

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**“Envolvimento dos receptores AT<sub>1</sub> e do óxido nítrico na ingestão de NaCl 0,5 M e nas respostas dipsogênicas, renais e pressoras produzidas pela angiotensina II injetada na área septal lateral”**

**Gustavo Garcia**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas, área de concentração: Fisiologia

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**“Envolvimento dos receptores AT<sub>1</sub> e do óxido nítrico na ingestão de NaCl 0,5 M e nas respostas dipsogênicas, renais e pressoras produzidas pela angiotensina II injetada na área septal lateral”**

**Gustavo Garcia**

**Orientador: Prof. Dr. Wilson Abrão Saad**

## DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu pai  
(in memoriam) que marcou a minha  
vida com ensinamentos e  
sentimentos...

## AGRADECIMENTOS

A Deus, esta força superior que nos guia e nos conduz no caminho correto.

Ao prof. Dr. Wilson Abrão Saad, pela amizade, pelo apoio nos momentos de dificuldade e pela orientação atribuída.

Ao prof. Dr. Luís A. A. Camargo, pela disponibilidade e apoio na realização deste trabalho.

Ao prof. Dr. José Vanderlei Menani, pela revisão realizada, de grande valia.

Aos funcionários do departamento da FOA-UNESP-Araraquara, Silas, Ana, Reginaldo, Silvana e Silvia, pela disponibilidade e cooperação na realização deste trabalho.

À minha mãe, Clayr, que sempre batalhou por este momento e a quem agradeço de coração e serei eternamente grato.

À minha esposa, Valéria, que me deu o apoio e o ânimo necessário, na hora certa.

Ao meu irmão, Ricardo, pelo auxílio na confecção do material didático e pelas idas e vindas até São Carlos.

À Universidade Federal de São Carlos e à UNESP-Araraquara, Instituições que possibilitaram a concretização deste mestrado.

Aos órgãos de fomento CAPES e CNPq.

Aos demais familiares e colegas, que direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração representativa das principais conexões da área septal lateral.....	10
Figura 2 - Modelo esquemático mostrando a atuação da ANG II central.....	13
Figura 3 - Modelo esquemático para explicar a formação de NO centralmente.....	14
Figura 4 - Modelo esquemático para explicar os objetivos do presente estudo.....	16
Figura 5 - Fotomicrografia de um corte transversal mostrando o local da injeção na área septal lateral (ASL).....	21
Figura 6 - Gráfico - Ingestão de água (ml/120 min).....	24
Figura 7 - Gráfico - Ingestão de NaCl 0,5 M (ml/120 min).....	25
Figura 8 - Gráfico - Volume urinário (ml/120 min).....	27
Figura 9 - Gráfico - Excreção urinária de Na <sup>+</sup> (μEq/120 min).....	28
Figura 10 - Gráfico - Aumento da pressão arterial média (mmHg).....	30

**SUMÁRIO**

RESUMO.....	8
ABSTRACT.....	9
INTRODUÇÃO.....	10
OBJETIVOS.....	16
MATERIAL E MÉTODOS.....	17
Animais.....	17
Cirurgia cerebral.....	17
Microinjeções cerebrais.....	18
Ingestão de água e de NaCl 0,5 M.....	18
Excreção de urina e de sódio.....	19
Medida da pressão arterial.....	20
Histologia.....	21
Estatística.....	22
RESULTADOS.....	23
DISCUSSÃO.....	31
CONCLUSÕES.....	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANG II – angiotensina II

AS – área septal lateral

ASL – área septal lateral

ECA – enzima conversora de angiotensina

ip – intraperitonal

Los – losartan

7-NI – 7-nitroindazol

NO – óxido nítrico

PAM – pressão arterial média

PE – polietileno

Sal – salina

SNA – sistema nervoso autônomo

SNC – sistema nervoso central

UI – unidades internacionais

## RESUMO

Nesse estudo, investigamos a participação dos receptores AT<sub>1</sub> e do óxido nítrico (NO) na área septal lateral (ASL), sobre a ingestão de água, ingestão de NaCl 0,5 M, natriurese, diurese e resposta pressora induzida pela injeção de angiotensina II (ANG II) na mesma área. Foram utilizados ratos Holtzman pesando de 280 a 320 g, com cânulas de aço inoxidável implantadas estereotaxicamente na ASL. A ANG II (25 ng/0,5 µl) injetada na ASL, induziu ingestão de água e de sódio e aumentou o volume urinário, excreção urinária de sódio e pressão arterial quando comparado ao grupo controle, que recebeu NaCl 0,15 M. O pré-tratamento com losartan (antagonista dos receptores angiotensinérgicos AT<sub>1</sub>) na ASL aboliu a ingestão de água, a ingestão de sódio e o efeito pressor induzido pela ANG II. O losartan também reduziu o aumento de volume urinário e da excreção de sódio induzidos pela ANG II. O tratamento prévio com 7-nitroindazol (inibidor da enzima óxido nítrico sintase) aboliu a ingestão de água e o aumento de volume urinário, diminuiu a ingestão de sódio e o efeito natriurético e não modificou o efeito pressor induzido pela ANG II. Os resultados mostram o envolvimento dos receptores angiotensinérgicos AT<sub>1</sub> e do NO na ASL no controle do equilíbrio hidroeletrólítico e cardiovascular, além de uma possível interação entre mecanismos angiotensinérgicos e nitrérgicos da ASL nesse controle.

**Palavras-chaves:** angiotensina II, óxido nítrico, sistema nervoso central, controle hidroeletrólítico e cardiovascular

**ABSTRACT**

In this study, we investigated the participation of the AT<sub>1</sub> receptors and of the nitric oxide (NO) into lateral septal area (LSA), on the water intake, 0,5 M NaCl intake, natriuresis, diuresis and pressor response induced by injection of angiotensin II (ANG II) in the same area. Male Holtzman rats were used weighing between 280 and 320 g, with cannulae of stainless steel implanted stereotactically into the LSA. The ANG II (25 ng/0,5 µl) injected into LSA, induced water and sodium intake and increased the urinary volume, sodium urinary excretion and arterial pressure when compared with the control group, that received 0,15 M NaCl. The pretreatment with losartan (antagonist of the AT<sub>1</sub> angiotensin receptors) into LSA abolished the water intake, the sodium intake and the pressor effect induced by ANG II. The losartan also reduced the increase of urinary volume and of the sodium excretion induced by ANG II. The previous treatment with 7-nitroindazole (inhibit of the nitric oxide synthase enzyme) abolished the water intake and the increase of urinary volume, decreased the sodium intake and the natriuretic effect and no changed the pressor effect induced by ANG II. The results show the involvement of the AT<sub>1</sub> angiotensinergic receptors and of the nitric oxide into LSA in the control of the cardiovascular and hydroelectrolytic balance, beyond a possible interaction between nitrenergic and angiotensinergic mechanisms of the LSA in this control.

**Keywords: angiotensin II, nitric oxide, central nervous system, cardiovascular and hydroelectrolytic control**

## INTRODUÇÃO

A área septal (AS) está situada abaixo do rostro do corpo caloso e dorsal à comissura anterior<sup>[1]</sup>. Compreende grupos de neurônios de disposição subcortical conhecidos como núcleos septais, entre os quais a área septal lateral (ASL), que foi objeto do presente estudo. A AS tem conexões extremamente amplas e complexas, destacando-se suas projeções para o hipotálamo, através do feixe prosencefálico medial (Figura 1).

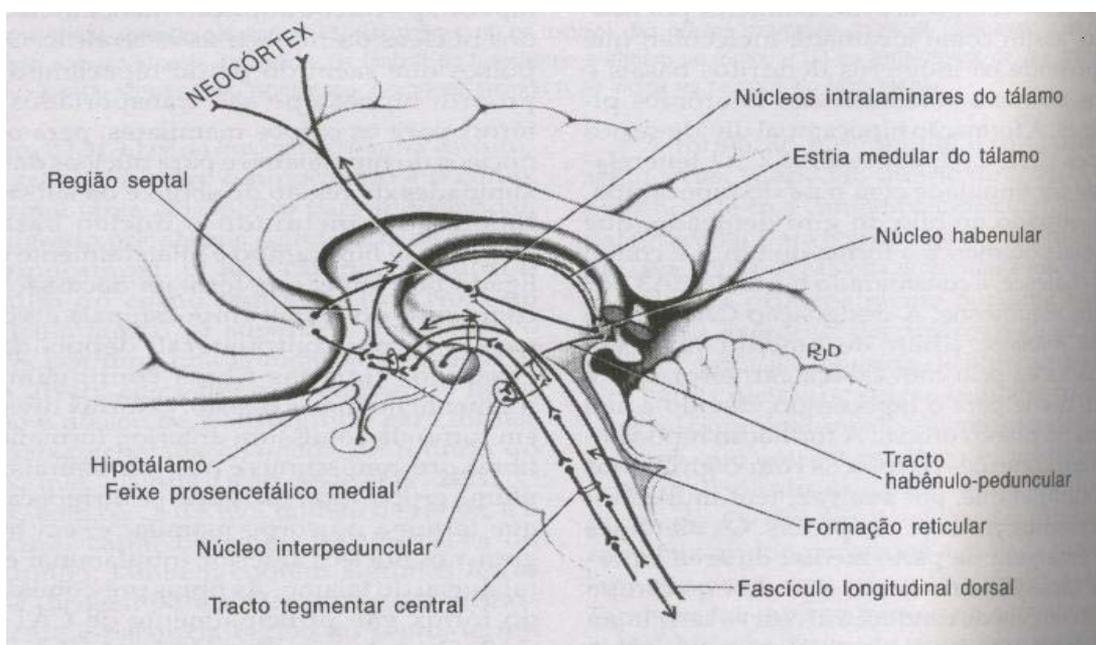


Figura 1. Ilustração representativa das principais conexões da área septal, destacando-se a conexão com o hipotálamo. MACHADO A.B.M., 1993. Neuroanatomia Funcional, 2ª edição, editora Atheneu, p.: 278-282.

Existe um circuito intrínseco que conecta a AS, a amígdala e o hipotálamo. Este circuito, quando é interrompido em diferentes pontos, interfere na ingestão de água e de sódio [COVIAN M.R.]. A água é de fundamental importância para a vida, constituindo aproximadamente 70% do peso corpóreo humano. Na sua composição encontramos muitos

eletrólitos, como o sódio, cátion de grande incidência no líquido extracelular (LEC), importante na manutenção da osmolaridade e da vida. O perfeito funcionamento das células depende da manutenção da osmolaridade dentro de pequenos limites de variação, por meio de adequada ingestão e excreção de água e sódio. Portanto, este comportamento de ingestão irá influenciar na manutenção da pressão arterial em níveis normais, a fim de que haja perfeita irrigação dos tecidos.

Assim como as demais estruturas do sistema límbico, a AS está relacionada primordialmente com a regulação dos processos emocionais, controle do sistema nervoso autônomo (SNA) e dos processos motivacionais essenciais à sobrevivência<sup>[1]</sup>. Tem também importante participação na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico e cardiovascular do organismo [FRANCI E COLS., LEITE E COLS., MORITA E COLS., CAMARGO E COLS., GELSEMA E CALARESU, LUIZ E COLS.]. COLOMBARI E COLS. mostraram a importância da AS nas respostas pressoras e natriuréticas induzidas pela ativação colinérgica do órgão subfornical no rato e nas respostas pressoras e dipsogênicas induzidas pela injeção de ANG II na mesma área.

Atualmente dois subtipos de receptores da angiotensina II (ANG II), AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, têm sido identificados com base em antagonistas seletivos. Embora a maior parte dos núcleos cerebrais contenha somente um subtipo de receptor da ANG II, alguns núcleos expressam uma mistura de receptores AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub> [LENKEI E COLS., SONG E COLS.]. Ambos receptores angiotensinérgicos, AT<sub>1</sub> e AT<sub>2</sub>, são encontrados na ASL [WRIGHT E HARDING]. BLASS E COLS. demonstraram que animais com lesão eletrolítica da AS apresentavam hiperdipsia quando comparados à estimulação por ANG II.

Durante estados de hipovolemia, há uma diminuição na excitação dos receptores de volume e de pressão, vasoconstrição das arteríolas renais com conseqüente ativação do

sistema renina-angiotensina e a produção de ANG II é aumentada. A renina (enzima proteolítica), produzida pelas células da mácula densa, atua sobre o substrato plasmático, angiotensinogênio (proteína globular sintetizada no fígado), produzindo um decapeptídeo, a angiotensina I (ANG I), que sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), produz um octapeptídeo ativo, denominado ANG II. Em situações fisiológicas, a presença de ANG II é de grande importância para a manutenção do equilíbrio hidroeletrolítico e da pressão arterial adequada, para a perfeita perfusão de todos os tecidos. Um aumento nos níveis de ANG II, atuando como um autacóide de produção local, eleva a pressão hidrostática glomerular ao mesmo tempo que reduz o fluxo sanguíneo renal, devido constrição nas arteríolas eferentes.

Como consequência, teremos alterações na taxa de filtração glomerular, com diminuição do fluxo pelos capilares peritubulares, o que, por seu turno, causa aumento da reabsorção de sódio e água [GUYTON & HALL]. Além das ações periféricas, a ANG II cerebral tem importante papel induzindo ingestão de água, ingestão de sódio, efeito pressor, diurese e natriurese [PHILIPS M.I., REID J.A.]. Portanto, a ANG II injetada centralmente, induz diurese e natriurese. Em contraposição, periféricamente, induz diminuição do volume urinário e da excreção urinária de  $\text{Na}^+$ .

Em cães, o efeito natriurético da ANG II injetada intracerebroventricularmente ocorre independentemente das alterações na taxa de filtração glomerular, pressão arterial e concentração plasmática de aldosterona, enquanto no rato há necessidade de mais estudos [UNGER E COLS.].

A ANG II age centralmente por meio de receptores angiotensinérgicos situados nas membranas das células nervosas, promovendo a ativação de enzimas intracelulares, como a

fosfolipase (PLC), com formação do trifosfato inositol ( $IP_3$ ), abertura dos canais de  $Ca^{+2}$ , desencadeando dessa maneira, a ativação neuronal com propagação do impulso nervoso.

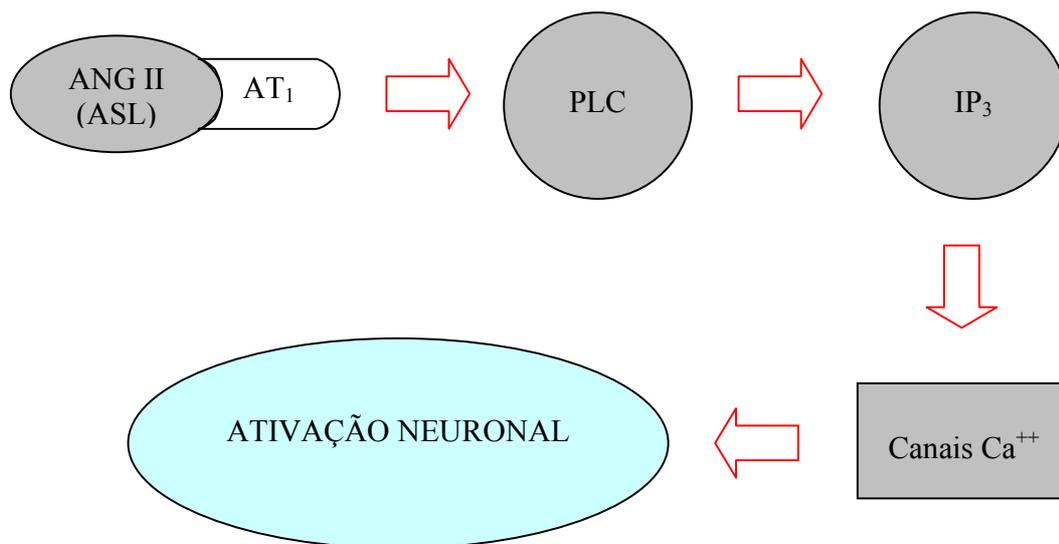


Figura 2. Modelo esquemático mostrando a atuação da ANG II central.

O óxido nítrico (NO) atua como mensageiro neuronal no SNC. Trata-se de um transmissor nitrérgico não convencional, ou seja, um gás, e portanto, não se encontra em vesículas como outros neurotransmissores, pois saindo de seu local de origem, difunde-se rapidamente pela célula e por suas membranas, caracterizando-se extremamente lábil, durando cerca de cinco a dez minutos. É possível que seja liberado tanto por neurônios pré-sinápticos quanto pós-sinápticos. Nos neurônios, o NO pode ser produzido em resposta ao glutamato (transmissor sináptico excitatório), que atua através de receptores NMDA e abre os canais de  $Ca^{+2}$ , o qual liga-se à calmodulina, proteína intracelular que ativa a enzima

óxido nítrico-sintase. Esta converte o aminoácido arginina em NO [NOBACK E COLS.]. CABRERA E BOHR mostraram que ao administrar cálcio no ventrículo lateral, ocorreu um aumento na atividade da enzima óxido nítrico sintase, pois trata-se de uma enzima cálcio dependente, com conseqüente produção e liberação de NO e efeito depressor. Portanto, o NO produzido e liberado centralmente participa do controle cardiovascular [CABRERA E BOHR, WELCH E LOSCALZO] e influencia no comportamento de ingestão [LIU E COLS., SAAD E COLS.], agindo como neuromodulador no SNC [LIU E COLS.].

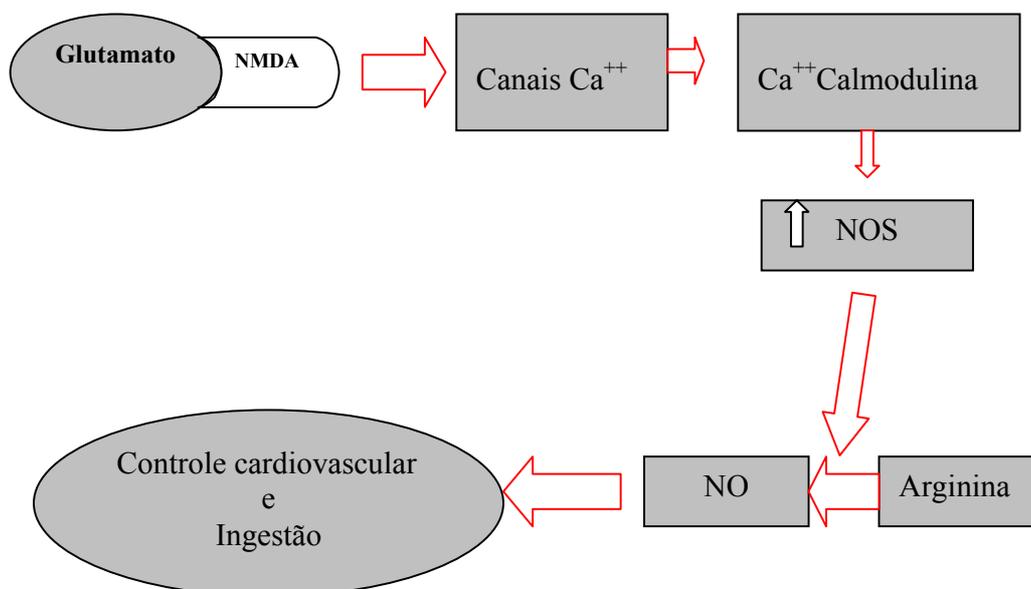


Figura 3. Modelo esquemático para explicar a formação de NO centralmente.

SAAD E COLS. mostraram que o NO liberado centralmente está envolvido na regulação do comportamento de ingestão de água induzido pela administração de ANG II no ventrículo lateral e também que o NO do órgão subfornical tem importância nesse controle. LIU E COLS. (1997), constataram que o L-NAME (inibidor da enzima óxido

nítrico sintase), administrado intracerebroventricularmente, reduziu o efeito dipsogênico da ANG II.

## OBJETIVOS

Este estudo visou avaliar a possibilidade das vias angiotensinérgicas da ASL utilizarem os receptores  $AT_1$  da ANG II nas respostas cardiovasculares e hidroeletrólíticas. Investigamos também a possibilidade das vias angiotensinérgicas interagirem com as vias nitrérgicas da ASL no controle hidroeletrólítico e cardiovascular.

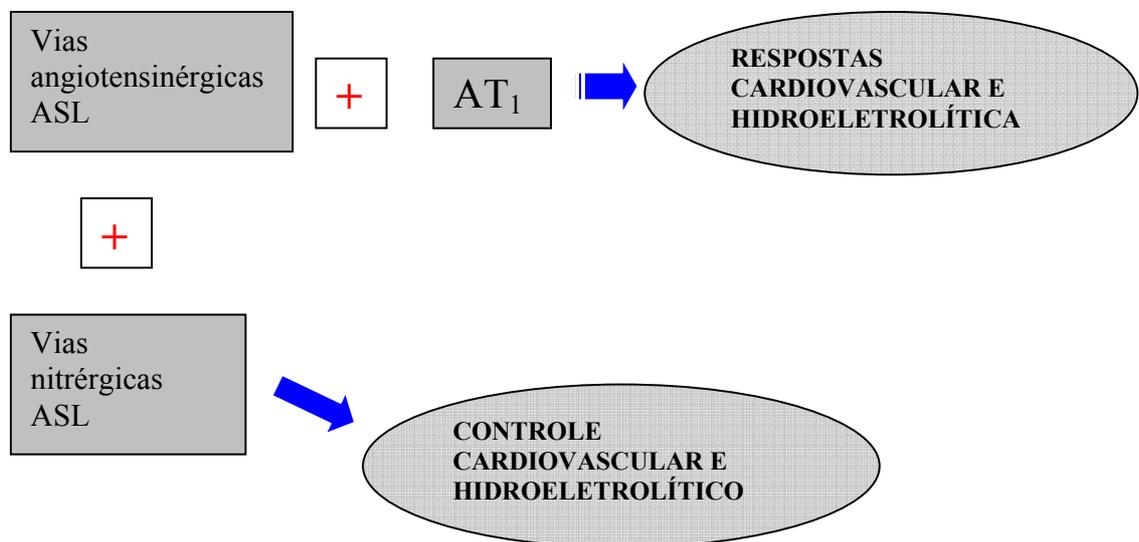


Figura 4. Modelo esquemático para explicar os objetivos do presente estudo.

## MATERIAL E MÉTODOS

### *ANIMAIS*

Foram utilizados ratos Holtzman pesando de 280 a 320 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada ( $23 \pm 2$  graus Celsius), ciclo claro/escuro (12/12 horas), com luz a partir das 7 horas. Foram alimentados com ração sólida (Standard Purina) e água de torneira *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados no período das 9:00 h às 12:00 h.

### *CIRURGIA CEREBRAL*

Os ratos foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg de peso corporal) intraperitonealmente (i.p.) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo David Kopf). Uma incisão longitudinal foi feita na pele da cabeça do animal e o tecido subcutâneo afastado. A calota craniana foi trepanada com uma broca esférica e foram implantadas cânulas de aço inoxidável na ASL (12 mm x 0,7 mm o.d.) usando as seguintes coordenadas: 0,2 mm anterior ao bregma; 0,7 mm lateral a linha sagital; 4,3 mm abaixo da dura-máter. Os parâmetros estereotáxicos para a localização da ASL foram obtidos do Atlas de PAXINOS & WATSON (1986).

As cânulas foram fixadas no crânio com resina acrílica e microparafusos fixados na abóbada craniana após a cirurgia cerebral. Doses profiláticas de antibiótico, penicilina - 30.000 U.I., (Pentabiótico Veterinário-Fontoura Wyeth) foram aplicadas nos animais. Terminada a cirurgia cerebral, os animais foram reconduzidos às suas respectivas gaiolas

com acesso à ração granular e água de torneira *ad libitum*, onde aguardaram pelo menos 5 dias para o início dos experimentos.

### *MICROINJEÇÕES CEREBRAIS*

As soluções das substâncias, diluídas em NaCl 0,15 M, foram injetadas na ASL por meio de uma seringa Hamilton de 10 µl. A seringa foi conectada a um tubo de polietileno PE-10 (25 cm) e ao tubo, uma agulha (0,3 mm o.d), a qual foi introduzida no cérebro através da cânula previamente fixada no crânio do animal. A agulha, para a injeção das substâncias na ASL, foi 0,2 mm mais longa que a cânula guia fixada no crânio do animal. O volume da injeção foi sempre 0,5 µl, injetado durante um período de 10-15 segundos. As substâncias utilizadas foram: NaCl 0,15 M (controle), angiotensina II (Sigma)- 25 ng/0,5 µl, 7-nitroindazol (Tocris Cookson Inc., Ballwin, MO, USA)- 5 µg/0,5 µl e losartan (DuPont–Merk)- 10 nmol/0,5 µl.

### *INGESTÃO DE ÁGUA E DE NaCl 0,5 M*

Cerca de 7 dias após a cirurgia cerebral, a ingestão de água e de NaCl 0,5 M foram medidas em diferentes grupos experimentais após a injeção de ANG II na ASL. O pré-tratamento com NaCl 0,15 M (salina), losartan ou 7-nitroindazol, injetados na ASL, foi realizado 15 minutos antes da ANG II ser injetada na mesma área. Os animais foram divididos em 4 grupos. O 1º grupo recebeu salina + salina; o 2º grupo recebeu salina + ANG II; o 3º grupo recebeu los + ANG II e o 4º grupo recebeu 7-NI + ANG II. A ingestão de água e de NaCl 0,5 M foram medidas a cada 30 minutos, em um intervalo de 120

minutos, após a injeção de ANG II na ASL. Foram utilizadas buretas graduadas em ml (divisões de 0,1 ml). Os animais não tiveram acesso à ração durante o período experimental.

### *EXCREÇÃO DE URINA E DE SÓDIO*

Após uma privação de alimento (12-14 horas), os animais receberam uma sobrecarga de água (5% do peso corpóreo), sendo 2,5%, uma hora antes do início dos experimentos e os outros 2,5%, 15 minutos antes do início dos experimentos, a fim de se obter um fluxo urinário contínuo. A excreção urinária foi registrada em intervalos de 30 minutos, por um período 120 minutos, após a injeção de ANG II na ASL. Diferentes grupos de animais receberam solução salina isotônica (NaCl 0,15 M), losartan, ou 7-nitroindazol, injetados na ASL, 15 minutos antes da ANG II ser injetada na mesma área. A seqüência experimental foi a mesma utilizada para a ingestão de água. A urina foi coletada por meio de um funil adaptado à gaiola, onde se encontrava o animal, e a diurese medida em um tubo de ensaio graduado.

Após medirmos o volume urinário, a urina foi armazenada em frascos especiais e conduzida até o dosador de sódio e potássio, a fim de determinarmos a medida da excreção urinária de sódio. A concentração de sódio na urina foi medida com o aparelho dosador de sódio e potássio (NOVA 1-Sodium Potassium Analyzer - Nova Biomedical). Os animais não tiveram acesso à ração e à água durante o período experimental.

### *MEDIDA DA PRESSÃO ARTERIAL*

A pressão arterial foi registrada pelo método da canulação da artéria femoral, cirurgia realizada um dia antes do registro. Os animais foram anestesiados com ketamina (100 mg/kg de peso corporal) e um tubo de polietileno (P.E.-10 conectado a um P.E.-50 ) foi inserido na artéria femoral. Este tubo foi disposto subcutaneamente e exposto no dorso do animal, de maneira a minimizar o desconforto e permitir o movimento livremente. Para o registro da pressão arterial, o catéter arterial foi conectado a um transdutor de pressão Statham Gould (P23 Db) acoplado a um amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier), o qual estava conectado a um sistema de aquisição de dados computadorizados do tipo Powerlab (modelo Powerlab 16SP, ADInstruments). Diferentes grupos de animais receberam solução salina isotônica (NaCl 0,15 M), losartan ou 7-nitroindazol, injetados na ASL, 15 minutos antes da ANG II ser injetada na mesma área, utilizando a mesma seqüência dos demais protocolos experimentais. Os animais não tiveram acesso à ração e à água durante o período experimental.

## *HISTOLOGIA*

Ao final dos experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental (70 mg/kg de peso corporal, i.p.) e perfundidos através do coração com solução de formalina a 10%. Os cérebros foram removidos e estocados em solução de formalina a 10% por uma semana, congelados e seccionados em cortes de 50  $\mu$ m. Foram corados pelo método de Nissl, usando o corante Giemsa, e somente os animais, nos quais as substâncias atingiram a ASL, foram utilizados para análise dos dados. A figura 5 representa a fotomicrografia de um animal representativo do grupo, mostrando o sítio de injeção na ASL.



Fig. 5 - Fotomicrografia de um corte transversal mostrando o local da injeção na área septal lateral (ASL).

*ESTATÍSTICA*

Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  EPM. Os resultados foram analisados utilizando a análise de variância (One-Way ANOVA) e os dados foram analisados individualmente utilizando o teste de Newmans-Keuls post-hoc. As diferenças foram consideradas significantes para  $P < 0,05$ .

## RESULTADOS

### **Efeito do pré-tratamento com losartan ou 7-nitroindazol, injetados na ASL, sobre a ingestão de água e de NaCl 0,5 M induzida pela aplicação de ANG II na mesma área.**

ANG II (25 ng/0,5  $\mu$ l) injetada na ASL induziu ingestão de água e de sódio, respectivamente ( $10 \pm 0,4$  ml/120 min e  $2 \pm 0,2$  ml/120 min) comparada ao grupo controle ( $1,7 \pm 0,2$  ml/120 min e  $0,5 \pm 0,1$  ml/120 min). [F(3,16)=150,837;  $p < 0,001$ ], Figura 6 e [F(3,16)=29,788;  $p < 0,001$ ], Figura 7. O pré-tratamento com losartan (10 nmol/0,5  $\mu$ l) na ASL aboliu a ingestão de água e de sódio, respectivamente ( $2,5 \pm 0,3$  ml/120 min e  $0,6 \pm 0,1$  ml/120 min) induzida pela ANG II, também injetada na ASL. O tratamento prévio com 7-nitroindazol (5  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l), injetado na ASL, também aboliu a ingestão de água com relação à ANG II, injetada na ASL ( $2,8 \pm 0,2$  ml/120 min) e reduziu a ingestão de NaCl 0,5 M ( $1 \pm 0,1$  ml/120 min).

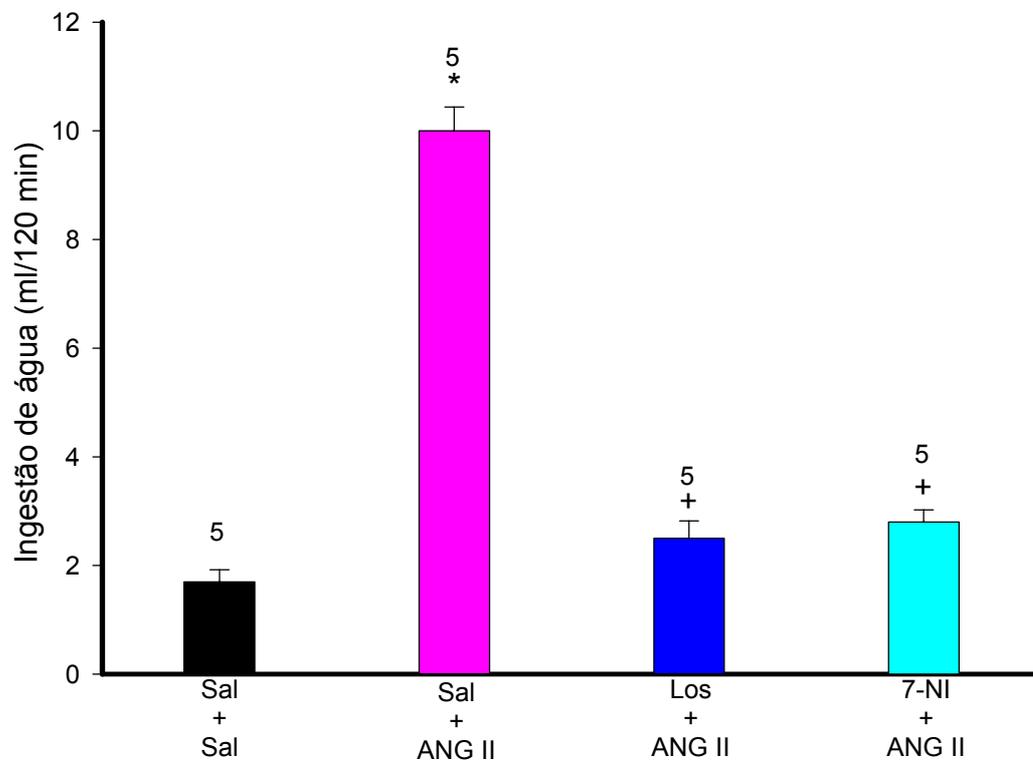


Figura 6: Ingestão de água em ratos que receberam injeção de salina ou ANG II (25 ng/0,5  $\mu$ l) na ASL combinados com o pré-tratamento com losartan (10 nmol/0,5  $\mu$ l) ou 7-nitroindazol (5  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l), injetados na ASL. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O número de animais está indicado no topo de cada coluna. \*P < 0,05 comparado com grupo controle; +P < 0,05 comparado com ANG II (ANOVA One-Way). Obs: grupo controle- NaCl 0,15 M + NaCl 0,15 M.

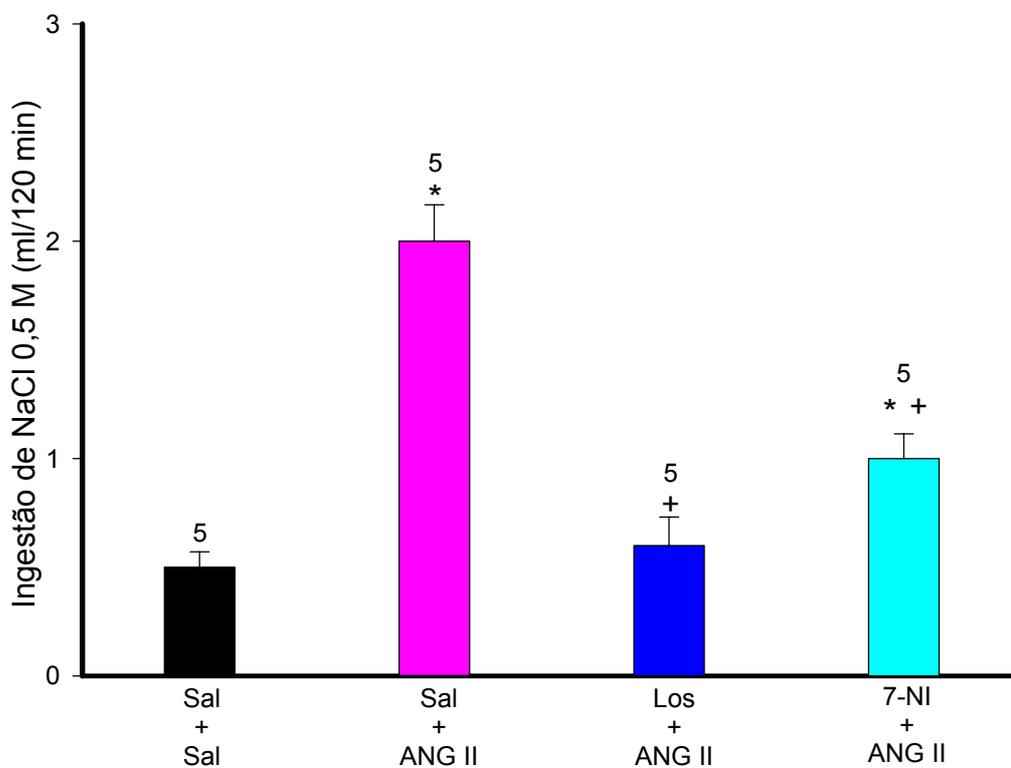


Figura 7: Ingestão de NaCl 0,5 M em ratos que receberam injeção de salina ou ANG II (25 ng/0,5  $\mu$ l) na ASL combinados com o pré-tratamento com losartan (10 nmol/0,5  $\mu$ l) ou 7-nitroindazol (5  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l), injetados na ASL. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O número de animais está indicado no topo de cada coluna. \*P < 0,05 comparado com grupo controle; †P < 0,05 comparado com ANG II (ANOVA One-Way). Obs: grupo controle- NaCl 0,15 M + NaCl 0,15 M.

**Efeito do pré-tratamento com losartan ou 7-nitroindazol, injetados na ASL, sobre o aumento de volume urinário e da excreção urinária de sódio induzido pela aplicação de ANG II na mesma área.**

ANG II (25 ng/0,5  $\mu$ l) injetada na ASL aumentou o volume urinário ( $10,3 \pm 0,6$  ml/120 min) em comparação ao grupo controle ( $6,2 \pm 0,2$  ml/120 min). [F(3,16)=20,384;  $p < 0,001$ ], Figura 8. O pré-tratamento com losartan (10 nmol/0,5  $\mu$ l), injetado na ASL, reduziu o volume urinário induzido pela ANG II injetada na ASL ( $7,8 \pm 0,3$  ml/120 min). O pré-tratamento com 7-nitroindazol (5  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l), injetado na ASL, aboliu o aumento de volume urinário induzido pela ANG II, injetada na ASL ( $6,6 \pm 0,4$  ml/ 120 min).

A injeção de ANG II (25 ng/0,5  $\mu$ l) na ASL também aumentou a excreção urinária de  $\text{Na}^+$  ( $198 \pm 4,5$   $\mu$ Eq/120 min) quando comparada ao grupo controle ( $37 \pm 1$   $\mu$ Eq/120 min). [F(3,16)=691,722;  $p < 0,001$ ], Figura 9. O pré-tratamento com injeção de losartan (10 nmol/0,5  $\mu$ l) ou 7-nitroindazol (5  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l) na ASL reduziram o efeito da ANG II na mesma área sobre a excreção urinária de  $\text{Na}^+$  ( $155 \pm 2$  ;  $62 \pm 3$   $\mu$ Eq/120 min, respectivamente).

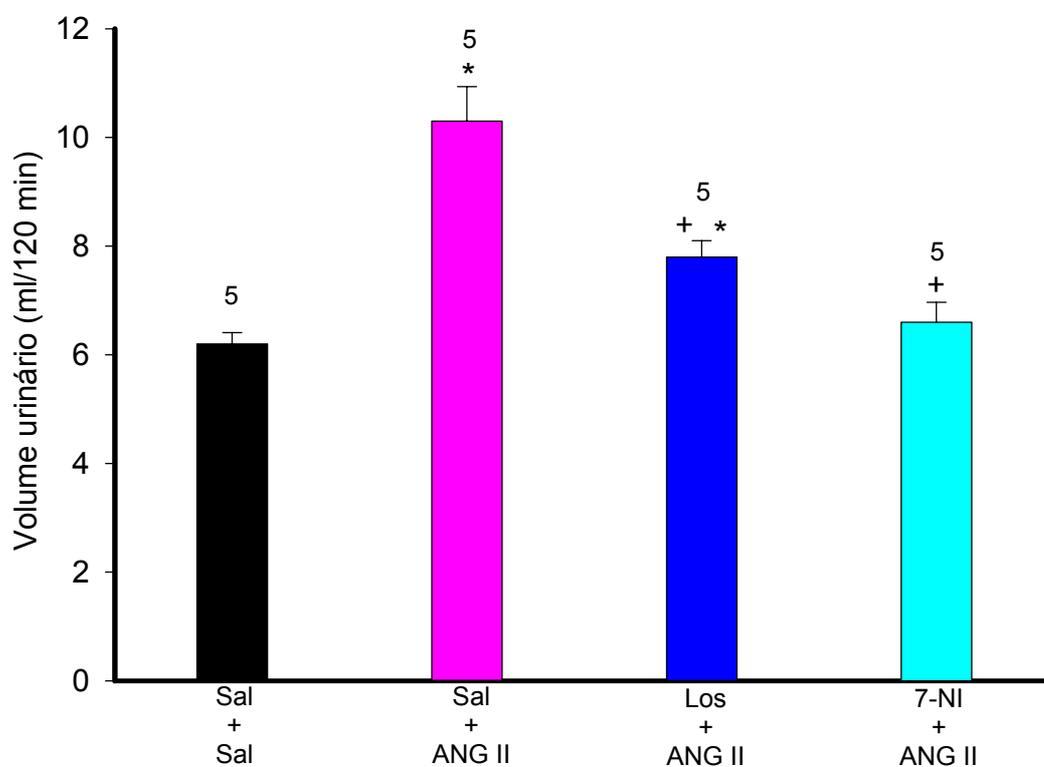


Figura 8: Volume urinário em ratos que receberam injeção de salina ou ANG II (25 ng/0,5  $\mu$ l) na ASL combinados com o pré-tratamento com losartan (10 nmol/0,5  $\mu$ l) ou 7-nitroindazol (5  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l), injetados na ASL. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O número de animais está indicado no topo de cada coluna. \*P < 0,05 comparado com grupo controle; +P < 0,05 comparado com ANG II (ANOVA One-Way). Obs: grupo controle- NaCl 0,15 M + NaCl 0,15 M.

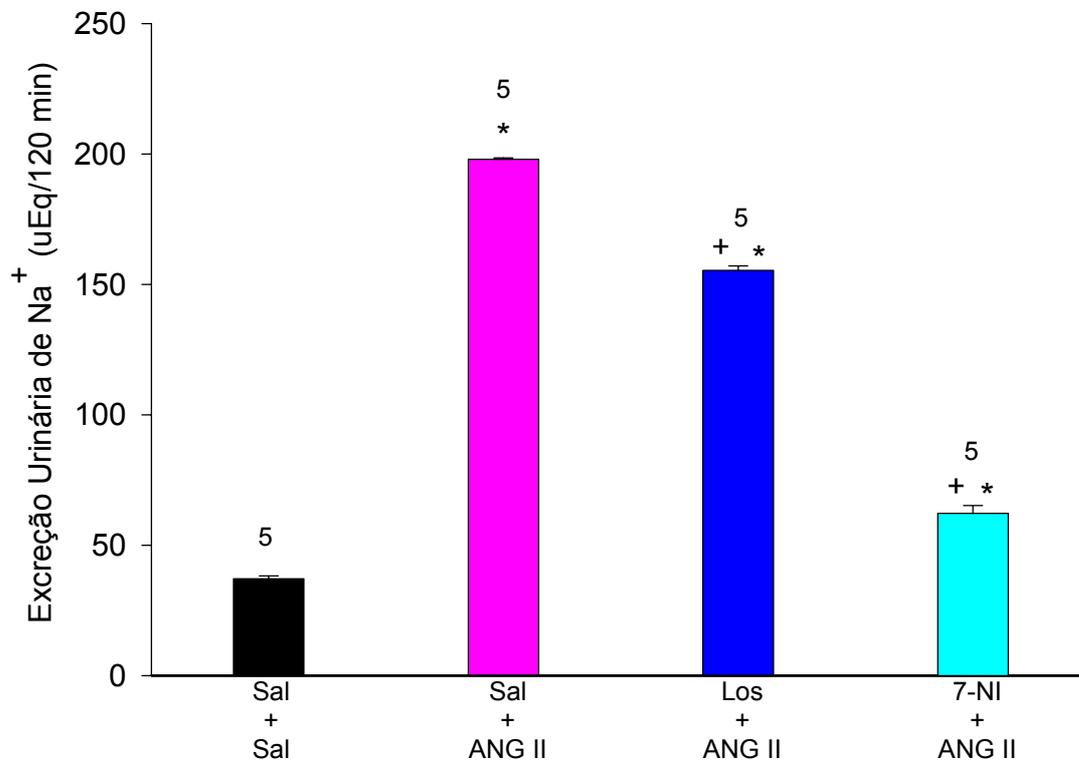


Figura 9: Excreção urinária de Na<sup>+</sup> em ratos que receberam injeção de salina ou ANG II (25 ng/0,5 µl) na ASL combinados com o pré-tratamento com losartan (10 nmol/0,5 µl) ou 7-nitroindazol (5 µg/0,5 µl), injetados na ASL. Os dados são apresentados como média ± EPM. O número de animais está indicado no topo de cada coluna. \*P < 0,05 comparado com grupo controle; +P < 0,05 comparado com ANG II (ANOVA One-Way). Obs: grupo controle- NaCl 0,15 M + NaCl 0,15 M.

**Efeito do pré-tratamento com losartan ou 7-nitroindazol, injetados na ASL, sobre o aumento da PAM induzida pela aplicação de ANG II na mesma área.**

A injeção de ANG II (25 ng/0,5 µl) na ASL aumentou a PAM, ( $25 \pm 2$  mmHg) em comparação ao grupo controle ( $7 \pm 1$  mmHg). [ $F(3,16)=43,513$ ;  $p<0,001$ ], Figura 10. O tratamento prévio com injeção de losartan (10 nmol/0,5 µl), na ASL, aboliu o efeito pressor da ANG II (25 ng/0,5 µl) na ASL ( $8 \pm 0,5$  mmHg). A injeção de 7-nitroindazol (5 µg/0,5 µl) não alterou, na ASL, o efeito pressor promovido pela ANG II ( $23 \pm 2$  mmHg).

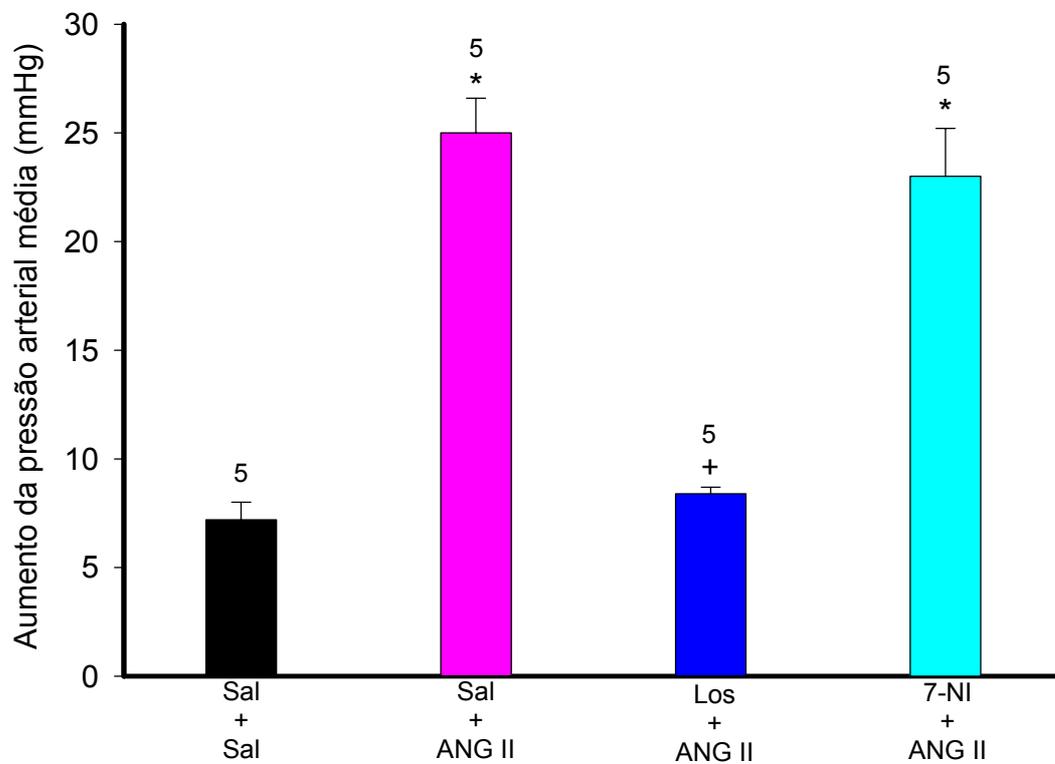


Figura 10: Aumento da pressão arterial média em ratos que receberam injeção de salina ou ANG II (25 ng/0,5  $\mu$ l) na ASL combinados com o pré-tratamento com losartan (10 nmol/0,5  $\mu$ l) ou 7-nitroindazol (5  $\mu$ g/0,5  $\mu$ l), injetados na ASL. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM. O número de animais está indicado no topo de cada coluna. \*P < 0,05 comparado com grupo controle; +P < 0,05 comparado com ANG II (ANOVA One-Way).

Obs: grupo controle- NaCl 0,15 M + NaCl 0,15 M.

## DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostraram que a injeção de ANG II na ASL induziu resposta pressora, dipsogênica, ingestão de NaCl 0,5 M, aumento do volume urinário e da excreção urinária de Na<sup>+</sup>. O pré-tratamento com injeção de losartan, na ASL, aboliu a ingestão de água e de sódio, o efeito pressor e reduziu o aumento da excreção renal induzidos pela ANG II, injetada na ASL. O tratamento prévio com 7-nitroindazol na ASL aboliu a ingestão de água, o aumento do volume urinário e reduziu a ingestão de sódio e a natriurese produzidos pela ANG II.

A ANG II age centralmente aumentando a pressão arterial, induzindo ingestão de água e de sódio, diurese e natriurese [REID J.A.]. Os resultados obtidos mostram que a ANG II injetada na ASL induziu ingestão de água, sugerindo o envolvimento da ASL com os efeitos dipsogênicos deste peptídeo cerebral. CAMARGO E COLS. ao injetarem ANG II sozinha, na área septal medial, também obtiveram respostas dipsogênicas, assim como quando administrada intracerebroventricularmente, nos estudos de LIU E COLS. (1997) e BERESFORD E FITZSIMONS. Portanto, sugere-se que este peptídeo cerebral possa exercer uma ação direta junto aos receptores angiotensinérgicos em diversas áreas cerebrais, incluindo a ASL.

No presente estudo, ao injetarmos ANG II na ASL, esta induziu ingestão de sódio. REID J.A. sugere que o peptídeo possa exercer uma ação direta no cérebro sobre os receptores angiotensinérgicos, de maneira análoga à ação dipsogênica da ANG II, no entanto, a resposta de apetite ao sódio é mais lenta que a ação dipsogênica da ANG II, a qual ocorre em segundos ou poucos minutos, contrariando esta possibilidade.

Uma outra hipótese sugerida por REID J.A. para explicar o aumento da ingestão de sódio induzido pela ANG II seria o aumento da excreção urinária de  $\text{Na}^+$ . Esta ação natriurética induzida pela ANG II quando administrada centralmente, combinada com o aumento da ingestão de água, poderia resultar em uma diminuição da concentração plasmática de sódio, e estas mudanças poderiam influenciar no apetite ao sódio. No entanto, experimentos realizados por AVRITH E FITZSIMONS, 1980, sugerem que o aumento de apetite ao sódio não é secundário ao aumento de ingestão de água ou à natriurese. Esses autores observaram que após a infusão de ANG II (1-10 pmol/h), por meio de bombas miniosmóticas no terceiro ventrículo, ocorria aumento da ingestão de água e NaCl 3% e a ingestão de sódio excedia a perda deste durante a infusão. AVRITH E FITZSIMONS, 1980, também mostraram o efeito específico da ANG II no apetite ao sódio, destacando-se uma preferência do animal ao sódio (solução isotônica), quando exposto livremente à água e soluções equimolares de NaCl. A injeção de renina na área preóptica também determinou aumento da ingestão de NaCl 3% (AVRITH E FITZSIMONS), sugerindo, segundo os autores, que diante da infusão de pequenas doses de ANG II no SNC, teremos estimulação no apetite ao sódio.

VASUDEV E COLS. mostraram que a ANG II, injetada na área septal, induz ingestão de água e sódio, contudo, a ação dipsogênica da ANG II é maior na ASL e a ingestão de sódio prevalece na ASM.

A ANG II injetada centralmente induziu um aumento da PAM, do volume urinário e natriurese, fato observado também por CAMARGO E COLS..

BROOKS E MALVIN sugerem uma redução na atividade do nervo renal induzido pela administração central de ANG II, com conseqüente diminuição da reabsorção de sódio, como hipótese alternativa para explicar o aumento da excreção urinária de  $\text{Na}^+$  induzido

pela ANG II, portanto acreditam que a ANG II endógena seja tonicamente ativa no sistema nervoso central, no controle da excreção urinária de sódio. UNGER E COLS. estudaram os efeitos da injeção intracerebroventricular de ANG II na excreção renal de sódio e também constataram um aumento da natriurese em uma relação dose-dependente. Um aumento da pressão arterial e do fluxo urinário foram observados com altas doses de ANG II, sugerindo que a ANG II cerebral pode participar do controle osmótico central, influenciando na natriurese, assim como na diurese e no aumento da pressão arterial sangüínea. Contudo, o mecanismo pelo qual a ANG II injetada centralmente induz natriurese e as áreas cerebrais envolvidas, incluindo a ASL neste tipo de controle, ainda necessitam de mais estudos.

A ingestão de água e de sódio induzida pela ANG II, injetada centralmente, pode ser abolida por antagonistas dos receptores AT<sub>1</sub> angiotensinérgicos. Após a injeção de losartan na ASL, os efeitos da ANG II na mesma área sobre a ingestão de água e de sódio foram abolidos. CAMARGO E COLS., estudando a área septal medial e o núcleo paraventricular, também mostraram o bloqueio exercido pelo losartan, injetado no núcleo paraventricular, sobre as ações dipsogênicas e de ingestão de sódio induzidas pela ANG II, injetada na área septal medial. BERESFORD E FITZSIMONS, ao injetarem losartan intracerebroventricularmente, também bloquearam a ingestão de água e sódio induzida pela ANG II, sugerindo, portanto, que as ações dipsogênicas e de ingestão de sódio induzidas pela ANG II foram exercidas através de receptores AT<sub>1</sub>.

No presente estudo, o losartan promoveu uma redução nos efeitos angiotensinérgicos, na ASL, sobre a diurese e a natriurese. Contudo, o estudo de CAMARGO E SAAD mostrou que antagonistas dos receptores AT<sub>2</sub> angiotensinérgicos são mais efetivos neste tipo de controle, quando administrados centralmente, embora em outra área cerebral, ou seja, o núcleo paraventricular. Com relação aos efeitos hipertensivos

da ANG II administrada na ASL, o presente estudo mostrou que estes foram abolidos pelo losartan, demonstrando uma participação efetiva destes receptores AT<sub>1</sub> nesse tipo de controle. CAMARGO E COLS. também mostraram o bloqueio exercido pelo losartan com relação ao efeito pressor exercido pela ANG II quando administrada na área septal medial, sugerindo a participação da área septal neste circuito neural responsável por esse controle.

A inibição da óxido nítrico sintase, quando da administração do 7-nitroindazol, na ASL, aboliu a ação dipsogênica e reduziu a ingestão de NaCl 0,5 M exercida pela ANG II. Outros estudos [SAAD E COLS., LIU E COLS. (1997)] também demonstraram que a inibição central da enzima óxido nítrico sintase influencia na ingestão de água induzida pela ANG II injetada intracerebroventricularmente e no ventrículo lateral, após a injeção de L-NAME (inibidor da enzima óxido nítrico sintase) no órgão subfornical, respectivamente, sugerindo que o óxido nítrico possa facilitar a ação dipsogênica da ANG II administrada centralmente. Com relação aos efeitos do óxido nítrico sobre a diurese e a natriurese, induzida pela ANG II injetada centralmente, na ASL e em outras áreas cerebrais, mais estudos são necessários para determinar a sua influência. O 7-nitroindazol, injetado na ASL, 15 minutos antes da ANG II, não alterou o efeito pressor promovido pela ANG II, mostrando que o bloqueio da produção de óxido nítrico não modifica o efeito pressor da ANG II injetada na ASL, sugerindo que o NO possa utilizar uma via neuronal diferente da via angiotensinérgica nesse tipo de controle.

## CONCLUSÕES

Concluimos que a ANG II injetada na ASL induziu ingestão de água e de sódio. O losartan bloqueou efetivamente a ação dipsogênica induzida pela ANG II. O óxido nítrico exerceu um papel facilitatório sobre a ingestão de água induzida pela ANG II. Com relação ao volume urinário e à excreção urinária de  $\text{Na}^+$ , a ANG II induziu um aumento de ambos e o losartan apenas reduziu esses efeitos angiotensinérgicos, sugerindo uma participação menos efetiva dos receptores do tipo  $\text{AT}_1$  angiotensinérgicos nesse tipo de controle. Mais estudos são necessários para determinar a participação do óxido nítrico, injetado centralmente, nas ações diuréticas e natriuréticas induzidas pela ANG II. A ANG II também aumentou a pressão arterial e o losartan bloqueou efetivamente este aumento de pressão arterial induzido pela ANG II, sugerindo uma participação efetiva dos receptores do tipo  $\text{AT}_1$  angiotensinérgicos nesse tipo de controle.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AVRITH D.B. and J.T. FITZSIMONS, 1980. Increased sodium appetite in the rat induced by intracranial administration of components of the renin-angiotensin system. *J. Physiol. London* 301: 349-364.

BERESFORD M.J. and J.T. FITZSIMONS, 1992. Intracerebroventricular angiotensin II-induced thirst and sodium appetite in rat are blocked by the AT<sub>1</sub> receptor antagonist, losartan (DuP- 753), but not by the AT<sub>2</sub> antagonist, CGP 42112B. *Experimental Physiology*, 77: 761-764.

BLASS E.M., A.I. NUSSBAUM, A.I. and D.G. HANSON, 1974. Septal hyperdipsia: Specific enhancement of drinking to angiotensin in rats. *J. Comp. Psychol.* 87: 422-439.

BROOKS V.L. and R.L. MALVIN, 1982. Intracerebroventricular infusions of angiotensin II increases sodium excretion. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 169: 532-537.

CABRERA C. and D. BOHR, 1995. The role of nitric oxide in the central control of blood pressure. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 206: 77-81.

CAMARGO L.A.A. and W.A. SAAD, 1999. Renal effects of angiotensin II receptor subtype 1 and 2-selective ligands injected into the paraventricular nucleus of conscious rats. *Regulatory Peptides*, 84: 91-96.

CAMARGO L.A.A., W.A. SAAD, S. SIMÕES, T.A.B. SANTOS, 2002. Interaction between paraventricular nucleus and septal area in the control of physiological responses induced by angiotensin II. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 35: 1017-1023.

COLOMBARI D.S., A.S. HAIBARA, L.A.A. CAMARGO, W.A. SAAD, A. RENZI, L.A. DE LUCA JR. and J.V. MENANI, 1994. Role of the medial septal area on the cardiovascular, fluid and electrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into the subfornical organ in rats. *Brain Res. Bull.*, 33(3): 249-254.

COVIAN M.R., 1966. Fisiologia del área septal. *Acta Physiol. L. Am.*, 16: 119-152.

FRANCI C.R., C.R. SILVA-NETTO, W.A. SAAD, L.A.A. CAMARGO and J. ANTUNES RODRIGUES, 1986. Interaction between the lateral hypothalamic area (LHA) and the medial septal area (MSA) in the control of sodium and potassium excretion in rats. *Physiol.Behav.*, 25: 801-806.

GELSEMA A. and F.R. CALARESU, 1987. Chemical microstimulation of the septal area lowers arterial pressure in rat. *Am J Physiol*, 252: 760-767.

GUYTON & HALL, 1997. *Tratado de Fisiologia Médica*, 9ª edição, editora Guanabara Koogan, p.: 299-301.

LEITE D.F., L.A.A. CAMARGO, W.A. SAAD, A. RENZI, S. FÓGLIA, L. A. DE LUCA JR. and J.V. MENANI, 1992. Role of cholinergic and adrenergic pathways of the medial septal area in the control of water intake and renal excretion in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 42: 1-8.

LENKEI Z., M. PALKOVITS, P. CORVOL and C. LLORENS CORTES, 1997. Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Front Neuroendocrinol.*, 18: 383-439.

LIU H., M.L. TERRELL, V. BUI, J.Y. SUMMY-LONG and M. KADEKARO, 1996. Drinking and blood pressure responses to central injection of L-NAME in conscious rats. *Physiol. Behav.*, 59: 1137-1145.

LIU H., M.L. TERRELL, V. BUI, J.Y. SUMMY-LONG and M. KADEKARO, 1997. NO and angiotensin II effects on blood pressure and fluid homeostasis. *J. Neuroendocrinol.*, Jul. 9(7): 545-552.

LUIZ A.C., W.A. SAAD, L.A.A. CAMARGO, A. RENZI, L.A. DE LUCA JR. and J.V. MENANI, 1991. Pressor, dipsogenic, natriuretic and kaliuretic responses to central carbachol in rats with lesion of the medial septal area. *Neurosc. Lett.*, 132: 195-198.

MACHADO A.B.M., 1993. *Neuroanatomia Funcional*, 2ª edição, editora Atheneu, p.: 278-282.

MORITA N., W.A. SAAD, L.A.A. CAMARGO, C.R. SILVA-NETTO, J. ANTUNES RODRIGUES and M.R. COVIAN, 1980. Interaction between the septal área and subfornical organ in the control of water intake induced by thirst-eliciting procedures. *Physiol. Behav.*, 24: 243-249.

NOBACK C.R., STROMINGER N.L. and DEMAREST R.J., 1999. *The Human Nervous System*, 5ª edition, Williams & Wilkins-Baltimore, MA-USA, F229-F230.

PAXINOS G. and C. WATSON, 1986. *The rat brain in stereotaxic coordinates atlas*. San Diego, Academic Press.

PHILIPS M.I., 1987. Functions of angiotensin in the central nervous system. *Annu. Rev. Physiol.* 49: 413-435.

REID J.A., 1984. Actions of angiotensin II on brain: mechanisms and physiological role. *Am. J. Physiol.*, 246: F533-F543.

SAAD W.A., L.A.A. CAMARGO, A.F. PEREIRA and S. SIMÕES, 1999. Effect of injection of L-NAME on drinking response. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 132: 1413-1416.

SONG K., A.M. ALLEN, G. PAXINOS and F.A.D. MENDELSON, 1992. Mapping of angiotensin II receptor subtype heterogeneity in rat brain. *J. Comp. Neurol.*, 316: 467-484.

UNGER T., P.J. HORST, M. BAUER, G. DEMMERT, R. RETTIG and P. ROHMEISS, 1989. Natriuretic actions of central angiotensin II in conscious rats. *Brain Res.*, 486(1): 33-8.

VASUDEV R., C.G. GENTIL and M.R. COVIAN, 1984. Intraseptal microinjections of carbachol and angiotensin II in rats: effects on taste preferences. *Physiology & Behavior*, 36: 33-39.

WELCH G. and J. LOSCALZO, 1994. Nitric oxide and the cardiovascular system. *Journal of Cardiovascular Surgery*, 9: 361-371.

WRIGHT J.W. and J.W.HARDING, 1994. Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 18: 21-53.