetro interno de 0,2 mm foi colocado na artéria renal esquerda para a obstrução parcial do fluxo sanguíneo renal. Outro grupo de animais foi submetido a cirurgia fictícia (sham) onde o mesmo procedimento cirúrgico foi realizado, exceto a inserção do clipe de prata, conforme descrito anteriormente. No final da cirurgia, os animais tiveram a incisão suturada e receberam tratamento profilático com analgésico/anti-inflamatório (cetoprofeno 1% - 0,03 ml/rato; sc) e antibiótico (benzilpenicilina – 80.000 UIs e estreptomicina – 33 mg, 0,1 ml/rato; im).

3.3 Implante de cânula no ventrículo lateral (VL)

Os animais foram anestesiados conforme descrito acima e posteriormente posicionados em um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O crânio foi nivelado entre o bregma e lambda. Uma cânula guia de aço inoxidável foi inserida no ventrículo lateral (VL) seguindo as seguintes coordenadas: 0,3 mm caudal ao bregma, 1,5 mm lateral à linha mediana e 4,0mm abaixo da dura-máter. A cânula foi fixada no crânio usando acrílico dental e parafusos joalheiros. Imediatamente após a cirurgia os animais receberam a mesma profilaxia descrita acima.

3.4 Registro de pressão arterial

No dia anterior ao registro da pressão arterial, os animais foram anestesiados conforme descrito acima e um tubo de polietileno (PE-10 conectado ao PE-50) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral. Posteriormente, o tubo foi transpassado subcutaneamente e exposto no dorso do animal. O cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier, CB Sciences, Dover, NH, EUA) que está conectado com um sistema de aquisição de dados (modelo Powerlab 16SP; ADInstruments, Castle Hill, Australia). A pressão arterial pulsátil, pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas no animal acordado.

3.5 Injeção de substâncias no ventrículo lateral (VL)

Foram utilizadas as seguintes drogas: losartan (66 µg/1 µl, antagonista de receptores de ANG II do subtipo AT1), baseado em estudo de Sato et al. (Sato *et al.*, 1996) e RU28318 (100 ng/2 µl, antagonista de receptores MR), baseado em estudo de Gasparini et al (Gasparini *et al.*, 2018), dissolvidos respectivamente em NaCl 0,15 M (salina) e etanol 1% em NaCl 0,15 M (veículo). As drogas foram administradas intracerebroventricular (icv), no VL, utilizando-se uma seringa de Hamilton de 10 µl, conectada a um tubo de polietileno (PE-10). A agulha injetora introduzida VL apresentava um comprimento de 2 mm mais longa que a cânula guia (10 mm).

3.6 Ingestão de água e NaCl 0,3 M

Em um grupo, foi mensurado a ingestão diária de água e NaCl 0,3 M de cada animal por meio de garrafas de polipropileno graduados em 1 ml e com capacidade de 100 ml contendo um bico de metal adaptado para gaiolas. Para o teste de apetite ao sódio e sede foram usadas buretas de vidro graduadas em 0,1 ml contendo um bico de metal adaptado para gaiolas.

3.7 Protocolo de Privação hídrica (PH)–Reidratação Parcial (RP)

Foi utilizado protocolo de privação hídrica (PH)-reidratação parcial (RP) para discriminar a sede do apetite ao sódio (Sato *et al.*, 1996). Os ratos 2R1C e sham foram privados de água e NaCl 0,3 M (PH) por 24 h, apenas com ração disponível. Após este período, a ração foi removida e os animais tiveram acesso a bureta contendo água (RP). A ingestão cumulativa de água foi registrada a cada 30 min, por 120 min

(teste da sede). Ao final do período de RP, foi oferecido aos animais buretas contendo NaCl 0,3 M (teste de apetite ao sódio) e a ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M foram registradas a cada 30 min por 120 min. Como controle, os animais também foram testados na condição de hidratação.

3.8 Imunohistoquímica para marcação dos neurônios HSD2 no NTS

Em um grupo de animais hidratados 2R1C (n = 5) e sham (n = 4) foi feita a marcação de neurônios HSD2. Na sexta semana após a clipagem da artéria renal ou cirurgia sham, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental (tiopental sódico, 80 mg/kg, intraperitoneal, Cristália Produtos Químicos farmacêuticos Ltda, Campinas, SP, Brasil) e perfundidos com salina tamponada (PBS 0,1 M; pH = 7,4) seguido de uma solução de paraformaldeído (Sigma, St. Louis, MO, USA) a 4% (PFA 4%) em PBS 0,1 M. Os cérebros foram removidos e estocados em 30% de sacarose em solução de PBS 0,1 M (pH = 7,4). Após o armazenamento à 4° C por não mais que 1 semana, os cérebros foram congelados e quatro grupo de cortes coronais (30 µm) do prosencéfalo foram seccionados em um criostato (Leica, CM1800, Bannockburn, IL, USA) e coletados em placas de cultura com 24 poços contendo PBS 0,1 M para serem submetidos ao procedimento de imunohistoquímica.

Posteriormente, um grupo de cortes do encéfalo foi pré-incubado durante 15 minutos com uma solução de bloqueio composta por 10% de soro normal de cavalo (NHS, Sigma, St Louis, MO, USA) e 0,3% de Triton X-100 (Sigma) em PBS 0,1 M seguido de lavagens em PBS (3x10 min). Subsequentemente, os cortes foram incubados com um anticorpo primário anti-HSD2 feito em cabra (1: 15000, Millipore) em PBS contendo 1% de NHS e 0,3% de Triton X – 100 durante 48 h a 4 °C. Após as 48 h, foi feita uma nova lavagem com PBS 0,1 M e em seguida os cortes foram incubados durante 1 h em um anticorpo biotilado anti- cabra feito em cavalo (1:500). Os cortes foram lavados em PBS (3 x 10 min) antes de serem incubados com Streptavidina Alexa Fluor 488 conjugado feito em cabra anti-coelho (1:500; Molecular Probes, Eugene, OR, EUA) contendo 1% de NHS e Triton-X 0,3% em PBS 0,1 M. Depois de novas lavagens em PBS (3 x 5 min), os cortes foram montados em lâminas gelatinizadas, secos em ar ambiente e protegidos da luz durante 2 horas antes de serem colocadas lamínulas usando uma solução de montagem que protege a redução da fluorescência (VECTASHIELD®, Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA). As

seções foram examinadas em um microscópio de fluorescência (Leica DM5500 B, Wetzlar, Hessen, Alemanha) com o filtro apropriado.

3.9 Eutanásia e histologia

Ao final dos experimentos, os animais foram profundamente anestesiados com thiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal, ip). Os animais receberam a injeção de azul de Evans 2% no VL no mesmo volume da droga injetada. Os rins foram removidos e pesados para verificar a relação rim esquerdo e rim direito. Em seguida o animal foi perfundido com formalina 10% para a coleta do encéfalo. Os encéfalos foram removidos, fixados em formalina 10% durante 7 dias. Após esse período, os encéfalos foram congelados e cortados em seções coronais (50 μ m) em um criostato (Leica, CM1850 UV, Wetzlar, Hesse, Germany), e analisados por microscopia de campo claro para confirmar os sítios de injeções no VL.

3.10 Análise estatística

Os dados foram expressos em média \pm EPM. A análise de variância (uma ou duas vias), associada ao teste de Student-Newman-Keuls, ou o teste *t* de Student foram utilizados quando apropriado, assumindo-se $p < 0,05$.

4. Protocolos Experimentais

Na quinta semana após a clipagem da artéria renal, foi feita uma triagem dos animais 2R1C, através do método pletismografia de cauda (Lovenberg, 1987), para selecionar os animais que efetivamente ficaram hipertensos. Após 6 semanas da indução da hipertensão 2R1C, período que a hipertensão atinge o platô (Martinez-Maldonado, 1991; Oliveira-Sales *et al.*, 2014), todos os animais receberam implante de cânula no VL conforme descrito acima. Após 5 dias de recuperação os experimentos foram realizados (ver protocolos abaixo). Em um grupo de animais foi feita a ingestão diária de água e sódio uma semana antes e durante 6 semanas da indução da hipertensão e a média da semana foi calculada.

Nos demais protocolos, cada grupo de ratos foi submetido a 4 tratamentos (descritos abaixo) com pelo menos 3 dias de intervalo entre eles. Em cada teste, o grupo de ratos foi dividido em dois e metade do grupo recebeu um tratamento e a outra metade recebeu outro tratamento. Três dias após foi feita a medida da PAM e FC em todos os animais para assegurar a hipertensão nos ratos 2R1C ou

normotensão nos ratos sham. No final dos experimentos foi feita a eutanásia dos animais conforme descrito nos métodos.

4.1 Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 na ingestão de água e apetite ao sódio induzidos pelo protocolo de privação-hídrica (PH) e reidratação-parcial (RP)

Em um grupo de animais 2R1C (n = 8) ou sham (n = 8), após 24 de privação de água e NaCl 0,3 M ou hidratação, a ração também foi removida da gaiola e losartan (66 µg/1 µl) ou salina (NaCl 0,15 M, 1 µl) foram injetados no VL dos animais. Após 15 min, somente o bebedouro de água foi oferecido aos animais por 2 h e a ingestão de água foi feita a cada 30 min. Ao final das duas horas, o bebedouro contendo NaCl 0,3 M foi oferecido aos animais e a ingestão de NaCl 0,3 M e água são medidas por 2 horas adicionais a cada 30 min. Os grupos experimentais para o grupo sham foram: sham-hidratado/salina; sham-privado/salina; sham-hidratado/losartan, sham-privado/losartan e para os ratos 2R1C foram: 2R1C-hidratado/salina; 2R1C-privado/salina; 2R1C-hidratado/losartan, 2R1C-privado/losartan. Após o último teste, os animais foram tiveram a artéria femoral canulada para registro da PAM e FC (conforme descrito nos métodos). Foi efetuado um registro basal de 30 minutos para confirmar a hipertensão e normotensão dos animais.

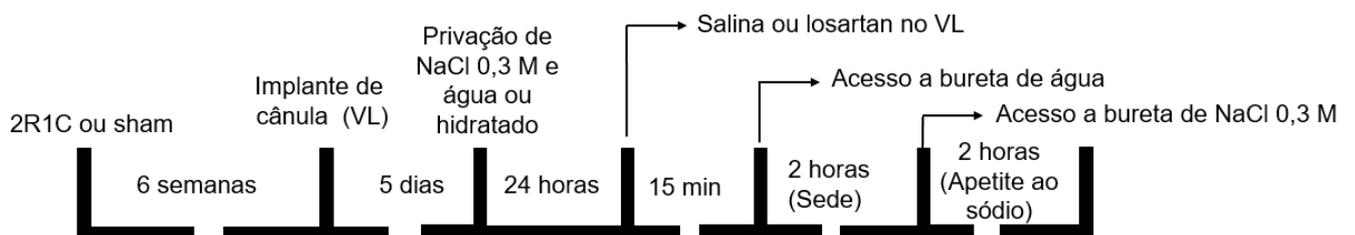


Figura 1: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na ingestão de sódio e água após o bloqueio de receptores AT1 no VL com losartan (66 µg/1 µl) em animais 2R1C (n = 9) ou sham (n = 8) em privação hídrica de 24 horas ou hidratados.

4.2 Efeito do bloqueio de receptores mineralocorticoides (MR) na ingestão de água e apetite ao sódio induzidos pelo protocolo de privação - hídrica (PH) e reidratação-parcial (RP)

Em um grupo de animais 2R1C (n = 7) ou sham (n = 9), após 24 de privação de água e NaCl 0,3 M ou hidratação, a ração também foi removida da gaiola e RU28318 (100 ng/2 µl) ou veículo (etanol 1% em NaCl 0,15 M, 2 µl) foram injetados no VL dos animais. Após 15 min, somente o bebedouro contendo água foi oferecido aos animais por 2 h e a ingestão de água foi mensurada a cada 30 min. Ao final das duas horas, o bebedouro contendo NaCl 0,3 M foi oferecido aos animais e a ingestão de NaCl 0,3 M e água são medidas por 2 horas adicionais a cada 30 min. Os grupos experimentais para o grupo sham foram: sham-hidratado/veículo; sham-privado/veículo; sham-hidratado/RU28318, sham-privado/RU28318 e para os ratos 2R1C foram: 2R1C-hidratado/veículo; 2R1C-privado/veículo; 2R1C-hidratado/ RU28318, 2R1C-privado/ RU28318. Após o último teste, os animais foram tiveram a artéria femoral canulada para registro da PAM e FC (conforme descrito nos métodos). Foi efetuado um registro basal de 30 minutos para confirmar a hipertensão e normotensão dos animais.

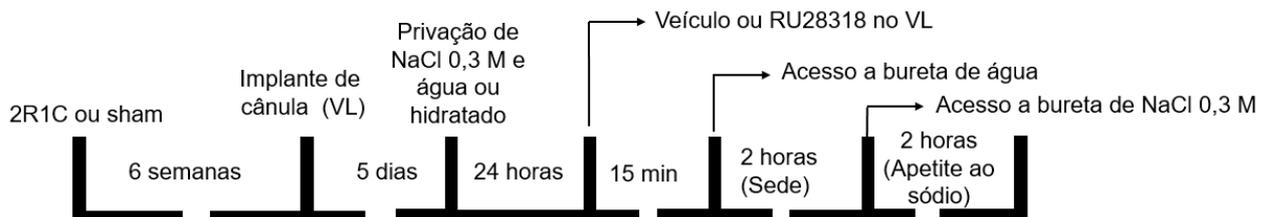


Figura 2: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na ingestão de sódio e água após o bloqueio de receptores MR no VL com RU28318 (100 ng/2 µl) em animais 2R1C (n = 7) ou sham (n = 9) em privação hídrica de 24 horas ou hidratados.

4.3 Efeito do duplo bloqueio de receptores mineralocorticoides (MR) e angiotensinérgicos do subtipo AT1 na ingestão de água e apetite ao sódio induzidos pelo protocolo de privação – hídrica (PH) e reidratação – parcial (RP).

Em um grupo de animais 2R1C ($n = 5$) ou sham, após 24 horas de privação de água e NaCl 0,3 M, a ração também foi removida da gaiola e RU28318 (100 ng/2 μ l) ou veículo (etanol 1% em NaCl 0,15 M, 2 μ l) foram injetados no VL dos animais. Após 10 minutos, losartan (66 μ g/1 μ l) ou salina (NaCl 0,15 M, 1 μ l) também foram injetados no VL dos animais. Após 15 minutos da injeção de losartan ou salina o bebedouro contendo água foi oferecido aos animais durante 2 horas e a ingestão de água foi mensurada a cada 30 minutos. Ao final das duas horas, o bebedouro contendo NaCl 0,3 M foi oferecido aos animais e a ingestão de NaCl 0,3 M e água são medidas por 2 horas adicionais a cada 30 min. Os grupos experimentais foram: sham-privado/veículo+salina, sham-privado/RU28318+losartan, 2R1C-privado/veículo+salina, 2R1C-privado/RU28318+losartan. Após 3 dias do último teste, foi feita a canulação da artéria femoral para registro da PAM e FC (conforme descrito nos métodos). Foi efetuado um registro basal de 30 minutos para confirmar a hipertensão e normotensão dos animais.

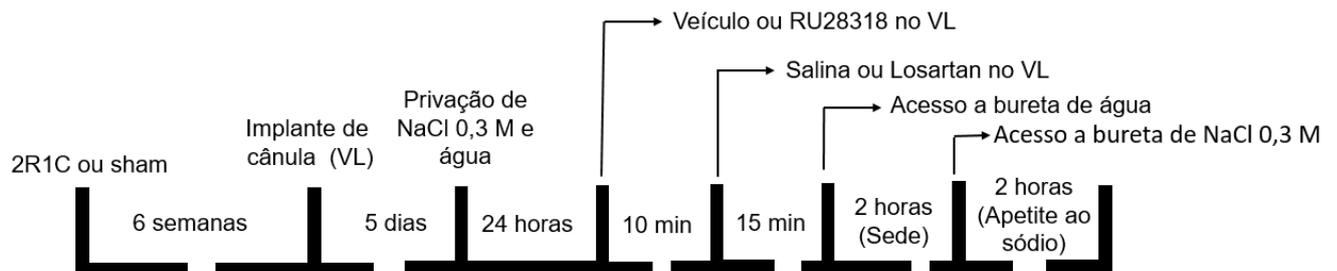


Figura 3: Desenho experimental do protocolo sobre alterações na ingestão de sódio e água após o duplo bloqueio de receptores centrais MR e AT1 no VL com RU28318 (100 ng/2 μ l) e losartan (66 μ g/1 μ l) em animais 2R1C ($n = 5$) ou sham ($n = 5$) em privação hídrica de 24 horas.

4.4 Efeito do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 e mineralocorticoides do subtipo MR na PAM e FC de animais 2R1C e sham hidratados.

Um grupo de animais 2R1C ou sham foi submetidos à canulação da artéria femoral. Após 24 horas, foi feito o registro basal por 20 min da PAM e FC e a seguir, salina (NaCl 0,15 M, 1 μ l) foi injetada no VL, e após 15 min losartan (66 μ g/1 μ l) foi injetado no VL e a PAM e FC foram registrados por 30 min adicionais. Após um intervalo de 4 horas, foi feito novamente um registro basal de 20 min nos mesmos animais e em seguida foi injetado no VL veículo (1 % de etanol em NaCl 0,15 M, 2 μ l) e após 15 minutos RU28318 (100 ng/2 μ l). PAM e FC foram registrados por 30 min adicionais.

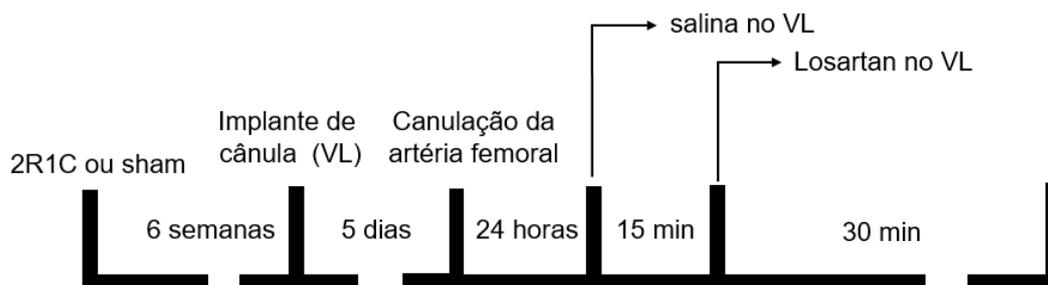


Figura 4: Desenho experimental do protocolo sobre alteração na PAM e FC após a injeção de losartan (66 μ g/1 μ l) no VL de animais 2R1C ou sham hidratados.

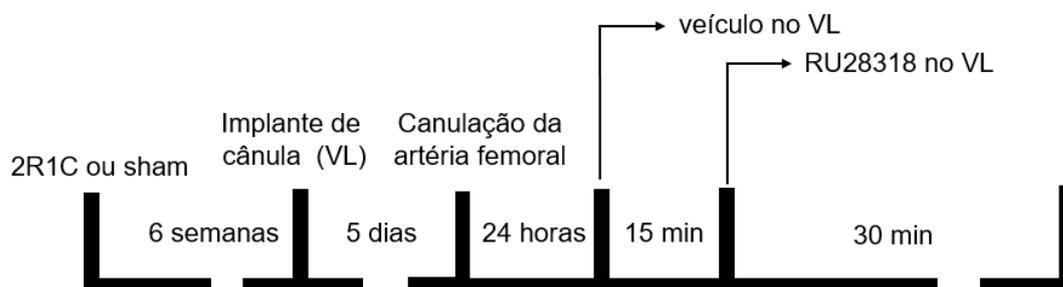


Figura 5: Desenho experimental do protocolo sobre alteração na PAM e FC após a injeção de RU28318 (100 ng/2 μ l) no VL de animais 2R1C ou sham hidratados.

5. Resultados

Tabela 1: Peso corporal, pressão arterial média (PAM), frequência cardíaca (FC) e relação entre o rim esquerdo/direito dos animais 2R1C e sham

Grupo	n	Peso (g)	PAM (mmHg)	FC (bpm)	RE/RD
Sham	42	361 ± 16	113 ± 1	390 ± 17	0,93 ± 0,02
2R1C	38	353 ± 9	182 ± 4*	383 ± 12	0,60 ± 0,05*

Os valores estão reportados como média ± EPM, n= número de animais; Test *t* de Student; $p < 0,05$; *diferente de Sham.

5.1 Ingestão diária de água e NaCl 0,3 M de animais 2R1C e sham

Comparado aos animais sham ($n = 10$), a ingestão diária de NaCl 0,3 M aumentou na 2^a ($5,0 \pm 1,03$ vs. 2R1C: $16,75 \pm 5,84$ ml/24 h) [$F(1;6) = 15,059$; $p < 0,05$] semana em animais 2R1C ($n = 8$) e retornou aos níveis comparados aos animais sham na 6^a semana ($10,6 \pm 2,32$ vs. 2R1C: $15,16 \pm 3,75$ ml/24 h). Em contraste, a ingestão de água foi maior nos animais 2R1C na 4^a ($40,2 \pm 2,33$ vs. 2R1C: $51,81 \pm 5,27$ ml/24 h) e 6^a semana ($39,2 \pm 2,53$ vs. 2R1C: $55,53 \pm 5,21$ ml/24 h) [$F(1;112) = 5,762$; $p < 0,05$].

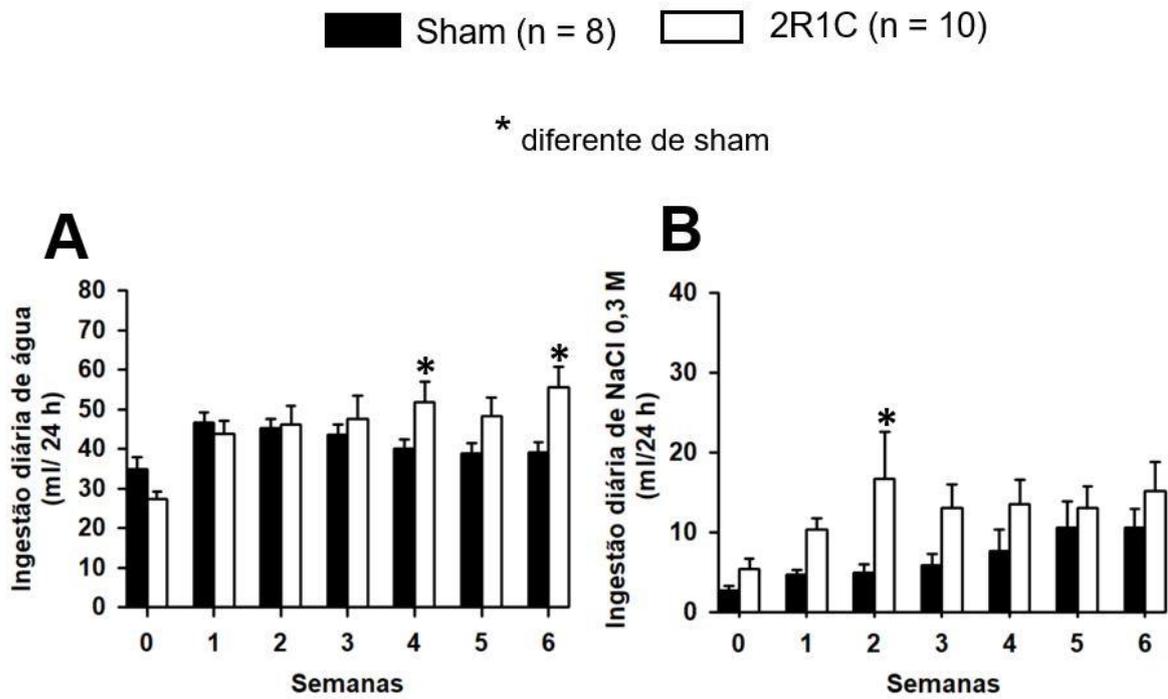


Figura 6: Ingestão diária de (A) água e (B) NaCl 0,3 M em animais sham e 2R1C durante as seis primeiras semanas de desenvolvimento da hipertensão renovascular. Os valores foram expressos em média \pm EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

5.2 Efeitos do bloqueio de receptores angiotensinérgicos do subtipo AT1 no VL no apetite ao sódio e sede induzidos pela privação hídrica em animais 2R1C e sham.

Em ratos sham observamos que a privação hídrica aumentou a ingestão de água durante o teste de sede ($17,2 \pm 1,3$, vs. hidratado: $1,5 \pm 0,6$ ml/2 h) e que o bloqueio dos receptores AT1 de ANG II reduziu o aumento da ingestão de água em ratos privados ($10,1 \pm 2,9$, vs. salina: $17,2 \pm 1,3$ ml/2 h), [F (3; 21) = 28,47; $p < 0,05$]. Efeito semelhante foi observado em ratos 2R1C onde a privação hídrica aumentou a ingestão de água durante o teste de sede ($16,4 \pm 1,5$, vs. hidratado: $1,1 \pm 0,4$ ml/2 h) e que o bloqueio dos receptores AT1 de ANG II reduziu o aumento da ingestão de água em ratos privados ($9,7 \pm 1,7$, vs. salina: $16,4 \pm 1,5$ ml/2 h), [F (3;21) = 26,17; $p < 0,05$].

Em ratos sham, não observamos alterações significantes na ingestão de sódio durante o apetite ao sódio, na ausência ou presença de losartan [F (3,63) = 0,231; $P > 0,05$]. Em ratos 2R1C, a privação hídrica induziu apetite ao sódio ($8,09 \pm 2,64$, vs. hidratado: $1,18 \pm 0,37$ ml/2h), a qual foi atenuada após o bloqueio de receptores AT1 ($4,4 \pm 1,4$, vs. salina: $8,1 \pm 2,6$ ml/2h), [F (3;21) = 6,35; $p < 0,05$]. Losartan no VL também reduziu a ingestão de água que é decorrente da ingestão de sódio durante a fase de apetite ao sódio ($2,4 \pm 0,4$, vs. salina: $6,6 \pm 1,0$ ml/2h), [F (3;21) = 5,10; $p < 0,05$].

○ salina VL + hidratado △ salina VL + privado
 ● losartan VL + hidratado ▲ losartan VL + privado

* diferente de hidratado

diferente de salina VL + privado

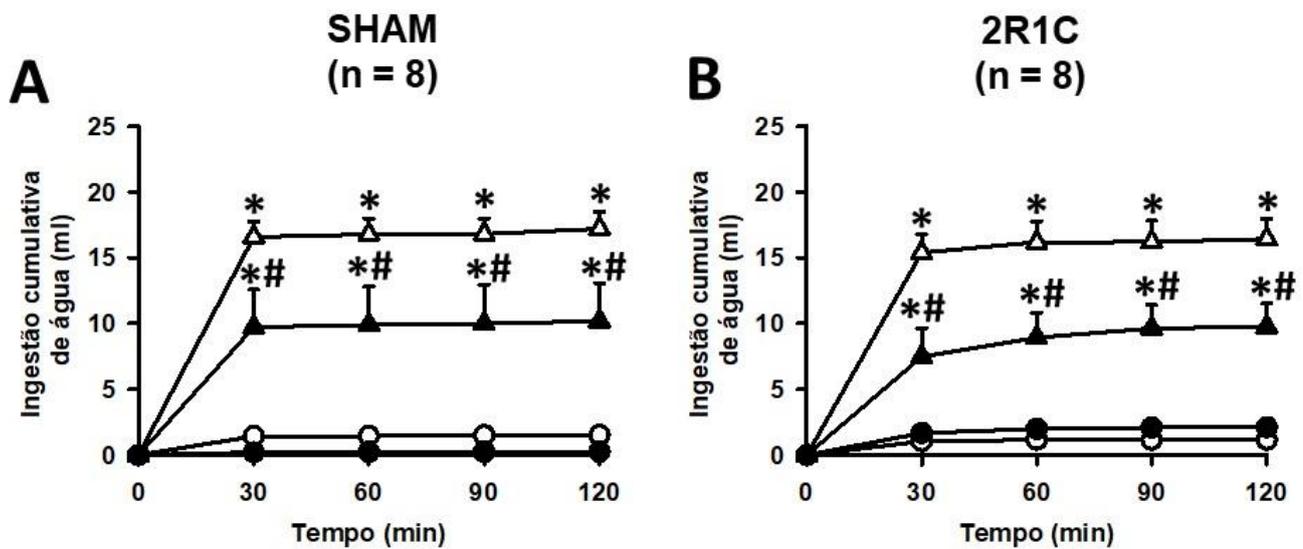


Figura 7: Ingestão cumulativa de água durante o teste de sede em animais (A) sham e (B) 2R1C hidratados ou privados tratados com Losartan (66 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$) ou salina no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média \pm EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

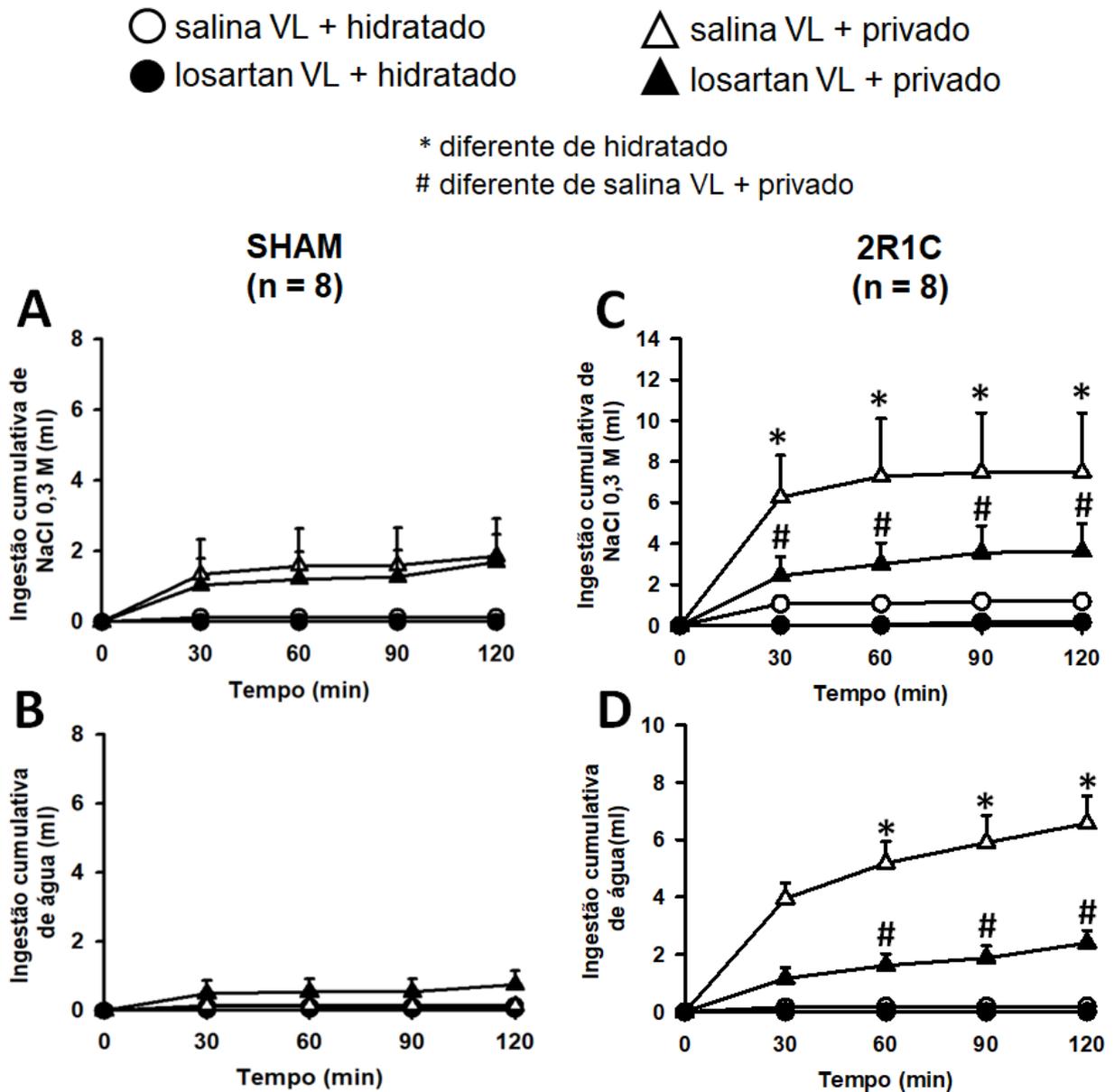


Figura 8: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água durante o teste de apetite ao sódio em ratos (A- B) sham e (C- D) 2R1C hidratados ou privados tratados com salina (1 μ l) ou losartan (66 μ g/1 μ l) no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média \pm EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

5.3 Efeitos do bloqueio de receptores centrais mineralocorticoide (MR) RU28318 no VL no apetite ao sódio e sede induzidos pela privação hídrica em animais 2R1C e sham.

Em ratos sham observamos que a privação hídrica aumentou a ingestão de água durante o teste de sede ($14,48 \pm 0,91$, vs. hidratado: $1,6 \pm 0,48$ ml/2 h) [F (3;21) = 166,7; $p < 0,05$] e que o bloqueio dos receptores MR não alterou o aumento da ingestão de água em ratos privados ($17,01 \pm 1,59$, vs. veículo: $14,48 \pm 0,91$ ml/2 h; $P > 0,05$). Efeito semelhante foi observado em ratos 2R1C onde a privação hídrica aumentou a ingestão de água durante o teste de sede ($17,94 \pm 1,32$, vs. hidratado: $1,27 \pm 0,77$ ml/2 h) [F (3;15) = 80,7; $p < 0,05$] e que o bloqueio dos receptores MR também não alterou a ingestão de água em ratos 2R1C privados ($17,43 \pm 2,12$, vs. veículo: $17,94 \pm 1,32$ ml/2 h, $P > 0,05$).

Em ratos sham, não observamos alterações significantes na ingestão de sódio durante o apetite ao sódio, na ausência ou presença de RU28318 [F (3,21) = 1,34; $p > 0,05$]. Por outro lado, em ratos 2R1C a ingestão de sódio observada em ratos privados ($9,47 \pm 3,07$, vs. hidratados: $0,10 \pm 0,07$ ml/2h), foi atenuada após o bloqueio de receptores MR ($5,67 \pm 1,13$, vs. veículo: $8,22 \pm 1,28$ ml/2h), [F (3;15) = 4,08; $p < 0,05$]. À semelhança do que foi observado no grupo losartan, o bloqueio de receptores MR reduziu a ingestão de água decorrente da ingestão de sódio durante a fase de apetite ao sódio ($0,76 \pm 0,64$ vs. veículo: $5,89 \pm 2,68$ ml/2h), [F (3;15) = 3,42; $p < 0,045$].

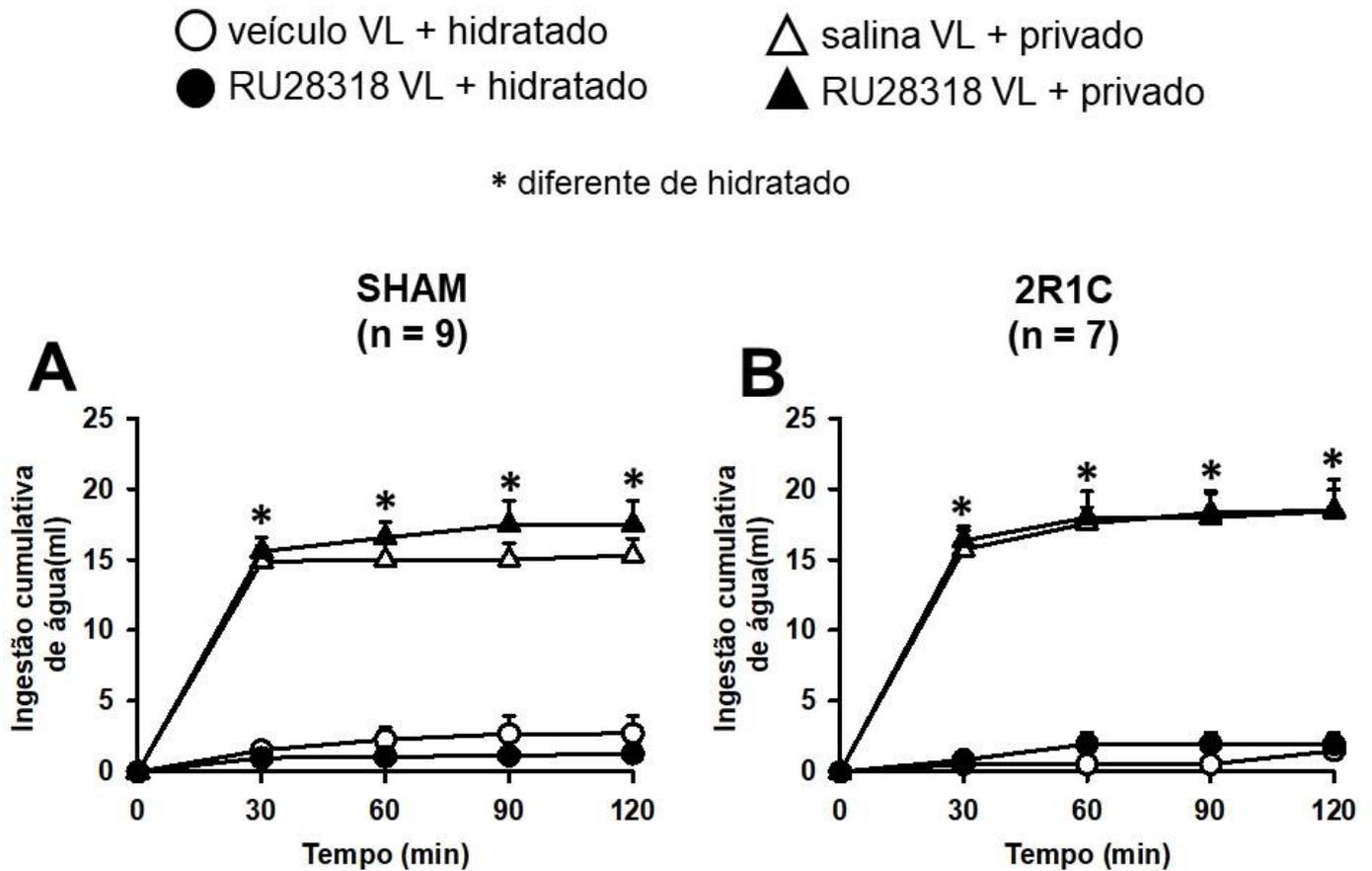


Figura 9: Ingestão cumulativa de água durante o teste de sede em animais sham (A) e 2R1C (B) hidratados ou privado tratados com RU28318 (100 ng/2 μ l) ou veículo (2 μ l) no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média \pm EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

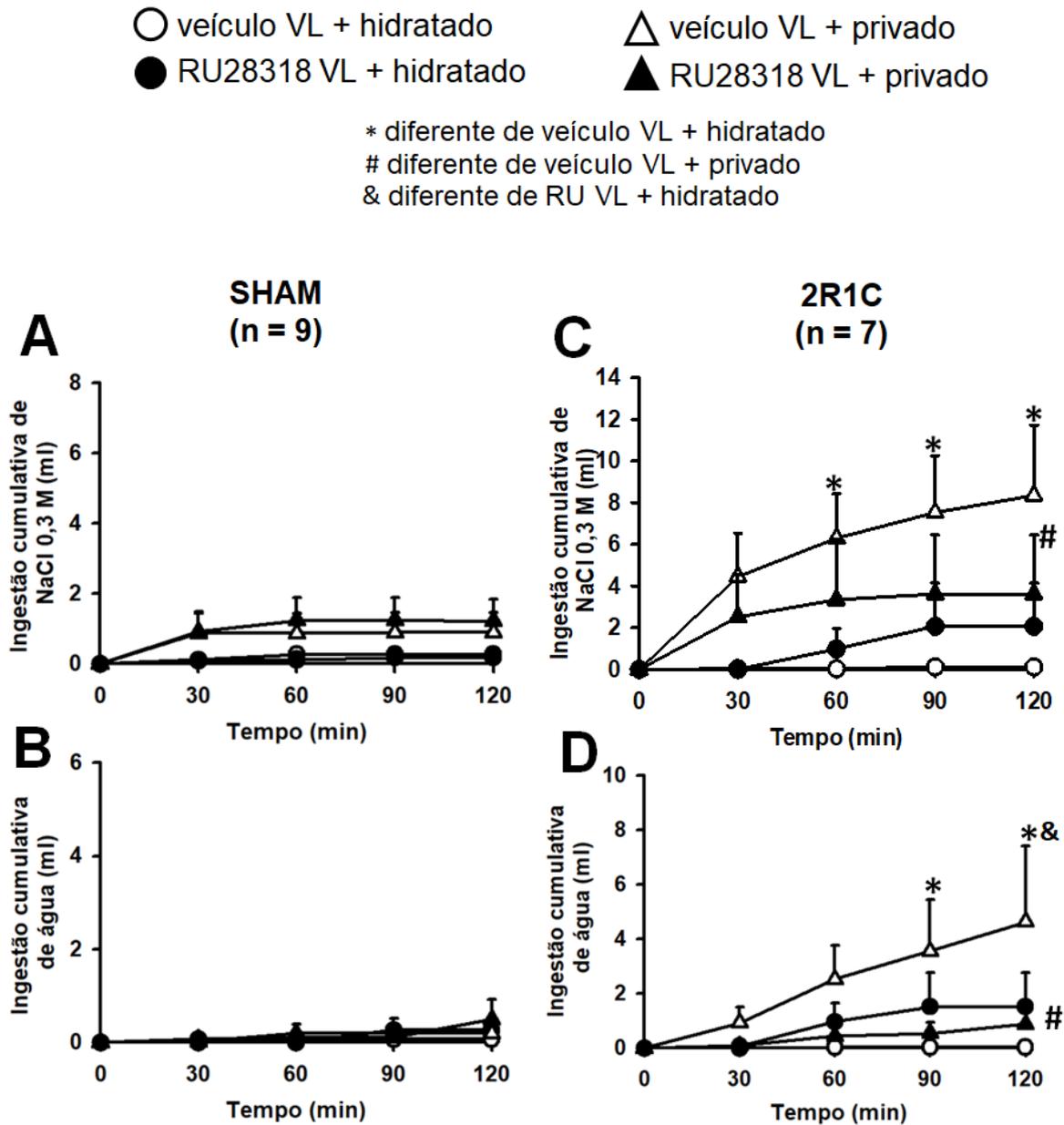


Figura 10: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água durante o teste de apetite ao sódio em ratos (A- B) sham e (C- D) 2R1C hidratados ou privados tratados com veículo (2 μ l) ou RU28318 (100 ng/2 μ l) ou no VL. Os valores estão expressos em média \pm EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

5.4 Efeitos do duplo bloqueio de receptores centrais AT1 e MR no VL no apetite ao sódio e sede induzidos pela privação hídrica de 24 horas em animais 2R1C e sham.

Em ratos sham (n = 5) observamos que o duplo bloqueio de receptores centrais MR e AT1 reduziu a ingestão de água ($15,5 \pm 1,7$ vs. RU28318 + losartan: $8,7 \pm 0,9$ ml/2h) [F (1;4) = 18,429; p < 0,05] durante o teste da sede na privação hídrica. Em relação aos animais 2R1C (n = 6), embora a ingestão de água tenha reduzido durante o teste da sede, não houve diferença significativa após o bloqueio com RU28318 + losartan ($16,6 \pm 2,1$ vs. RU + LOS: $9,2 \pm 2,2$ ml/2 h) [F (1;5) = 3,326; p > 0,05].

Em ratos sham (n = 5), não observamos alterações significativas na ingestão de sódio durante o teste de apetite ao sódio, na ausência ou presença de veículo ou RU28318 + losartan [F (1;4) = 0,312; p > 0,05]. Por outro lado, em ratos 2R1C (n = 6) a ingestão de sódio durante a privação hídrica foi completamente suprimida após o duplo bloqueio de receptores AT1 e MR ($8,5 \pm 1,8$ vs. RU28318 + losartan: $0,4 \pm 0,3$ ml/2 h) [F (1;5) = 15,652; p < 0,05]. O duplo bloqueio não alterou a ingestão de água durante a fase de apetite ao sódio dos animais 2R1C ($2,2 \pm 1,5$ vs. RU28318 + losartan: $0,0 \pm 0,0$ ml/2 h) [F (1;5) = 1,349; p > 0,05] e sham ($0,2 \pm 0,2$ vs. RU28318 + losartan: $0,1 \pm 0,1$ ml/2 h) [F (1;4) = 0,350; p > 0,05].

○ RU28318 + Losartan VL + privado
 ● Veículo + salina VL + privado

* diferente de veículo + salina VL privado

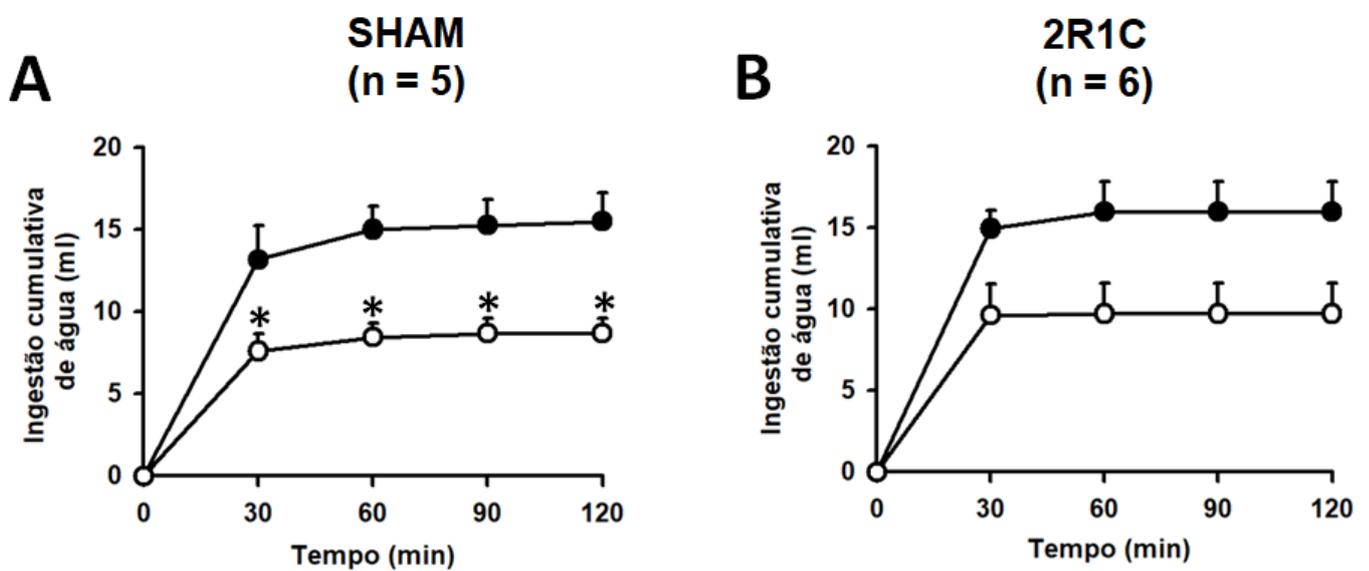


Figura 11: Ingestão cumulativa de água durante o teste da sede em animais sham (A) e 2R1C (B) privados tratados com RU28318 (100 ng/2 μ l) + Losartan (66 μ g/1 μ l) ou veículo (2 μ l) + salina (1 μ l) no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média \pm EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

○ RU28318 + Losartan VL + privado
 ● Veículo + salina VL + privado

* diferente de veículo + salina VL + privado

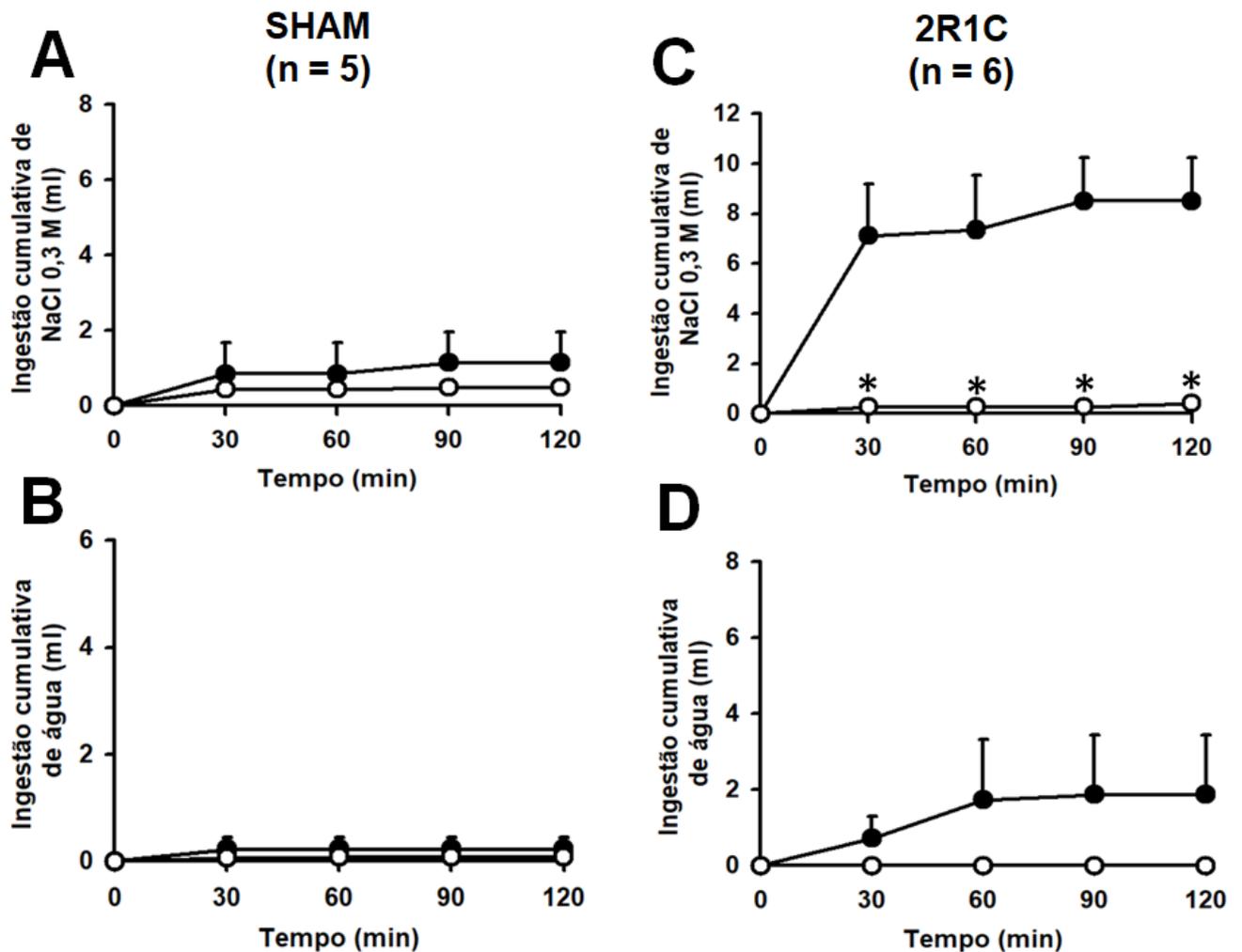


Figura 12: Ingestão cumulativa de água e sódio durante o teste de apetite ao sódio em animais sham (A) e 2R1C (B) privados tratados com RU28318 (100 ng/2 μ l) + Losartan (66 μ g/1 μ l) ou veículo (2 μ l) + salina (1 μ l) no ventrículo lateral (VL). Os valores estão expressos em média \pm EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

5.5 Efeito da injeção de RU28318 e Losartan no VL na PAM e FC de ratos 2R1C ou sham hidratados.

A injeção de losartan (66 µg/1 µl) no VL não alterou a PAM dos animais 2R1C (195 ± 9, vs. salina: 197 ± 10 mmHg) ou sham (108 ± 2, vs. salina: 110 ± 2 mmHg) [F (5;48) = 0,094; p > 0,05]. Efeito semelhante foi observado com a microinjeção de RU28318 (100 ng/2 µl) no VL em ratos 2R1C (188 ± 2, vs. veículo: 187 ± 1 mmHg) ou sham (110 ± 2, vs. veículo: 108 ± 3 mmHg) [F (5;24) = 0,198; p > 0,05]. Losartan não alterou a FC dos animais 2R1C (380 ± 20, vs. salina: 387 ± 14 bpm) e sham (367 ± 11, vs. salina: 379 ± 17 bpm) [F (5;48) = 0,275; p > 0,05]. RU28318 no VL também não alterou a FC de animais 2R1C (371 ± 6 vs. veículo: 370 ± 1 bpm) e sham (375 ± 15 vs. veículo: 383 ± 14 bpm) [F (5;24) = 0,199; p > 0,05].

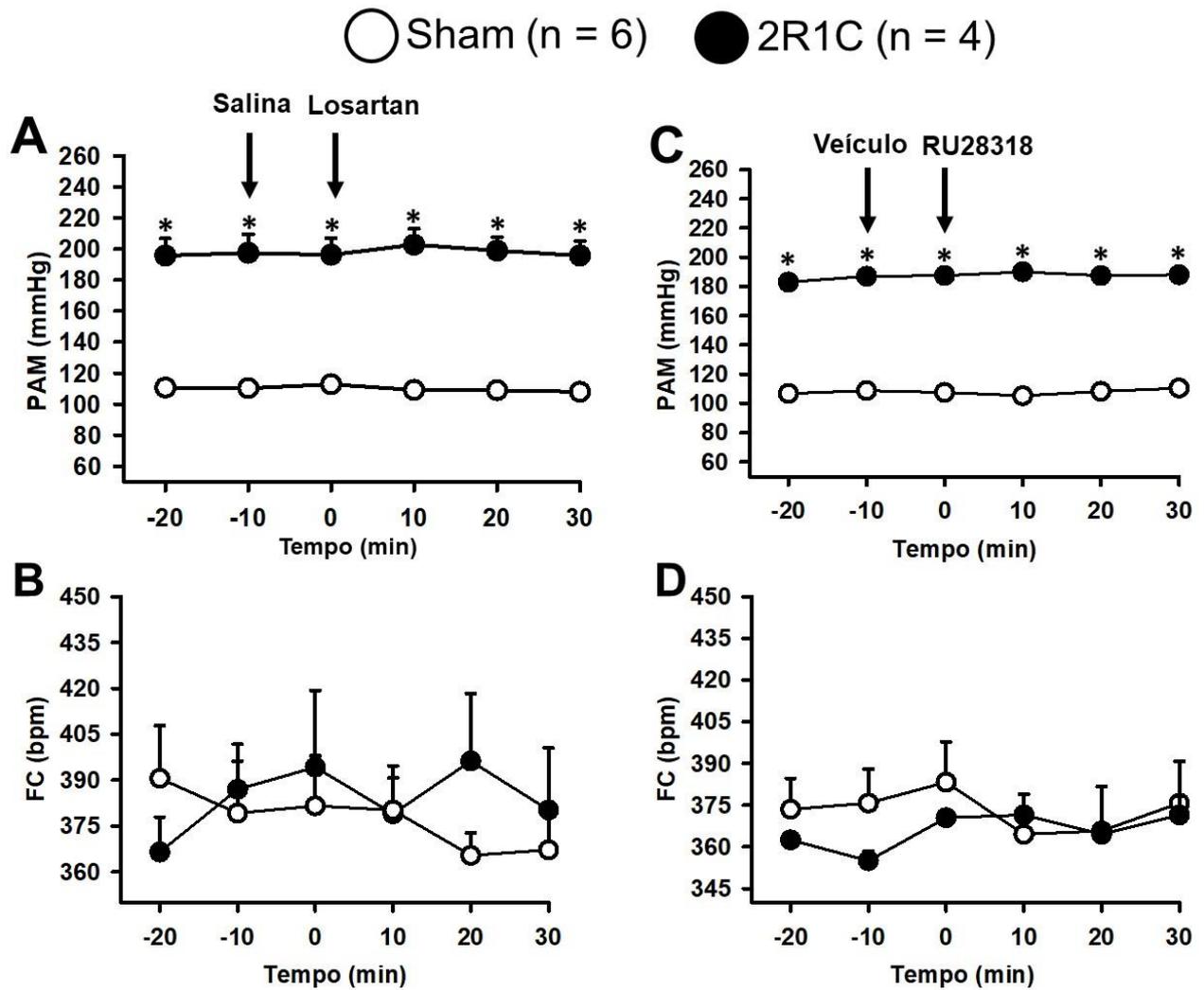


Figura 13: Efeito da injeção no ventrículo lateral (VL) de losartan (66 $\mu\text{g}/1 \mu\text{l}$) ou RU28318 (100 $\text{ng}/2\mu\text{l}$) na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) no VL em animais 2R1C e sham. Os valores estão expressos em média \pm EPM; n = número de animais; análise de variância de duas vias para medidas repetidas seguido do teste Student-Newman-Keuls; $p < 0,05$.

5.6 Histologia

Na figura 14A mostramos o sítio de injeção no VL e na figura 14B mostramos a expressão de neurônios HSD2 no núcleo do trato solitário, bem próximo a borda do quarto ventrículo.

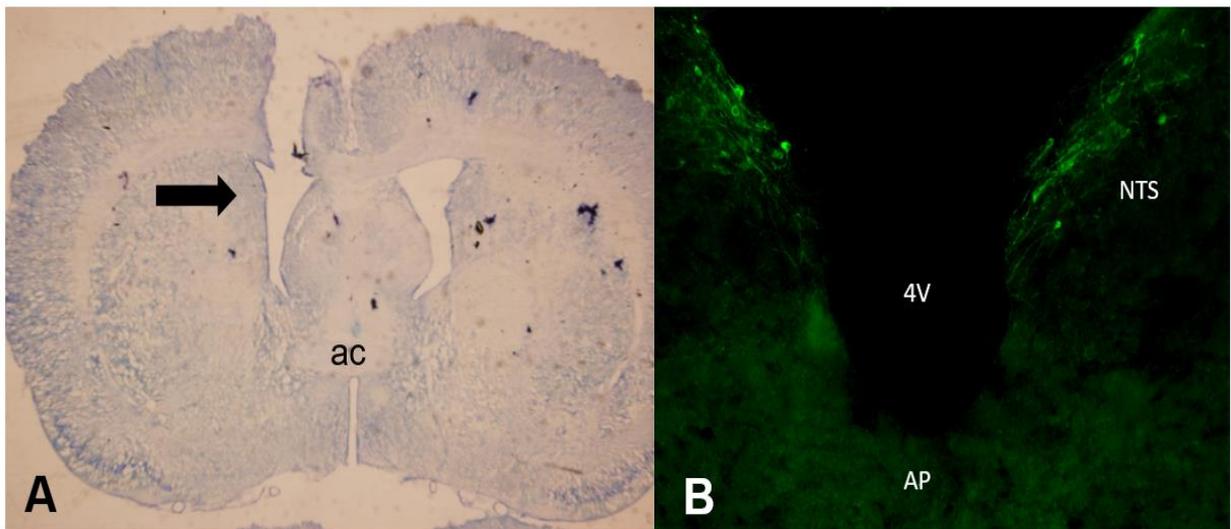


Figura 14: Fotomicrografias de cortes coronais do A) prosencéfalo mostrando o sítio de injeção no ventrículo lateral (seta; magnificação 1,25 X), B) do bulbo mostrando os neurônios marcados imunopositivamente ao HSD2 no núcleo do trato solitário (magnificação 10 X); ac: comissura anterior, NTS: núcleo do trato solitário; 4V: quarto ventrículo; AP: área postrema.

6. Discussão

Os presentes resultados mostram que a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo protocolo de PH-RP em animais 2R1C foi reduzida pelo losartan, antagonista de receptor AT1, e RU28318, antagonista específico para receptor MR, injetados no VL, enquanto que a ingestão de água induzida na fase de sede do protocolo PH-RP foi reduzida pelo pré-tratamento com losartan. Os resultados também mostram que após o bloqueio simultâneo de receptores AT1 e MR, o apetite ao sódio induzido pelo protocolo de PH-RP é completamente suprimido, sugerindo um sinergismo entre os dois hormônios na maior ingestão de sódio hipertônico em animais 2R1C em privação hídrica de 24 horas. Ainda, similar à estudos anteriores (Schoming *et al.*, 1980; Barbel, 1975; Roncari *et al.*, 2018), nossos resultados também mostraram que animais 2R1C apresentam uma maior ingestão diária de água e sódio durante o desenvolvimento da hipertensão à semelhança do que mostramos anteriormente, período no qual o aumento da pressão arterial é mais dependente do aumento do SRA, seguido posteriormente por uma hiperatividade simpática (Oliveira-Sales *et al.*, 2014; Roncari *et al.*, 2018). Ainda demonstramos que os ratos 2R1C não tiveram alteração no peso e que a relação RE/RD estava reduzida, como demonstrada em estudos anteriores (Schoming *et al.*, 1980).

A privação hídrica induz aumento da osmolaridade plasmática e aumento dos níveis de renina, que promovem aumento da ingestão de água (Roncari *et al.*, 2018; Sato *et al.*, 1996). Foi demonstrado também que a privação hídrica aumenta a ativação neuronal no OSF e OVLT (De luca *et al.*, 2002). À semelhança do demonstrado por Roncari (Roncari *et al.*, 2018), animais 2R1C e sham apresentaram ingestão de água comparável durante o teste da sede, mostrando que apesar da ingestão diária de água ser maior em ratos 2R1C, quando submetidos ao teste da sede não houve potencialização da resposta dipsogênica à privação hídrica. Apesar disso, observamos que o antagonismo dos receptores AT1 com losartan no VL reduziu a ingestão de água durante o teste da sede em ambos os grupos, sugerindo que a ingestão de água é parcialmente decorrente da ativação central de receptores AT1. Por outro lado, como era de se esperar o antagonismo de receptores MR não alterou a ingestão de água durante o teste da sede (Geerling e Loewy, 2006).

A privação hídrica também estimula a ingestão de sódio. Dados da literatura já demonstraram que o apetite ao sódio durante a privação hídrica em animais normotensos é dependente das ações da ANG II no SNC (Sato *et al.*, 1996). O

bloqueio icv da ANG II com losartan reduz parcialmente a ingestão de sódio após a privação hídrica de 24 horas (Sato *et al.*, 1996). Estudos já mostraram que danos às estruturas presentes na lâmina terminal prejudica a ingestão de NaCl hipertônico induzido por procedimentos que levam à ativação dos receptores centrais para ANG II (Fitts *et al.*, 1990; Thunhorst *et al.*, 1990; Weisinger *et al.*, 1990). Ainda, foi demonstrado que após a reidratação parcial, a osmolaridade plasmática retorna aos níveis basais, porém o animal ainda continua com níveis elevados de renina (De Luca *et al.*, 2002). Neste mesmo estudo, verificou-se que o aumento observado no número de neurônios positivos ao FOS no OVLT, foi reduzido, mas continuou alto no OSF, sugerindo que áreas centrais envolvidas com o apetite ao sódio ainda estavam ativadas mesmo após o restabelecimento da osmolaridade, provavelmente decorrente dos níveis mais altos de renina, e conseqüentemente ANG II (De Luca *et al.*, 2002). Em nossos animais normotensos, a ingestão de sódio foi de ~1,7 ml. Dados da literatura, inclusive do nosso laboratório, demonstraram que há uma variação entre 1-4 ml de ingestão de NaCl 0,3 M por esse protocolo (Roncari *et al.*, 2018; Sato *et al.*, 1996; De Luca *et al.*, 2002; Pereira-Derderian *et al.*, 2010), porém a semelhança do que vimos anteriormente, no presente estudo ratos 2R1C tiveram uma exagerada ingestão de NaCl 0,3 M induzido pela privação hídrica, que foi reduzida pela injeção de losartan no VL, sugerindo que o maior apetite ao sódio em ratos 2R1C é devido, pelo menos em parte, às ações da ANG II no SNC.

O efeito de redução na ingestão de sódio em ratos 2R1C privados com bloqueio dos receptores AT1, mas não a completa supressão sugere a existência de um mecanismo simultâneo atuando para induzir o apetite ao sódio, e possivelmente a aldosterona possa ter uma função neste efeito (Sakai *et al.*, 1986). Estudos de Epstein e colaboradores foram os primeiros a sugerir a existência de um sinergismo entre ANG II e ALDO na ingestão de sódio, em animais depletados de sódio (Epstein, 1982, 1991; Fluharty e Epstein, 1983; Sakai e Epstein, 1986). Esses estudos mostraram que há um circuito inato no SNC para o apetite ao sódio. ANG II e ALDO, que estão elevados durante uma depleção de sódio, podem ativar esse circuito quando atuam sozinhas no SNC, porém altas doses e uma ação prolongada são necessários. Por outro lado, sua ação sinérgica no circuito evoca um apetite ao sódio mais rapidamente e em doses menores, próximas a parâmetros fisiológicos.

No modelo de privação hídrica, embora os níveis plasmáticos de ALDO não se alterem, existe um balanço negativo de sódio (Huang *et al.*, 1996; De Luca *et al.*,

2002). Estudos sugerem que a secreção de ALDO não ocorre durante a privação hídrica devido ao aumento da osmolaridade plasmática do LEC (Schneider, 1990; Thrasher *et al.*, 1984). A hipertonicidade do LEC inibe a liberação de ALDO pelas células glomerulosa da adrenal (Schneider, 1990). Childers e Schneider (1981) avaliaram o efeito da infusão de soluções de NaCl hipertônica e hipotônica em cães e observou que a infusão hipertônica diminuía os níveis plasmáticos de ALDO, enquanto que a infusão hipotônica tinha efeito oposto (Childers e Schneider, 1981). Esse estudo sugere que a osmolaridade plasmática de sódio influencia na secreção de ALDO. Outro estudo, feito em cães desidratados, mostrou que após a reidratação parcial há um aumento na secreção de ALDO, possivelmente devido a normalização da osmolaridade. Além disso, esses animais também apresentaram maior retenção de sódio, provavelmente devido ao efeito da ALDO (Thrasher *et al.*, 1984).

Animais 2R1C apresentam aumento na concentração plasmática de ALDO (Martinez-Maldonado, 1991). Possivelmente, a redução da ingestão de sódio com o bloqueio de receptores MR observada em nossos resultados sugere que a aldosterona poderia estar participando da ingestão de sódio em animais 2R1C desidratados. Ainda, quando fizemos o duplo bloqueio de receptores centrais MR e AT1, nos animais 2R1C a ingestão de sódio foi completamente abolida. Nossos dados sugerem que, similar ao sugerido pelos trabalhos de Epstein, em animais 2R1C desidratados os dois hormônios individualmente participam do apetite ao sódio e que possivelmente há um sinergismo entre eles.

Nossos dados são similares ao estudo de Sakai e colaboradores (1996) (Sakai *et al.*, 1996) onde foi demonstrado que o bloqueio de receptores MR centrais, mas não periférico com RU28318 reduz, mas não elimina completamente o apetite ao sódio em animais normotensos depletados de sódio. Ainda, quando o bloqueio central de receptores MR é combinado com captopril sistêmico, para prevenir a formação endógena de ANG II durante a depleção de sódio, o apetite ao sódio é completamente suprimido (Sakai *et al.*, 1996).

Estudos mais recentes têm sugerido a ação da ALDO em áreas do tronco encefálico controlando o apetite ao sódio (Geerling *et al.*, 2006). Trabalhos neuroanatômicos identificaram neurônios no núcleo do trato solitário (NTS) que expressam além do receptor MR, a enzima 11- β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo 2 (HSD2), que cliva o cortisol/corticosterona, presente em concentrações muito mais altas do que a aldosterona no SNC, em um metabólito com pouca afinidade ao

MR, aumentando a probabilidade da aldosterona se ligar ao MR e ter seus efeitos. Esses neurônios são ativados durante uma hipovolemia e após a ingestão de sódio sua ação é inibida (Geerling *et al.*, 2006; Geerling *et al.*, 2007).

Além disso, estudos já tem demonstrado uma interação entre a ALDO e ANG II atuando no tronco encefálico e no prosencéfalo, respectivamente, no controle do apetite ao sódio em animais normotensos (Gasparini *et al.*, 2019; Resch *et al.*, 2017). A infusão crônica de aldosterona no IV ventrículo estimula a ingestão de sódio hipertônico e a administração de losartan no VL reduz essa ingestão. Nesse estudo é sugerido que os mecanismos angiotensinérgicos no prosencéfalo são importantes para a ingestão de sódio induzida pela aldosterona no IV ventrículo (Gasparini *et al.*, 2019). Outro estudo mostrou que os neurônios positivos ao MR e a HSD2 no NTS, são ativados pela aldosterona e se projetam para algumas regiões prosencefálicas, tais como o núcleo do leito da estria terminal (Geerling e Loewy, 2006). Essa região parece estar envolvida no apetite ao sódio, uma vez que os neurônios sensíveis a ANG II no OSF e OVLT também mandam projeções glutamatérgicas diretas para essa região (Matsuda *et al.*, 2016).

Ao contrário da infusão crônica, a infusão aguda de aldosterona no IV ventrículo não altera a ingestão de sódio diária em animais hidratados (Formenti *et al.* 2012; Gasparini *et al.*, 2019). Nos animais 2R1C, ocorre uma ativação crônica do SRAA. Dessa maneira, um possível mecanismo que pode estar envolvido é a atuação da ALDO periférica no SNC, possivelmente nos neurônios sensíveis a ALDO, contribuindo para a potencialização da ingestão de sódio observada nesses animais desidratados. Os neurônios sensíveis a aldosterona estão localizados ventralmente a área postrema (AP), um órgão circumventricular sem barreira hematoencefálica e que se projeta para o NTS, dessa forma a ALDO periférica poderia chegar nessa estrutura (Geerling *et al.*, 2006). Já foi demonstrado que os neurônios HSD2 são ativados durante a infusão de aldosterona no IV ventrículo. A ingestão de NaCl 0,3 M é reduzida após knockdown de receptores MR no NTS (Koneru *et al.*, 2014). Embora nossos resultados apontem para essa direção, mais estudos são necessários afim de elucidar as vias neurais envolvidas na ingestão de sódio durante a PH em animais 2R1C.

O aumento da ingestão de NaCl 0,3 M durante a privação hídrica em animais 2R1C é similar ao encontrado nos animais espontaneamente hipertensos (SHR) (Di Nicolantino, 2004). Em animais SHR, a maior ingestão de sódio é decorrente do mecanismo envolvendo maior ativação do SRA central. Esses animais têm maior

ativação do OSF e OVLT, bem como potencialização do apetite ao sódio induzido por privação hídrica (Pereira-Derderian *et al.*, 2010). Não sabemos até o momento se os ratos 2R1C submetidos à privação hídrica tem maior atividade neuronal nessas áreas. Um experimento que ainda vamos realizar é verificar se animais 2R1C tem maior atividade neuronal (marcador c-Fos) em neurônios imunopositivos ao HSD2 do NTS.

Durante o teste de apetite ao sódio, animais 2R1C também apresentaram uma maior ingestão de água. Após o bloqueio com losartan ou RU28318 no VL, a ingestão de água diminuiu concomitantemente com a redução da ingestão de sódio. Portanto, o aumento da osmolaridade plasmática, devido a maior ingestão de NaCl 0,3 M nesse período, poderia estar estimulando a ingestão de água. Com o bloqueio simultâneo de receptores AT1 e MR, nos animais sham observamos o esperado, isto é a redução da ingestão de água durante o teste da sede. No entanto, nos animais 2R1C, embora a ingestão de água tenha demonstrado uma tendência de redução, não houve diferença estatística. Essa diferença de resultado possivelmente decorreu do número baixo de animais hipertensos. Mais experimentos estão sendo feitos para aumentar o número de animais 2R1C e sham.

Outra questão que analisamos foi a possível interação entre alterações de pressão arterial e a ingestão de água e/ou sódio. Foi descrito que um aumento de pressão arterial pode inibir a ingestão de água e de sódio, enquanto que a redução de pressão tem um efeito facilitatório sobre esses comportamentos (Eweved, 1992; Thunhorst e Johnson, 1993). Estudos mostram que a ALDO icv está relacionada com: aumento da ingestão de sódio e aumento da pressão arterial (Sakai *et al.*, 1996; Gomez-sanchez, 1986). Em ratos normotensos, o bloqueio de receptores centrais MR com RU28318 causa uma redução a longo prazo da pressão arterial (2 e 8 horas após a injeção icv) (Van den Berg *et al.*, 1990). Em nossos animais sham, não observamos uma redução da pressão arterial ao administrarmos RU28318 icv. No entanto, uma possível explicação para a diferença entre esse estudo e nossos resultados é o tempo de registro da pressão arterial.

Em relação aos animais 2R1C, a injeção de RU28318 também não alterou a pressão arterial nesses animais. Esse resultado é similar ao encontrado em animais SHR, onde a injeção de RU28318 no VL não altera a pressão arterial (Rahmouni *et al.*, 2001). Similar ao encontrado por Sato (Sato *et al.*, 1996), o bloqueio de receptores AT1 não alterou a PA nos animais 2R1C e sham. Portanto, a redução da potencialização da ingestão de sódio nos ratos 2R1C após a privação hídrica quando

do pré-tratamento com antagonista de receptores AT1 ou MR icv não pode ser decorrente de alterações na pressão arterial, pois não houve alteração neste parâmetro. Embora os níveis pressóricos de ratos 2R1C não sejam alterados na fase de platô (4-6 semanas) se os animais recebem ração normossódica e apenas solução de NaCl 1% para beber, há uma maior lesão glomerular nesses animais, sugerindo que uma hiperativação do apetite ao sódio neste tipo de hipertensão, poderá ao longo prazo causar disfunções renais (Jackson e Navar, 1986; Liu *et al.*, 1993).

7. Conclusão

Em conclusão, nossos resultados mostram que a ingestão de água em animais sham e 2R1C durante o teste da sede é decorrente da ativação de receptores AT1 para angiotensina II no prosencéfalo. Em relação a ingestão de sódio, os resultados mostram a participação dos receptores AT1 e MR no apetite ao sódio induzido por privação hídrica em animais 2R1C. Embora não existam estudos ainda mostrando que há ativação dos neurônios sensíveis a aldosterona no modelo de hipertensão renovascular e, levando em consideração que só foram identificados neurônios sensíveis a aldosterona no NTS, nossos resultados indicam a participação dos neurônios angiotensinérgicos no prosencéfalo e possivelmente neurônios sensíveis a aldosterona no tronco cerebral, atuando em sinergismo no maior apetite ao sódio de animais 2R1C privados de água. Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos neurais.

8. REFERÊNCIAS

- B, W. *et al.* 2018 ESC / ESH Guidelines for the management of arterial hypertension The Task Force for the management of arterial hypertension of the European Society of Cardiology and the European Society of Hypertension. **Hypertension**, n. August, p. 1953–2041, 2018.
- BARBEL, M. P. M. M. J. Salt Appetite during the Early Phase of Renal Hypertension in Rats. **Pflugers Arch**, v. 158, p. 153–158, 1975.
- BERG, D. T. W. . VAN DEN; KLOET, E. . DE; DIJEN, H. . VAN. Differential Central Effects of Mineralocorticoid and Glucocorticoid Agonists and Antagonists on Blood Pressure*. **Endocrinology**, v. 126, n. 1, p. 118–124, 1990.
- BLANCH, G. T. *et al.* Increased expression of angiotensin II type 2 receptors in the solitary-vagal complex blunts renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 64, n. 4, p. 777–783, 2014.
- BRIET, M.; SCHIFFRIN, E. L. Aldosterone : effects on the kidney and cardiovascular system. **Nature Reviews Nephrology**, v. 6, n. 5, p. 261–273, 2010.
- C, BARNEY, C.; THREATTE, R. M.; FREGLY, M. J. Water deprivation-induced drinking in rats: Role of angiotensin II. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 13, n. 2, p. 244–248, 1983.
- CHILDERS, J. W.; SCHNEIDER, E. G. Effect of hypertonic and hypotonic infusions on aldosterone in conscious sodium-depleted dogs. **Clinical Science**, v. 61, p. 191–199, 1981.
- COIRINI, H. *et al.* Identification of mineralocorticoid binding sites in rat brain by competition studies and density gradient centrifugation. **Neuroendocrinology**, v. 37, n. 5, p. 354–360, 1983.
- EPSTEIN, A. N. Mineralocorticoids and Cerebral Angiotensin May Act Together to Produce Sodium Appetite. **Peptides**, v. 3, p. 493–494, 1982.
- ____. Neurohormonal Control of Salt Intake in the Rat. **Brain Research**, v. 27, n. 20, p. 315–320, 1991.
- EVEWED, M. D. Investigating the role of angiotensin II in thirst: Interactions between arterial pressure and the control of drinking'. **Can. J. Physiol. Pharmacol**, v. 70, p. 791–797, 1992.
- FITTS, D. A.; TJEPKES, D. S.; BRIGHT, R. O. Salt Appetite and Lesions of the Ventral Part of the Ventral Median Preoptic Nucleus. **Behavioral Neuroscience**, v. 104, n. 5, p. 818–827, 1990.
- FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 3, p. 583–686, 1998.
- FLUHARTY, S. J.; EPSTEIN, A. N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, n. 5, p. 746–758, 1983.
- FUNDER, J.; MYLE, K. Exclusion of Corticosterone from Epithelial Mineralocorticoid Receptors Is Insufficient for Selectivity of Aldosterone Action: In Vivo Binding Studies. **Endocrinology**, v. 137, n. 12, p. 5264–5268, 1996.
- FUNDER, J. W. How do central mineralocorticoid receptors modulate blood pressure ? **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 6, p. 356–357, 2005.
- GASPARINI, S. *et al.* Aldosterone infusion into the 4th ventricle produces sodium appetite with baroreflex attenuation independent of renal or blood pressure changes. **Brain Research**, 2018.

GASPARINI, S. *et al.* Interaction of central angiotensin II and aldosterone on sodium intake and blood pressure. **Brain Research**, v. 1720, n. March, p. 146299, 2019.

GASPARO, M. DE; UNGER, T. International Union of Pharmacology . XXIII . The. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. October, p. 415–472, 2000.

GEERLING, J. C.; KAWATA, M.; LOEWY, A. D. Aldosterone-sensitive neurons in the rat central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, v. 494, n. 3, p. 515–527, 2006.

GEERLING, JOEL C; LOEWY, A. D. Aldosterone-Sensitive Neurons in the Nucleus of the Solitary Tract : **The Journal of comparative Neurology**, v. 250, n. September 2005, p. 223–250, 2006.

GEERLING, JOEL C.; LOEWY, A. D. Sodium depletion activates the aldosterone-sensitive neurons in the NTS independently of thirst. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 3, p. 1338–1349, 2006.

____. Central regulation of sodium appetite. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 2, p. 177–209, 2008.

GOLDBLATT, B. Y. H. *et al.* Studies on experimental hypertension: the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. **J. Exp. Med**, v. 59, p. 347–379, 1934.

GOMEZ-SANCHEZ, E. P. Intracerebroventricular Infusion of Aldosterone Induces Hypertension in Rats*. **Endocrinology**, v. 118, n. 2, p. 819–823, 1986.

GÓMEZ - SANCHEZ, E. Central Hypertensive Effects of Aldosterone. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 462, n. 18, p. 440–462, 1997.

GROSS, P. M. *et al.* Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 259, n. 6 28-6, p. 1131–1138, 1990.

HANDA, B. Y. R. K.; JOHNS, E. J. INTERACTION OF THE RENIN-ANGIOTENSIN SYSTEM AND THE RENAL NERVES IN THE REGULATION OF RAT KIDNEY FUNCTION BY R. K. HANDA AND EDWARD J. JOHNS From the Department of. **Journal of physiology**, v. 369, p. 311–321, 1985.

HUANG, W. A. N.; ARNASON, S. Dehydration is mediated natriuresis by oxytocin in male rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 39, p. 427–433, 1996.

J.MORRIS, M.; S.NA, E.; JOHNSON, A. K. Salt craving: The psychobiology of pathogenic sodium intake. **Physiology and Behavior**, v. 96, n. 5, p. 709–721, 2008.

JACKSON, C. A.; NAVAR, L. G. Arterial Pressure and Renal function in Two-Kidney, One clip Goldblatt Hypertensive Rats Maintained on a High-Salt intake. **Journal of hypertension**, v. 4, p. 215–221, 1986.

JOHNSON, A. K. I. M.; GROSS, P. M. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. **FASEB J**, v. 7, p. 678–686, 1993.

KASCHINA, E.; UNGER, T. Angiotensin AT1 / AT2 Receptors : Regulation , Signalling and Function. **Blood Pressure**, v. 12, p. 70–88, 2003.

KONERU, B. *et al.* Mineralocorticoid receptor in the NTS stimulates saline intake during fourth ventricular infusions of aldosterone. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 306, n. 15, p. 61–67, 2014.

LEENEN, F. H. H. *et al.* Changes in the renin-angiotensin-aldosterone system and in sodium and potassium balance during development of renal hypertension in rats. **clinical Science and molecular medicine**, v. 48, p. 17–26, 1975.

- LINCEVICIUS, G. S. *et al.* Aldosterone Contributes to Sympathoexcitation in Renovascular Hypertension. **American Journal of Hypertension**, v. 28, n. 9, p. 1083–1090, 2015.
- LIU, D. T. *et al.* Effect of dietary sodium chloride on the development of renal glomerular and vascular lesions in hypertensive rats. **Clinical and experimental pharmacology & Physiology**, v. 20, n. September, p. 763–772, 1993.
- LOFFING, J.; KORBMACHER, C. Regulated sodium transport in the renal connecting tubule (CNT) via the epithelial sodium channel (ENaC). **Eur J Physiol**, v. 458, p. 111–135, 2009.
- LUCA, L. A. DE *et al.* Water deprivation-induced sodium appetite: Humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 2 51-2, p. 552–559, 2002.
- MARTINEZ-MALDONADO, M. Pathophysiology of renovascular hypertension. **Hypertension**, v. 17, n. 5, p. 707–719, 1991.
- MATSUDA, T. *et al.* Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. **Nature Publishing Group**, n. June, 2016.
- NICOLANTINO, R. DI. Why does the spontaneously hypertensive rat have an exaggerated preference for sweet and salty solutions ? An hypothesis. **Journal of hypertension**, v. 22, p. 1649–1654, 2004.
- OLIVEIRA-SALES, E. B. *et al.* Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**, v. 183, p. 23–29, 2014.
- ____. Sympathetic overactivity occurs before hypertension in the two-kidney, one-clip model. **Experimental Physiology**, v. 101, n. 1, p. 67–80, 2016.
- ORGANIZATION., W. H. A global brief on Hypertension World Health Day 2013. 2013.
- PARDRIDGEF, W. M. Transport of Protein-Boun Hormones into Tissues in Vivo*. **EndocrineReviews**, v. 2, n. 1, 1981.
- PEREIRA-DERDERIAN, D. T. . *et al.* Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, p. 1298–1309, 2010.
- QUARTERMAIN, D.; MILLER, N. E.; WOLF, G. ROLE OF EXPERIENCE IN RELATIONSHIP BETWEEN SODIUM DEFICIENCY AND RATE OF BAR PRESSING FOR SALT. **Journal of Comparative and Phsiological Psychology**, v. 63, n. 3, p. 417–420, 1967.
- RAHMOUNI, K. *et al.* Involvement of Brain Mineralocorticoid Receptor in Salt-Enhanced Hypertension in Spontaneously Hypertensive Rats. **Hypertension**, v. 38, p. 902–906, 2001.
- RESCH, J. M. *et al.* Aldosterone-Sensing Neurons in the NTS Exhibit State-Dependent Pacemaker Activity and Drive Sodium Appetite via Synergy with Angiotensin II Signaling. **Neuron**, v. 96, n. 1, p. 190- 206.e7, 2017.
- RICE, K. K.; RICHTER, C. P. Increased sodium chloride and water intake of normal rats treated with desoxycorticosterone acetate. **Endocrinology**, v. 33, n. 2, p. 106–115, 1943.
- RICHTER, C. P. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. **Journal of phisiology**, v. 115, p. 155–161, 1935.
- ROBERT, L.; KIM, A.; EFFECTS, J. Effects of arterial pressure on drinking and urinary responses to intracerebroventricular angiotensin II. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 33, p. 211–217, 1993.

RONCARI, C. F. *et al.* Enhanced angiotensin II induced sodium appetite in renovascular hypertensive rats. **Peptides**, v. 101, p. 82–88, 2018.

SAKAI, R. R.; NICOLAIDIS, S.; EPSTEIN, A. N. Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin II and aldosterone. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 251, n. 4, p. 762–768, 1986.

SATO, M. A.; YADA, M. M.; LUCA, L. A. DE. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. **Physiology and Behavior**, v. 60, n. 4, p. 1099–1104, 1996.

SCHNEIDER, E. G. In Water Deprivation , Osmolality Becomes an Important Determinant of Aldosterone Secretion. **Physiology**, v. 5, p. 197–201, 1990.

SCHOMIG, A. ET AL. Fluid and salt intake during the development of renal hypertension in rats. **Clinical and experimental pharmacology & Physiology**, v. 7, p. 169–182, 1980.

SUMNERS, C. *et al.* Angiotensin type 2 receptors: Blood pressure regulation and end organ damage. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 21, p. 115–121, 2015.

THRASHER, T. N. *et al.* Sodium balance and aldosterone during dehydration and rehydration in the dog. **Journal of physiology**, p. 0–7, 1984.

THUNHORST, R. L.; EHRLICH, K. J.; SIMPSON, J. B. Subfornical Organ Participates in Salt Appetite. **Behavioral Neuroscience**, v. 104, n. 4, p. 637–642, 1990.

THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. **American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 35, n. 266, p. 458–465, 1994.

WAGMAN, W. Sodium Chloride Deprivation: Development of Sodium Chloride as a Reinforcement. **Science**, v. 140, p. 1403–1404, 1963.

WEISINGER, R. S. *et al.* Subfornical organ lesion decreases sodium appetite in the sodium-depleted rat. **Brain Research**, v. 526, n. 1, p. 23–30, 1990.

WELCH, W. J. *et al.* Roles of Oxidative Stress and AT 1 Receptors in Renal Hemodynamics and Oxygenation in the. **Hypertension**, v. 41, p. 692–696, 2003.

WOLF, G.; HANDAL, P. J. Aldosterone-Induced Sodium Appetite: Dose-Response and Specificity. **Endocrinology**, n. November, p. 1120–1124, 1966.

ZHANG, Z. *et al.* Aldosterone acts centrally to increase brain renin-angiotensin system activity and oxidative stress in normal rats. v. 52242, p. 1067–1075, 2008.