

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO  
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Thalisson Henrique Martins Silva

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES MAS DA  
ANGIOTENSINA 1-7 NA REGULAÇÃO DA SEDE E  
DO APETITE AO SÓDIO**

Ouro Preto

2014

Thalisson Henrique Martins Silva

# **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES MAS DA ANGIOTENSINA 1-7 NA REGULAÇÃO DA SEDE E DO APETITE AO SÓDIO**

Dissertação apresentada ao programa de pós-graduação de Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Lisandra Brandino de Oliveira

**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreia Carvalho Alzamora

Ouro Preto

2014

S286p Silva, Thalisson Henrique Martins.

Participação dos receptores MAS da angiotensina 1-7 na regulação da sede e do apetite ao sódio [manuscrito] / Thalisson Henrique Martins Silva. – 2014. 71f.: il., color.; graf.; tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto.  
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica estrutural e fisiológica.

1. Alimentos – Teor de sódio - Teses. 2. Apetite - Teses. 3. Angiotensina – Teses. I. Oliveira, Lisandra Brandino de. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.33-008.4/.5

Catálogo: [sisbin@sisbin.ufop.br](mailto:sisbin@sisbin.ufop.br)



**Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**

**Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:**

**“Participação dos receptores MAS da angiotensina 1-7 na regulação da sede e do apetite ao sódio”**

Aos vinte e três dias do mês de julho de 2014, às 09:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno **Thalisson Henrique Martins Silva**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ..... *APROVADO* ..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

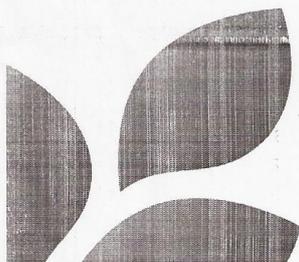
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Lisandra Brandino de Oliveira  
Presidente (UFOP)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreia Carvalho Alzamora  
Examinadora (UFOP)

Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso  
Examinador (UFOP)

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andrea Siqueira Haibara  
Examinadora (UFMG)

**DATA DA DEFESA: 23/07/2014**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto  
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil  
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

## **Dedicatória:**

**A Deus,**

Pela sabedoria e por sempre me abençoar.

**A minha Mãe e irmãos (Tauany e Lucas),**

Por todo amor, carinho, confiança e acima de tudo por estarem ao meu lado.

**A minha Família em especial, meus avós (Francisco e Sofia),**

Pela força, torcida e compreensão.

**A todos os meus amigos,**

Que sempre me ajudaram, torceram por mim e entenderam minha ausência.

## **Agradecimentos:**

**A Prof. Dr<sup>a</sup>. Lisandra Brandino de Oliveira,**

Pela sua orientação.

**A Prof. Dr<sup>a</sup>. Andréia Carvalho Alzamora,**

Pela oportunidade.

**Ao Laboratório de hipertensão e Centro de Ciência Animal,**

Que acompanharam minha dedicação diária.

**A Marcela e a Bruna,**

Que permitiram compartilhar todas as minhas dificuldades e acima de tudo me ajudar a vencê-las. Sem a ajuda de vocês não conseguiria.

**Aos colegas de mestrado e da iniciação científica em especial, Grazielle, Ana Carolina, Renato, Douglas, Gabriela Hermont, Maria Andrea, Paula, Carolina Moraes, Gabriela Souza.**

Mesmo que indiretamente vocês me influenciaram e me ajudaram muito.

**A Santa Casa da Misericórdia e a Prefeitura do município de Ouro Preto,**

Pelo apoio, compreensão e flexibilidade. Sou muito grato a vocês.

**Aos órgãos de fomento FAPEMIG e CNPq,**

Por tornarem possível a realização deste trabalho.

## RESUMO:

As ações da angiotensina II (ANG II) tanto renais quanto na indução da sede e do apetite ao sódio são bem conhecidas, porém, apesar de suas ações renais, pouco se sabe sobre as ações da angiotensina 1-7 (ANG 1-7) na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico. Portanto, neste trabalho foi investigado um possível envolvimento dos receptores MAS da ANG 1-7 na regulação da sede e do apetite ao sódio (NaCl 1,8%). Para tanto, ratos Wistar (280g a 320g) foram anestesiados (50 mg/kg de cetamina e 0,5 mg/kg de xilasina) e submetidos a uma cirurgia encefálica para implante de uma cânula de aço inoxidável no ventrículo lateral (VL). Após 5 dias de recuperação, os animais foram submetidos a um dos quatro protocolos descritos a seguir: privação hídrica de 24h; tratamento com furosemida 10 mg/kg /captopril 5 mg/kg (FURO/CAP); gavagem (administração intragástrica de NaCl 12%); ou depleção de sódio por 24 h (injeção sc de FURO 10 mg/kg + retirada da ração). Em todos os protocolos o rato recebeu injeção intracerebroventricular (icv) de diferentes concentrações (1,5; 3; 6 e 12 nmol/3µL) do antagonista do receptor MAS da ANG 1-7 (A779) ou PBS e 15 min depois, foram feitas as medidas de ingestão (água e/ou NaCl 1,8%) ao longo de 120 ou 240 min (teste da sede e/ou do apetite ao sódio) e 24 h. Os resultados foram expressos com média ± erro padrão da média. Para as análises estatísticas foi utilizada ANOVA de uma via ou de duas vias de medidas repetidas seguida do pós-teste Newman Keuls, sendo considerado significativo para  $p < 0,05$ . O tratamento com A779 icv não afetou a ingestão de água e sódio induzida pela privação hídrica ou tratamento com FURO/CAP (protocolos que induzem tanto ingestão de água quanto de sódio), todavia A779 foi capaz de reduzir a ingestão de água induzida pela gavagem de NaCl 12% (desidratação intracelular:  $3,1 \pm 1,4$ ;  $2,8 \pm 1,6$ ;  $3,3 \pm 1,0$  vs. PBS:  $9,3 \pm 2,3$  mL/120 min, respectivamente para A779 de 3, 6, 12 nmol/3µL) e a ingestão de NaCl 1,8% induzida pela depleção de sódio por 24 h (desidratação extracelular:  $2 \pm 1,2$  vs. PBS:  $7,0 \pm 1,8$  mL/120 min para A779 na concentração de 3 nmol). Uma vez que é sabido que a ANG II tem um importante papel na sede e no apetite ao sódio, para se certificar da especificidade do A779, foi investigado se o A779 (6nmol/3µL) poderia interferir no efeito dipsogênico da ANG II e os resultados mostraram que a prévia administração de A779 não foi capaz de afetar a ingestão de água induzida pela ANG II (PBS + ANG II:  $11,8 \pm 1,8$  vs A779 +

ANG II:  $10,7 \pm 1,7$  mL/2h). Em relação à ingestão de 24 h, considerando todos os protocolos realizados, apenas no protocolo para se estudar a especificidade do A779, foi observado um aumento da ingestão de água (24 h), sendo que todos os tratamentos foram diferentes do grupo controle (PBS + salina). Considerando os resultados obtidos foi observado que o bloqueio dos receptores MAS reduziu a ingestão de água induzida por desidratação intracelular e a de sódio induzida pela desidratação extracelular, sugerindo um possível envolvimento da ANG 1-7 nestes comportamentos ingestivos.

## ABSTRACT:

The renal actions of angiotensin II (ANG) II and its involvement on thirst and sodium appetite are well known, however, despite its renal effects, little is known about the actions of angiotensin 1-7 (ANG 1-7), in the regulation of fluid and electrolyte balance. Therefore, in this study it was investigated a possible involvement of the MAS receptor of ANG 1-7- on thirst and sodium appetite (hypertonic solution of sodium chloride - 1.8% NaCl) regulation. For this purpose, Wistar rats (280g to 320g) were anesthetized (50 mg/kg ketamine and 0.5 mg/kg xylazine) and subjected to a brain surgery for implanting a stainless steel cannula into the lateral ventricle (LV). After 5 days of recovery, animals were subjected to one of the four protocols as followed described: 24h water deprivation; treatment with furosemide 10 mg/kg /captopril 5 mg/kg (FURO CAP); gavage (intragastric administration of 12% NaCl); or 24 h sodium depletion (sc injection of FURO 10 mg/kg + food removed). In all protocols the rat received intracerebroventricular (icv) injection of different concentrations (1,5; 3; 6 e 12 nmol/3 $\mu$ L) of MAS receptor antagonist of ANG 1-7 (A779) or PBS and 15 min later, the intake measures (water and / or NaCl 1.8%) were made during 120 or 240 min ( thirst and/or sodium appetite test) and 24 h. Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean. For statistical analyzes it was used one-way or two-way repeated measures ANOVA followed by Newman Keuls post-test. It was considered statistically significant at  $p < 0.05$ . Treatment with icv A779 did not affect water and sodium intakes induced by water deprivation or treatment with FURO /CAP (protocols that induce both water and sodium intake). On the other hand, A779 was able to reduce water intake induced by 12% NaCl gavage (intracellular dehydration:  $3.1 \pm 1.4$ ,  $2.8 \pm 1.6$ ,  $3.3 \pm 1.0$  vs. PBS:  $9.3 \pm 2.3$  ml/120 min, respectively, to 3, 6, 12 nmol/3 $\mu$ L of A779 ) and sodium depletion-induced sodium intake (extracellular dehydration:  $2 \pm 1.2$  vs PBS:  $7.0 \pm 1.8$  mL/120 min for 3 nmol of A779 ). Since it is known that ANG II plays an important role on thirst and sodium appetite, to ensure the specificity of A779, it was investigated if A779 (6nmol/3 $\mu$ L) could interfere on the dipsogenic effect of ANG II. The results showed that previous administration of A779 was not able to affect water intake induced by Ang II (PBS + ANG II:  $11.8 \pm 1.8$  vs. A779 + ANG II:  $10.7 \pm 1.7$  mL/2h). In relation to 24 h water and sodium intakes,

considering all the protocols tested, only in the protocol to study the specificity of A779 it was observed an increase on water intake (24 h) in all treatments when compared to control group (PBS + saline). Considering the results, it was observed that the blockage of MAS receptors reduced water intake induced by intracellular dehydration and sodium intake induced by extracellular dehydration, suggesting a possible involvement of ANG 1-7 on these ingestive behaviors.

## ÍNDICE ANALÍTICO:

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Sistema Renina Angiotensina.....	3
1.2. Angiotensina II (ANG II) .....	4
1.3. Angiotensina 1-7 (ANG 1-7) .....	5
1.4. Angiotensina II (Ang II) e Angiotensina 1-7 (Ang 1-7) na Regulação do Comportamento Ingestivo .....	5
<b>2. OBJETIVO</b> .....	<b>8</b>
2.1 Objetivo Específico .....	8
<b>3. MATERIAIS e MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
3.1. Animais .....	9
3.2. Cirurgia Encefálica (esteriotaxia) .....	9
3.3. Injeções dos Fármacos .....	10
3.4. Drogas Injetadas .....	10
3.5. Protocolos Experimentais .....	11
3.5.1. Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida pela gavagem de solução hipertônica de NaCl (desidratação intracelular) .....	12
3.5.2. Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida pela depleção de sódio de 24 h (desidratação extracelular) .....	13
3.5.3. Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida pelo tratamento com furosemida + captopril .....	14
3.5.4. Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por privação hídrica de 24h .....	15
3.5.5. Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e sódio após injeção central de ANG II.....	16
3.6. Análise estatística .....	17
<b>4. RESULTADOS</b> .....	<b>18</b>
4.1. Análise Histológica .....	18

<b>4.2.</b> Efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos submetidos à desidratação intracelular (gavagem de NaCl 12%) .....	<b>19</b>
<b>4.3.</b> Efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos submetidos à desidratação extracelular (depleção de sódio por 24 h).....	<b>22</b>
<b>4.4.</b> Efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO/CAP .....	<b>25</b>
<b>4.5.</b> Efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos privados de água por 24 h.....	<b>28</b>
<b>4.6.</b> Efeito da interação do A779 e ANGII na ingestão de água e sódio .....	<b>33</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	<b>37</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b> .....	<b>41</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>42</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS:

<b>Figura 1:</b> Mecanismo simplificado de formação de ANG II e ANG 1-7 no sistema renina-angiotensina e seus respectivos receptores .....	<b>4</b>
<b>Figura 2:</b> Aparelho estereotáxico.....	<b>10</b>
<b>Figura 3:</b> Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com gavagem de solução hipertônica de NaCl (desidratação intracelular) .....	<b>13</b>
<b>Figura 4:</b> Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com depleção de sódio por 24 h (desidratação extracelular) .....	<b>14</b>
<b>Figura 5:</b> Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida e captopril .....	<b>15</b>
<b>Figura 6:</b> Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com privação hídrica por 24 h .....	<b>16</b>
<b>Figura 7:</b> Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos após injeção central de ANG II .....	<b>17</b>
<b>Figura 8:</b> Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) o local de injeção no ventrículo lateral (VL).....	<b>18</b>

**Figura 9:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (3, 6 e 12 nmol/3 µL) em ratos submetidos a desidratação intracelular (gavagem). Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = 6 ..... **20**

**Figura 10:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos submetidos a desidratação intracelular (gavagem). As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média± EPM; n= 6..... **21**

**Figura 11:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) e A779 (1,5;3 e 6 nmol/3 µL) em ratos submetidos a depleção de sódio. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = 6..... **23**

**Figura 12:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos submetidos a depleção de sódio. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média± EPM; n= 6..... **24**

**Figura 13:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (3, 6 e 12 nmol/3 µL) em ratos submetidos ao tratamento com furosemida e captopril. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = 8..... **26**

**Figura 14:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos submetidos ao tratamento com furosemida e captopril. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média± EPM; n= 8..... **27**

**Figura 15:** Ingestão cumulativa de água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos privados de água por 24 h (período de reidratação – teste da sede). Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = 6..... **29**

**Figura 16:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos privados de água por 24 h. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = 6 ..... **30**

**Figura 17:** Ingestão de água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos privados de água por 24 h (período de reidratação – teste da sede). As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n= 6 ..... **31**

**Figura 18:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos privados de água por 24 h. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média± EPM; n= 6 ..... **32**

**Figura 19:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3µL) + salina (1 µL); PBS (3µL) + ANGII (100 ng/1 µL); A779 (6 nmol/3µL) + ANGII (100 ng/1 µL); PBS (3µL) + ANG1-7 (400 ng/1 µL). Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = 6 ..... **34**

**Figura 20:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3µL) + salina (1 µL); PBS (3µL) + ANGII (100 ng/1 µL); A779 (6nmol/3µL) + ANGII (100 ng/1 µL); PBS (3µL) + ANG1-7 (400 ng/1 µL). As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média± EPM; n= 6 ..... **35**

## ÍNDICE DE TABELAS:

- Tabela 1:** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (3, 6 e 12 nmol/3 µL) em ratos que haviam sido submetidos a gavagem de NaCl 12% ..... **22**
- Tabela 2:** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos que haviam sido previamente depletados de sódio ..... **25**
- Tabela 3:** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos que haviam sido previamente tratados com FURO/CAP ..... **28**
- Tabela 4 :** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (3; 6 e 12 nmol/3 µL) em ratos que haviam sido previamente privados de água. .... **33**
- Tabela 5:** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após o tratamento icv com ANG II (100 ng), ANG 1-7 (400 ng) ou A779 (6 nmol) + ANG II (100 ng)..... **36**

## **LISTA DE ABREVIATURAS:**

**AGT** = Angiotensinogênio

**ANG I** = Angiotensina 1

**ANG II** = Angiotensina II

**ANG 1-7** = Angiotensina 1-7

**ANG 1-9** = Angiotensina 1-9

**AP** = Área postrema

**AT1** = Receptor tipo 1

**AT2** = Receptor tipo 2

**AV3V** = Região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V)

**ECA** = Enzima conversora de angiotensina I

**ECA II** = Enzima conversora de angiotensina II

**ICV** = Intracerebroventricular

**LEC** = Líquido extracelular

**LCE** = Líquido cerebrospinal

**MNPO** = Núcleo pré-óptico mediano

**NPB** = Núcleo parabraquial

**NTS** = Núcleo do trato solitário

**NLET** = Núcleo leito da estria terminal

**OSF** = Órgão subfornicial

**OVLT** = Órgão vasculoso da lâmina terminal

**PC** = Peso corporal

**SC** = Subcutâneo

**SNC** = Sistema nervoso central

**SRA** = Sistema renina-angiotensina

**UI** = Unidade Internacional

**VL** = Ventrículo lateral

## 1. INTRODUÇÃO:

Mecanismos neurais e hormonais são acionados diante da desidratação intra e extracelulares e participam da restauração do equilíbrio eletrolítico. O equilíbrio hidromineral é um dos sistemas que deve ser mantido dentro de estreitos valores de variação o que é feito por mecanismos regulatórios do organismo. Quando há alguma alteração desses mecanismos regulatórios podem ser desencadeadas patologias e até mesmo poderiam levar a um comprometimento da vida (Covian e cols., 1975).

A água é um componente essencial ao organismo. Uma fração significativa do corpo humano é composta de água constituindo aproximadamente 70% do peso corpóreo humano, estando dois terços dela no compartimento intracelular e um terço no compartimento extracelular. A distribuição de água corporal depende de vários fatores, dos quais se destacam a idade, o sexo e a quantidade de gordura corporal. Na composição do líquido extracelular são encontrados diversos eletrólitos, como o sódio (Na<sup>+</sup>). O sódio é o principal íon do líquido extracelular (LEC) e tem primordial importância para diversas funções fisiológicas, mantida em níveis normais (145 Mm) (Formenti S e cols., 2011). A importância do sódio para manter o equilíbrio de fluidos é derivada de sua grande distribuição como uma partícula osmoticamente ativa no LEC, atuação integrada da função renal e do sistema neuroendócrino. Água e Na<sup>+</sup> são normalmente adicionados ao líquido extracelular pelo comportamento de ingestão, compensando, assim, as perdas para o meio ambiente por perspiração, respiração, sudorese, fezes e, especialmente, pela excreção renal. Esta desempenha importante papel tanto para eliminar eventuais excessos ingeridos como para reduzir as perdas resultantes de causas clínicas, como diarreia e/ou vômitos intensos, que podem levar à desidratação. Importante na manutenção da osmolaridade e da vida, a quantidade de sódio nos líquidos corporais deve ser mantida dentro de estreitos limites de variação para assegurar um funcionamento ideal de inúmeros processos fisiológicos.

A sede é a denominação dada à sensação subjetiva da necessidade de água iniciada por estímulos originados dentro do próprio organismo que funciona como um mecanismo de defesa para aumentar o consumo de água em resposta à percepção das

deficiências dos líquidos corporais (Fitzsimons, 1998), por meio de receptores que detectam aumento da pressão osmótica plasmática assim como diminuição do volume extracelular ou da pressão sanguínea. A ingestão de água é adequada para substituir perdas de volume apenas quando a concentração de sódio está elevada, devido a uma perda de água maior do que a perda de sódio. Em contraste, perdas de fluidos que envolvem grandes quantidades de sódio (sudorese prolongada ou sangramento) não podem ser corrigidas apenas com a ingestão de água (Stricker & Jalowiec, 1970). A ingestão de sal, também chamada de apetite ao sódio, é a motivação que leva o animal à procura, obtenção e consumo de sódio que contribui para repor as necessidades de Na<sup>+</sup> do organismo. A osmolaridade extracelular é regulada principalmente pela ingestão e excreção de água, quando há alteração tem ativação de barorreceptores. Ao passo que, o volume extracelular é diretamente proporcional ao conteúdo total de sódio no corpo. (Verbalis, 2003). Isto é, o volume extracelular no corpo depende em grande parte da quantidade de sódio presente no espaço extracelular, assim, a entrada e a saída de água são adaptadas para controlar a pressão osmótica. Os osmorreceptores centrais monitoram a concentração de sódio no líquido cerebrospinal (LCE). Esta regulação é a razão para sódio ser eliminado para reduzir o volume plasmático, e ser ingerido e retido para aumentar do volume do plasmático.

Diversas áreas no sistema nervoso central (SNC) estão envolvidas na regulação do apetite ao sódio e sede dentre elas é possível citar: a área postrema (AP), o núcleo do trato solitário (NTS), o núcleo parabraquial (NPB), o núcleo do leito da estria terminal (NLET), a amígdala e estruturas da lâmina terminal: o órgão subfornicial (OSF), estruturas localizadas na região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) que compreendem o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), entre outras (Fitzsimons, 1998). Assim tanto áreas prosencefálicas (predominantemente excitatórias) quanto posteriores (predominantemente inibitórias) estão envolvidas na regulação da ingestão de água e sódio.

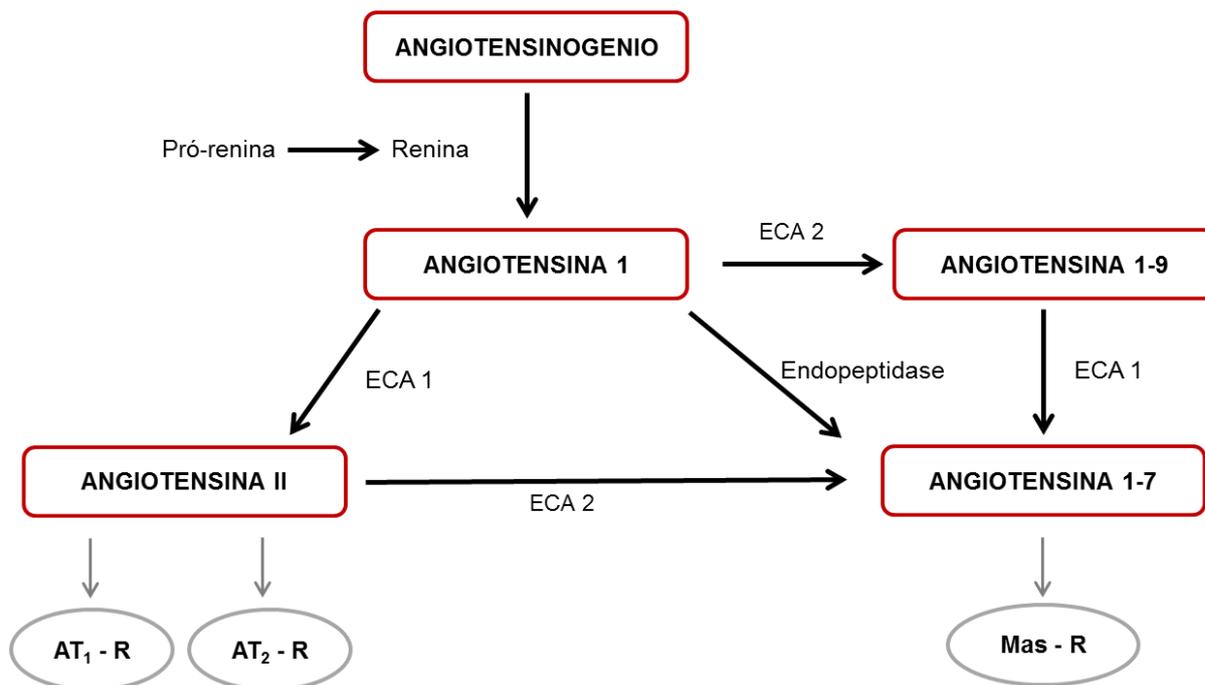
Além dos componentes neurais envolvidos na regulação do apetite ao sódio há também os componentes hormonais que estimulam ou inibem esse comportamento. Dentre os principais hormônios relacionados ao estímulo da ingestão está a angiotensina II (ANG II). Estudos de Fitzsimons, (1998) mostraram que a renina e a ANG II são estímulos dipsogênicos efetivos. A ANG II além de estimular a sede e o apetite ao sódio

apresenta outras funções fisiológicas como diminuição da excreção de sódio, secreção de vasopressina e regulação da pressão arterial, podendo até participar do aprendizado e memória (Fitzsimons, 1998).

### **1.1. SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA**

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem um papel vital na regulação de processos fisiológicos como: sistema cardiovascular, sistema endócrino, bem como funções parácrinas e autócrinas nos tecidos e órgãos (Mehta e cols., 2006). Centralmente aumenta a pressão sanguínea, sede, apetite ao sódio e secreção de vasopressina. Dentre os peptídeos ativos deste sistema, destacam-se a Ang II e a angiotensina 1-7 (Ang1-7), as quais exercem ações, na maioria das vezes, antagônicas (Machado e cols, 2000; Kostenis e cols., 2005), porém podem ter também ações similares.

O SRA é ativado durante situações de hipovolemia. A renina é uma enzima proteolítica sintetizada a partir da pró-renina, a qual é armazenada e liberada pelos rins nessa situação. Na circulação, essa enzima cliva o angiotensinogênio (AGT), formando a angiotensina I (ANG I), que será clivada pela enzima conversora da angiotensina I (ECA) em ANG II. Dos vários receptores de ação da ANG II presente em diferentes áreas encefálicas os mais importantes para seu efeito dipsogênico são os receptores AT1 (Fitzsimons, 1998). Além disso, no SRA a ANG I também pode formar a angiotensina 1-9 (ANG 1-9), que por sua vez será convertida em ANG 1-7, por meio da enzima conversora de angiotensina II (ECA II) (Donoghue e cols., 2000; Rice e cols., 2004). Juntamente, o substrato principal da ECA, a ANG II, também poderá ser convertida em ANG 1-7 pela própria ação da ECA II (Vickers e cols., 2002; Chappell e cols., 1998; Campbell e cols., 2004; Pinheiro e Silva, 2011). As ações da Ang II são mediadas pelos receptores AT1 e AT2. Já a ANG 1-7 atua em um receptor específico Mas (Santos e cols., 2003) (**Figura 1**).



**Figura 1:** Mecanismo simplificado de formação de ANG II e ANG 1-7 no sistema renina-angiotensina e seus respectivos receptores (Adaptado De La Serna, 2006).

## 1.2. ANGIOTENSINA II

A Ang II exerce um importante papel na regulação da pressão arterial sistêmica através de sua ação direta nos vasos sanguíneos como um potente vasoconstritor. Por meio da sua interação com os receptores AT1 (Santos e cols., 2008, Santos e cols, 2009). Esse peptídeo está envolvido em processos fisiológicos e fisiopatológicos relacionados ao sistema renal e cardiovascular. Altera a pressão arterial através de seus efeitos em diferentes tecidos, incluindo alterações do tônus vascular, aumento da atividade do sistema nervoso simpático, alterações na estrutura e função de diferentes leitos vasculares e regulação sobre o balanço hidroeletrolítico (Weir e cols., 1999). No SNC o receptor AT1 foi encontrado no diencéfalo, mesencéfalo, ponte e medula. A distribuição de AT1 sugere que ANG II atue como neurotransmissor, influenciando a homeostase da água e eletrólitos, a liberação de hormônios pituitários e o controle autonômico (MacGregor e cols., 1995).

### **1.3. ANGIOTENSINA 1-7**

A ANG 1-7 importante produto do SRA, é o principal derivado da ANG I, por uma via que é independente da ECA (Santos e cols., 2008). A via de formação da Ang-(1-7) tem sido explorada nos últimos anos e, apesar de várias enzimas formarem a Ang-(1-7), a ECA 2 parece ser a principal enzima formadora deste peptídeo (Tipnis e cols., 2000; Donoghue e cols., 2000). Estudos demonstraram que ANG 1-7 atuando no seu receptor específico Mas possui relevantes ações centrais no controle cardiovascular (Campagnole-Santos e cols., 1992; Fontes e cols., 1994), secreção de vasopressina (Schiaivone e cols., 1988) e suas ações visam principalmente contrabalançar os efeitos da Ang II em diferentes tecidos nas várias condições fisiopatológicas.

Dentre as ações cardiovasculares da Ang 1-7 podemos citar o aumento da sensibilidade do barorreflexo (Campagnole-Santos e cols., 1992), potencialização do efeito vasodilatador da bradicinina (Paula e cols.,1995; Abbas e cols., 1997; Fernandes e cols., 2005) levando a liberação de óxido nítrico NO (Porsti e cols., 1994; Brosnihan e cols., 1996; Machado e cols.,2001; Heitsch e cols., 2001).

A angiotensina (1-7) está presente no rim em concentrações comparáveis a Ang II e produz efeitos renais complexos (Santos et al., 2005). A Enzima conversora de angiotensina-2 está presente em várias segmentos de nefrônios (Ye et al. 2006), onde se pensa ser a principal formadora de Ang (1-7) (Chappel & Ferrario, 2006). Deleção do gene de ECA 2 leva ao desenvolvimento de lesão glomerular Ang II dependente em ratos machos, sugerindo que ECA 2 pode ser um terapêutico importante alvo no rim (Oudit et al., 2006). No entanto, se este efeito resulta de degradação de Ang II, a formação de Ang (1-7), ou ambos não se sabe.

### **1.4. ANGIOTENSINA II E ANGIOTENSINA 1-7 NA REGULAÇÃO DO COMPORTAMENTO INGESTIVO**

A ANG II é importante para ingestão de água e/ou sódio induzida por desidratação intracelular ou extracelular. Na presença de estímulo hipovolêmico ocorre um aumento da ANG II resultante da queda de pressão artéria e conseqüente liberação de renina. Essa redução de volume também chega ao cérebro e promove a liberação de ANG II

cerebral (Fitzsimons, 1998). A utilização de antagonistas não peptídicos de receptores da ANG II permitiu estudar o papel deste peptídeo na ingestão, especialmente na que ocorre durante a estimulação osmótica ou privação hídrica. A ingestão de água produzida pela injeção intracerebroventricular (icv) de solução hipertônica de NaCl foi reduzida ou abolida quando estudada em animais tratados com injeção icv de losartana (antagonista do receptor AT1).

Vários tipos de protocolos experimentais têm sido empregados para se identificar mecanismos que controlam a sede e a ingestão de sódio, Já se observou que ANG II central teria função importante no equilíbrio hidroeletrólítico (Fitzsimons, 1980; Fitzsimons, 1981; Blair-West e cols., 1994; Weisinger e cols., 1996; Fitzsimons, 1998). Esses protocolos experimentais induzem a desidratação intracelular e/ou extracelular. Os protocolos furosemida e captopril (FURO/CAP) e privação hídrica 24 induzem as duas desidratações. Estimula a ingestão de água e ingestão de solução hipertônica de NaCl 1,8%. O FURO/CAP por meio da injeção de furosemida (diurético e natriurético) combinado com o captopril, um inibidor da enzima conversora de angiotensina induz ingestão hipertônica de NaCl 1,8% provavelmente devido a uma conversão maciça de ANG I em ANG II no cérebro, ajudado por hipotensão resultante da hipovolemia (Fitzsimons, 1998; Schiffrin, 1982). A combinação de baixa dose de captopril (5 mg/kg) com furosemida (10 mg/kg) facilita o aumento da conversão central da ANG II, já que aumenta ainda mais a renina plasmática devido a hipovolemia o que leva a produção de Ang I na circulação. A privação hídrica de 24 h resulta em uma redução do volume (hipovolemia) e aumento da osmolaridade dos líquidos corporais, alterando assim, tanto o balanço hídrico, quanto o balanço de eletrólitos (McKinley e cols., 1983; Weisinger e cols., 1985). A hipovolemia levaria à produção de ANG II que estaria envolvida no aumento da ingestão de sódio induzida por esse tratamento (Sato e cols., 1996).

Já um protocolo específico que induz apenas o apetite ao sódio (desidratação extracelular) é a depleção de sódio de 24 h. Combina natriurese e diurese farmacológicas com injeção subcutânea (sc) de furosemida, além de uma dieta deficiente em sódio, tendo os animais livre acesso à água (Sakai e cols., 1986; Weiss e cols., 1986; Sakai e cols., 1987). A perda de sódio ocorre devido ao livre acesso à água, com redução do volume, osmolaridade e aumento de ANG II e aldosterona (Fluharty &

Epstein, 1983; Sakai e cols., 1986). O aumento da ingestão de sódio é em consequência dos altos níveis plasmáticos tanto de ANG II quanto da aldosterona e não pela deficiência de sódio em si (Fluharty & Epstein, 1983; Sakai e cols., 1986).

Os protocolos experimentais que induzem a ingestão de água levam o animal a uma situação de desidratação intracelular. O soluto mais efetivo para aumentar a concentração osmótica é o sódio e a desidratação intracelular pode ser produzida com dietas de alto teor de sódio ou induzida experimentalmente ou clinicamente com infusão endovenosa de soluções hipertônicas. O protocolo específico para ingestão de água é o da gavagem. Injeção intragástrica de solução hipertônica de cloreto de sódio (NaCl 12%) gera hiperosmolaridade e perda de água das células para o espaço extracelular causando a desidratação intracelular e consequentemente ativação dos osmorreceptores centrais e periféricos que irão desencadear a sede (Fitzsimons, 1985) com o intuito de restaurar a osmolaridade.

Estudo realizado em nosso laboratório constatou que num protocolo de privação de alimentos a injeção icv de ANG II reduziu a ingestão de alimento ao mesmo tempo em que aumentou a ingestão de água. Já a injeção icv de ANG 1-7 resultou em um efeito hipofágico, assim como a ANG II, porém com efeitos contrários na ingestão de água (De Marchi, 2014).

Contrastando com ANG II, a ANG 1-7 não estimula a ingestão de água e não tem um efeito pressor quando administrada periféricamente ou icv (Santos e cols., 1994; Silva e cols., 1998). Um papel para ANG 1-7 no controle do balanço hidroeletrólítico foi sugerido pela observação que, além das suas ações de liberação de vasopressina *in vitro* (Schiavone e cols., 1988), a ANG 1-7 apresenta um potente efeito antidiurético em ratos (Santos e cols., 1992), influencia na reabsorção de fluidos e bicarbonato no túbulo contorcido proximal (Garcia e cols., 1994), e sua concentração no plasma é aumentada em ratos tratados cronicamente com sal (Botelho e cols., 1994).

Em relação a ANG 1-7, pouco se sabe sobre seu efeito no comportamento ingestivo. Sabe-se que diferentemente da ANG II, ela não é capaz de induzir nem a ingestão de água, nem o apetite ao sódio numa situação basal (Mahon e cols., 1995). Portanto, neste trabalho foi investigado, por meio do bloqueio dos receptores MAS, o

possível envolvimento da ANG-(1-7) central na ingestão de água e sódio (solução hipertônica de cloreto de sódio – NaCl 1,8%) em situações na quais tanto a sede quanto o apetite ao sódio foram estimulados.

## **2. OBJETIVO:**

O objetivo desse trabalho foi investigar a contribuição da ANG 1-7 endógena na regulação central da ingestão de água e no apetite ao sódio em modelos experimentais de desidratação intra e/ou extracelular.

### **2.1. Objetivos específicos:**

- Avaliar a ação central do antagonista do receptor MAS, o A-779, injetado no ventrículo lateral (VL) na ingestão de água e solução de NaCl 1,8% induzidas por privação hídrica de 24h e tratamento com furosemida + captopril;
- Avaliar a ação central do antagonista do receptor MAS, o A-779, injetado no ventrículo lateral (VL) na ingestão de água induzida por gavagem de solução de NaCl 1,8% (desidratação intracelular);
- Avaliar a ação central do antagonista do receptor MAS, o A-779, injetado no ventrículo lateral (VL) na ingestão de NaCl 1,8% induzida por depleção de sódio por 24 h (desidratação extracelular);
- Avaliar a especificidade do A779 para o receptores MAS da ANG ANG-(1-7): A-779 vs ANG II central.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS:**

#### **3.1. Animais:**

Foram utilizados neste estudo ratos Wistar provenientes do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, com pesos em torno de 280-320g. Os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais (CEUA), protocolo: 2013/12.

#### **3.2. Cirurgia encefálica (estereotaxia):**

Para o implante de cânulas encefálicas, os ratos foram anestesiados (50 mg/ kg de cetamina e 0,5 mg/ kg de xilasina) e adaptados a um aparelho estereotáxico (**Figura 2**). O lambda e bregma foram utilizados como referências para nivelar os crânios dos ratos. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável no crânio dos animais, assim foi realizada uma trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Para o VL, cânulas de 10 x 0,5 mm d.i. Foram posicionados de acordo com as seguintes coordenadas: 0,4 mm caudal ao bregma, 1,4 mm lateral à linha mediana e 3,8 mm abaixo da dura-máter. A cânula fixada no crânio do animal com parafusos e resina acrílica.

Após a cirurgia encefálica, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de antibiótico (0,2 ml 1.200.000 UI por rato, i.m) e (0,1 ml/rato) de anti-inflamatório cetoprofeno (1 mg/rato) permaneceram em recuperação em suas gaiolas por, pelo menos, 5 dias antes de iniciar os experimentos. Tiveram livre acesso a água, NaCl 1,8% e ração.



**Figura 2:** Aparelho estereotáxico.

### **3.3. Injeções dos fármacos:**

Os fármacos foram dissolvidos em PBS e injetados no ventrículo lateral (VL) dos ratos em volume de 3  $\mu\text{L}$  ou 1  $\mu\text{L}$ . Para tanto, foi utilizada seringa Hamilton (10  $\mu\text{L}$ ) conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no encéfalo via a cânula guia previamente fixada. A cânula injetora (0,3 mm diâmetro) foi 2 mm mais longa do que a cânula guia.

### **3.4. Drogas injetadas:**

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- PBS - 0,1 M (veículo):
- Furosemida: 10mg/kg de peso corporal
- Captopril: 5mg/kg de peso corporal
- A-779 (antagonista dos receptores MAS da ANG 1-7), utilizou-se, nas concentrações de 1,5; 3,6 ou 12 nmol/3 $\mu\text{L}$ .
- Angiotensina II (100 ng/1  $\mu\text{l}$ ). (De Marchi, 2014)
- Angiotensina 1-7 (400 ng/1  $\mu\text{l}$ ). (De Marchi, 2014)

### 3.5. Protocolos experimentais:

Após 5 dias das cirurgias encefálicas no VL os animais foram submetidos a um dos 5 protocolos realizados sempre no período da manhã. Protocolo 1: GAVAGEM; Protocolo 2: DEPLEÇÃO SÓDIO ; Protocolo 3: FURO/CAP; Protocolo 4: PRIVAÇÃO HÍDRICA; Protocolo 5: INTERAÇÃO ANG II e receptores MAS. Considerando os protocolos de 1 a 4, nos quais a ingestão de água e/ou sódio foi estimulada, para cada protocolo experimental, os animais passaram por quatro tratamentos: injeção icv de veículo (PBS, 3  $\mu$ L) mais 3 concentrações diferentes de A779. Em cada dia de experimento, o grupo de animais foi dividido pela metade, sendo que metade recebeu veículo e a outra metade recebeu uma das concentrações de A779 (1,5; 3, 6 ou 12 nmol/3  $\mu$ L). A concentração de A779 utilizada foi aleatória, sendo que no final dos 4 experimentos, todos os animais receberam todos os tratamentos.

No protocolo 5, os animais passaram também por 4 tratamentos: injeção icv de PBS + salina; PBS + ANG II (100 ng/  $\mu$ L); PBS + ANG 1-7 (400 ng/ $\mu$ L); A779 (6 nmol/ 3  $\mu$ L) + ANG II (100 ng/  $\mu$ L). Em cada dia de experimento, o grupo de animais foi dividido pela metade, sendo que metade recebeu um dos tratamentos. A ordem dos tratamentos foi aleatória e no final dos 4 experimentos, todos os animais receberam todos os tratamentos.

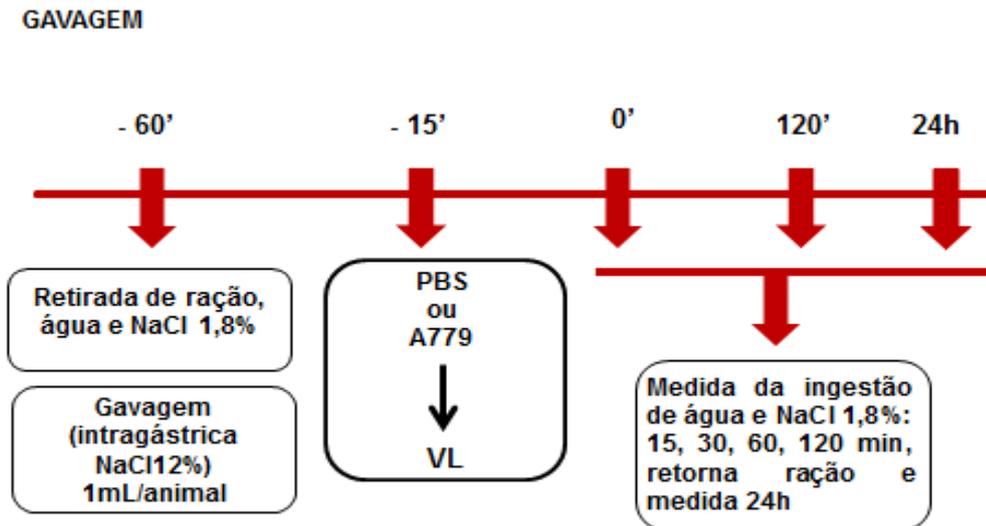
Em todos os experimentos foram feitas medidas de ingestão cumulativa nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min, iniciando no tempo 0. No protocolo de privação hídrica foram feitas medidas também nos tempos de 135, 150, 180 e 240 min. E em todos os protocolos foram feitas medidas de ingestão de 24h após experimentos e análise por período de tempo (0 - 15, 15 - 30, 30 - 60, 60 - 120). Foi sempre aguardado no mínimo 48 h entre um experimento e outro.

Ao final de cada grupo experimental, o rato foi anestesiado com mistura de cetamina + xilasina (0,125 mL/100g de ratos) e realizado perfusão cardíaca. Sendo assim, houve abertura do tórax para exposição do coração. No ventrículo cardíaco esquerdo, introduziu-se uma seringa e, concomitantemente, fez-se abertura do átrio direito, para o sangue e as soluções serem eliminadas por esta abertura. Após o bloqueio da artéria aorta abdominal, com uma pinça hemostática, procedeu-se à perfusão. Para a

remoção do sangue e manutenção da integridade tecidual, injetou-se aproximadamente 40 ml de paraformaldeído a 4%. Após a retirada do encéfalo, o mesmo foi colocado em paraformaldeído a 4% até que encéfalos fossem cortados. Em um último momento foram realizados os cortes histológicos, com 50 µm de espessura utilizando um micrótomo criostato e montados em lâminas histológicas gelatinizadas para coloração. Após a montagem dos cortes, os mesmos foram analisados em microscópio ótico comum para visualização do ponto de injeção no VL.

### **3.5.1. Protocolo 1: Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida pela gavagem de solução hipertônica de NaCl (desidratação intracelular).**

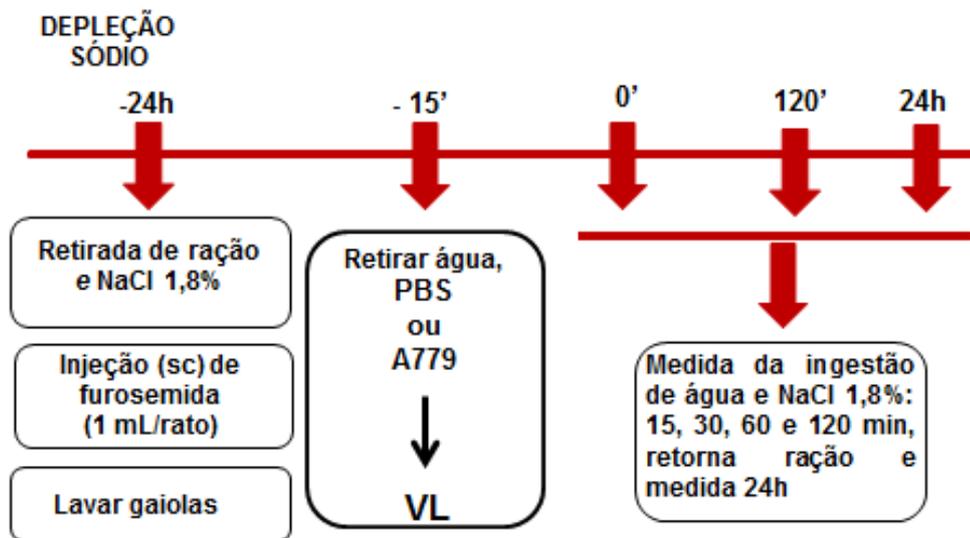
Os animais receberam administração intragástrica (GAVAGEM) de NaCl 12%, após serem retiradas as buretas de água e NaCl 1,8% e ração. 45 minutos depois, receberam injeção icv de PBS ou A779. 15 minutos depois foram disponibilizadas buretas de vidro com água e outra com NaCl 1,8% para medida da ingestão nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos. Ao final de 120 minutos foram retiradas as buretas de vidro e retornadas as buretas convencionais e ração. 24h depois, foi feita nova medida da ingestão de água e NaCl 1,8% (**Figura 3**).



**Figura 3:** Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com gavagem de solução hipertônica de NaCl (desidratação intracelular).

### 3.5.2. Protocolo 2: Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida pela depleção de sódio de 24 h (desidratação extracelular).

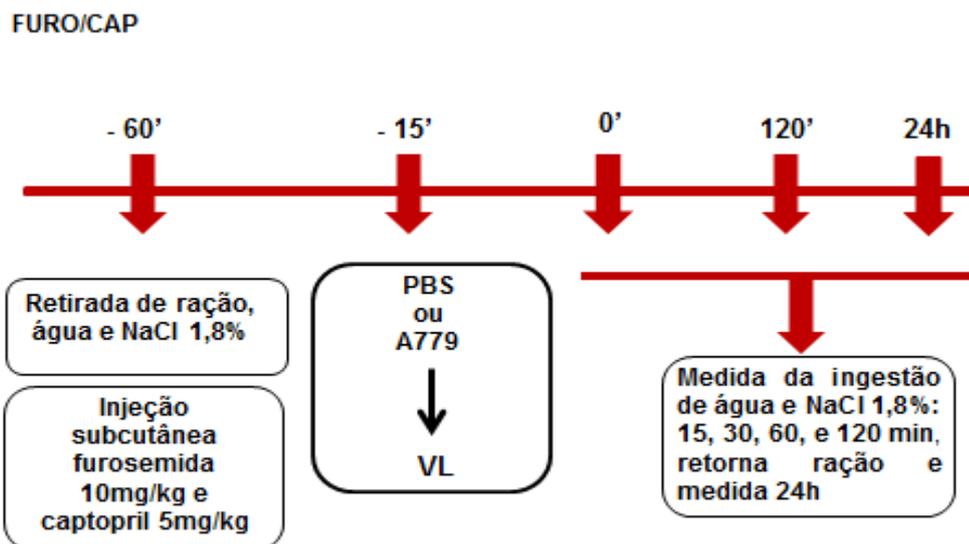
Os animais receberam injeção subcutânea de furosemida (10 mg/kg) após serem retiradas as buretas de água e NaCl 1,8% e ração. Em seguida foram lavadas as gaiolas para retirar a urina e os farelos de ração. Os ratos foram devolvidos às suas gaiolas e tiveram livre acesso à água, mas não à ração ou ao NaCl 1,8% e assim permaneceram por 24 h. 15 min antes das 24 h se completarem, a água foi retirada e os animais receberam injeção icv de PBS ou A779. Após 15 minutos foram disponibilizadas buretas de vidro com água e outra com NaCl 1,8% para medida da ingestão nos tempos de 15, 30, 60, 120 minutos. Ao final de 120 minutos foram retiradas as buretas de vidro e retornadas as buretas convencionais e ração. 24h depois, foi feita nova medida da ingestão de água e NaCl 1,8% (**Figura 4**).



**Figura 4:** Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com depleção de sódio por 24 h (desidratação extracelular).

### 3.5.3. Protocolo 3: Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida pelo tratamento com furosemida + captopril.

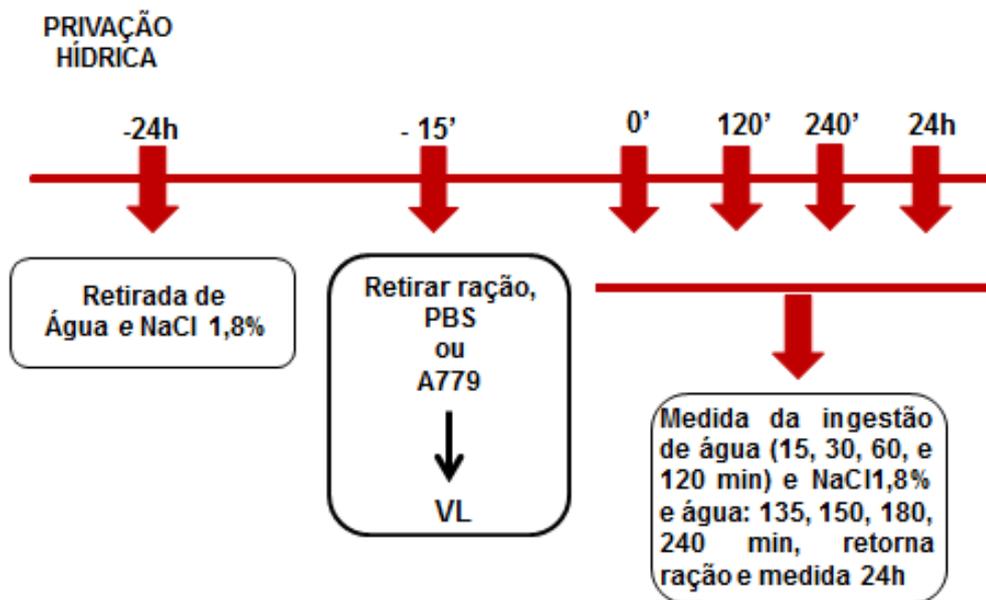
Os animais receberam injeção subcutânea de FUROSEMIDA (10 mg/kg) e CAPTOPRIL (5 mg/kg), após a retirada das buretas de água e NaCl 1,8% e ração. 45 minutos depois, receberam injeção (icv) de PBS ou A779. 15 minutos depois foram disponibilizadas buretas de vidro com água e outra com NaCl 1,8% para medida da ingestão nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos. Ao final de 120 minutos foram retiradas as buretas de vidro e retornadas as buretas convencionais e ração. 24h depois, foi feita nova medida da ingestão de água e NaCl 1,8% (**Figura 5**).



**Figura 5:** Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com furosemida e captopril.

#### 3.5.4. Protocolo 4: Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por privação hídrica de 24 h.

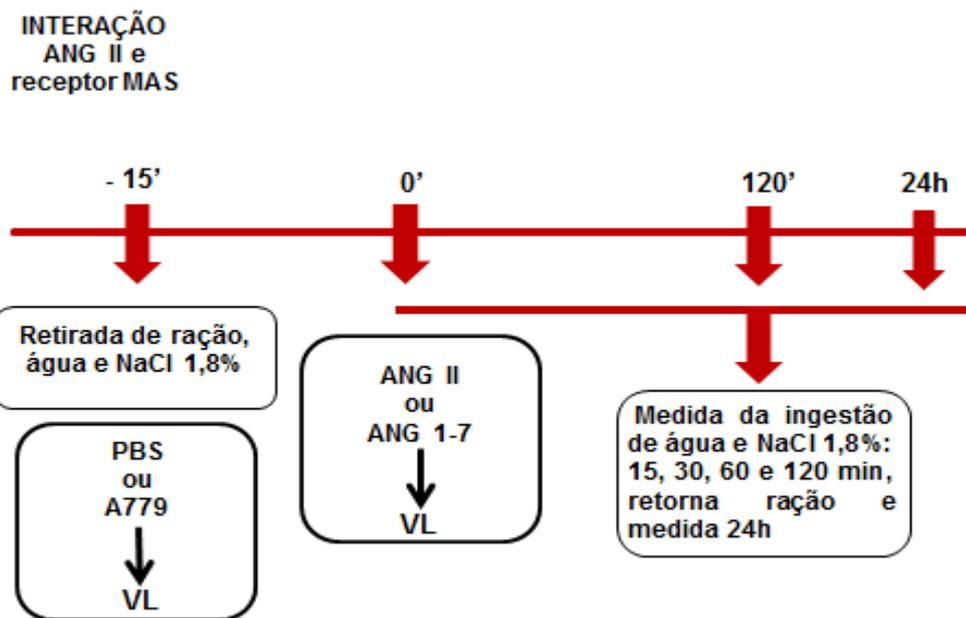
Os animais tiveram as buretas de água e NaCl 1,8% retiradas, porém permaneceram com livre acesso à ração. 24 horas depois, antes da injeção, a ração foi removida. Os animais receberam, então, injeção (icv) de PBS ou de A779. 15 minutos depois, foram disponibilizados buretas de vidro apenas com água e foram feitas as medidas de ingestão nos tempos de 15, 30, 60, 120 minutos (teste da sede – período de reidratação). Em seguida foram disponibilizadas também as buretas de NaCl 1,8% (teste de apetite ao sódio) e realizadas medidas de ingestão de água e NaCl 1,8% por mais 2 horas (medidas aos 135, 150, 180 e 240 min) . Ao final de 240 minutos foram retiradas as buretas de vidro e retornadas as buretas convencionais de água e sódio e ração. 24h depois, foi feita nova medida da ingestão de água e NaCl 1,8% (**Figura 6**).



**Figura 6:** Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com privação hídrica por 24 h.

### 3.5.5. Protocolo 5: Estudo do efeito central do A779 na ingestão de água e sódio após injeção central de ANG II.

Os animais receberam injeção icv de PBS ou A779 (6 nmol/3 µl), após serem retiradas as buretas de água, NaCl 1,8% e ração. 15 minutos depois, receberam novamente, injeção icv de ANG II (100 ng/1 µl) ou ANG1-7 (400 ng/1 µl) ou salina. Após 15 minutos foram disponibilizadas buretas de vidro com água e outra com NaCl 1,8% para medida da ingestão nos tempos de 15, 30, 60 e 120 minutos. Ao final de 120 minutos foram retiradas as buretas de vidro e retornadas as buretas convencionais e ração. 24h depois, foi feita nova medida da ingestão de água e NaCl 1,8% (**Figura 7**).



**Figura 7:** Protocolo experimental para o estudo do efeito da injeção de A779 no VL na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos após injeção central de ANG II.

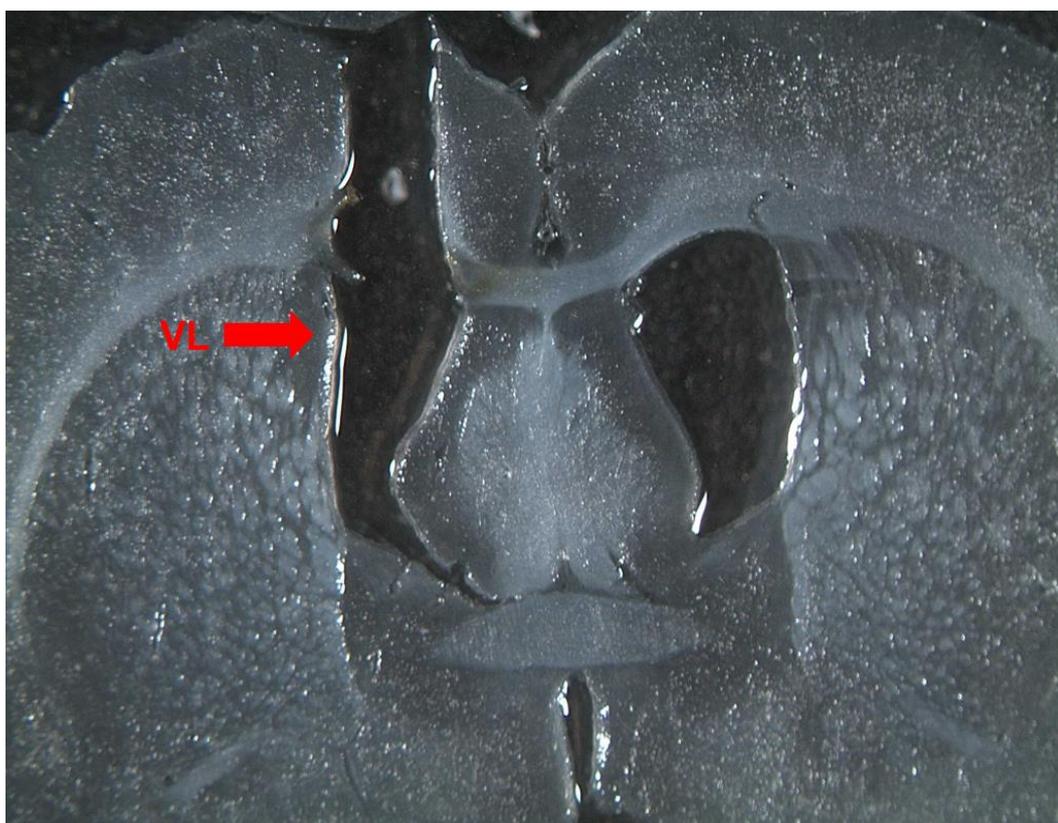
### 3.6. Análise Estatística:

Para a análise estatística dos resultados foi utilizada análise de variância de uma ou duas vias de valores repetidos, seguida do teste Student Newman Keuls. As variáveis analisadas foram tratamento e tempo. O software usado para a confecção dos gráficos foi o Sigma Plot 10.0 (Systat Software, Inc. Sigma Plot for Windows) e para as análises estatísticas foi o Sigma Stat 3.5 (Systat Software, Inc. Sigma Stat for Windows). O nível de significância foi fixado previamente em 5% ( $p < 0,05$ ) e os resultados expressos como média acompanhada do respectivo erro padrão da média ( $M \pm EPM$ ).

## 4. RESULTADOS:

### 4.1. Histologia

A figura 8 apresenta corte histológico mostrando o ponto de injeção no ventrículo lateral (VL).



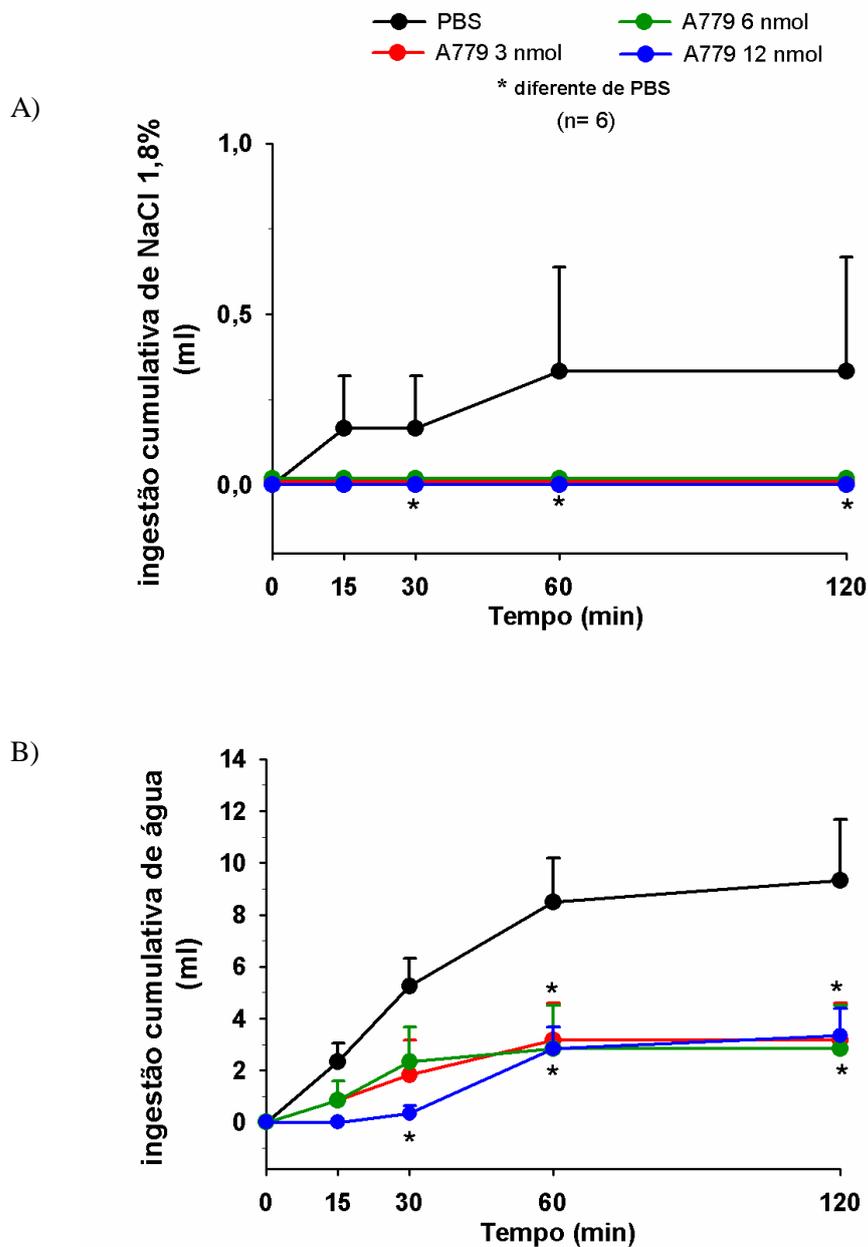
**Figura 8:** Fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal, indicando (seta) o local de injeção no ventrículo lateral (VL).

#### **4.2. Efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos submetidos à desidratação intracelular (gavagem de NaCl 12%).**

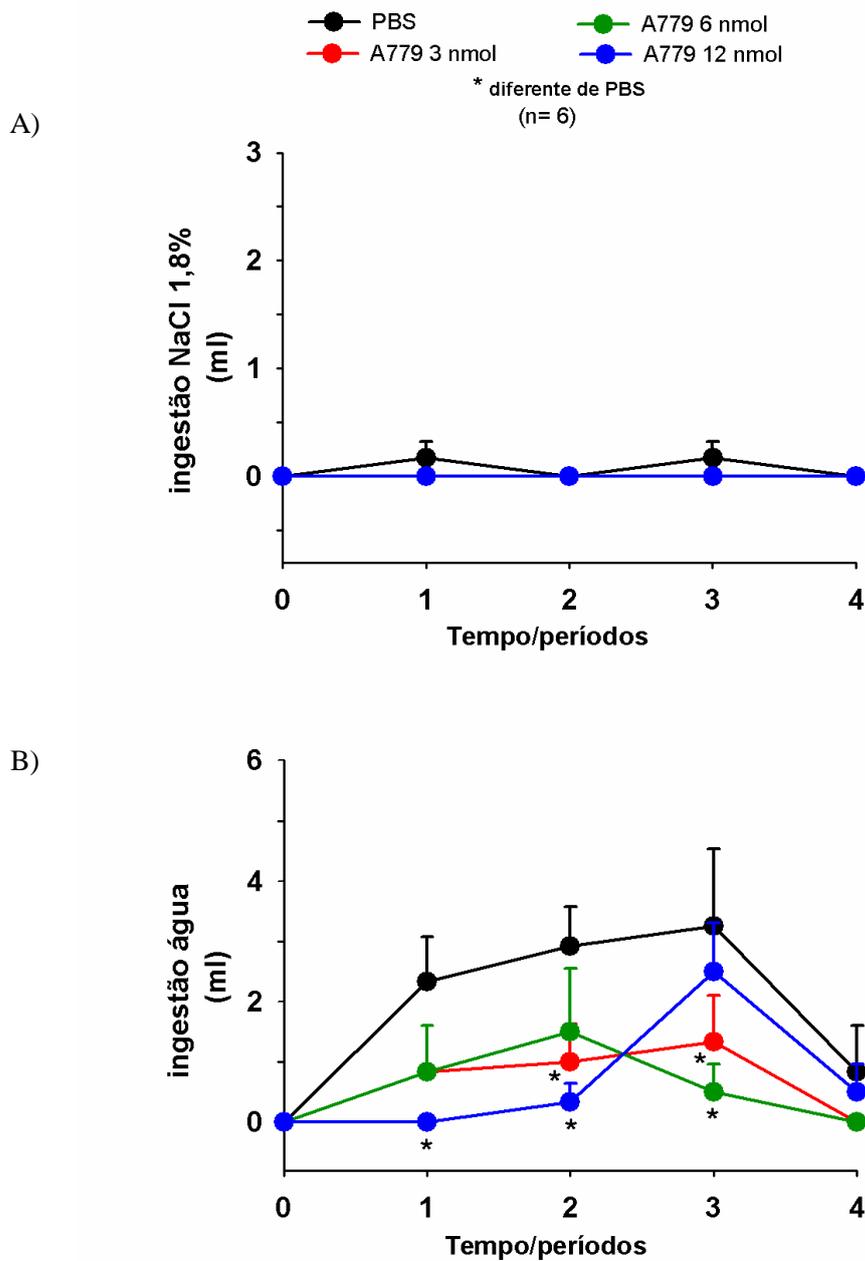
A injeção icv de A779 (3, 6 e 12 nmol/3 $\mu$ l) reduziu a ingestão de água cumulativa induzida pela desidratação intracelular (teste da sede), sendo que ANOVA mostrou uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ,  $3,1 \pm 1,4$ ;  $2,8 \pm 1,6$ ;  $3,3 \pm 1,0$  vs. PBS  $9,3 \pm 2,3$  ml/120 min, respectivamente para 3, 6, 12 nmol/3 $\mu$ L de A779, **Figura 9**). Essa redução se confirmou no período de tempo 1 (0-15) para 12nmol/3 $\mu$ l, 2 (15-30) para 3 e 12nmol/3 $\mu$ l e 3 (30-60) para 3 e 6 nmol/3 $\mu$ l que mostrou comparado com o veículo redução da ingestão de água (**Figura 10**).

Embora no protocolo da desidratação intracelular o objetivo é estimular a sede e não o apetite ao sódio, foi observada uma reduzida ingestão de NaCl 1,8% nos animais que receberam PBS ( $0,3 \pm 0,3$  mL/120 min) a qual foi abolida pelo prévio tratamento com o A779 em todas as concentrações utilizadas ( $0 \pm 0$  mL/120 min, **Figura 9**). Na análise por períodos, não foram observadas diferenças significativas para a ingestão de sódio (**Figura 10**).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos de A779 (3, 6 e 12 nmol/3 $\mu$ L) na ingestão de 24h (**Tabela 1**).



**Figura 9:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (3, 6 e 12 nmol/3  $\mu$ L) em ratos submetidos a desidratação intracelular (gavagem). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n = 6.



**Figura 10:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS(3  $\mu$ L) ou A779 (3, 6 e 12 nmol/3  $\mu$ L) em ratos submetidos a desidratação intracelular (gavagem). As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média $\pm$  EPM; n= 6.

**Tabela 1:** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (3, 6 e 12 nmol/3 µL) em ratos que haviam sido submetidos a gavagem de NaCl 12%.

Tratamento	PBS	A779	A779	A779
		3 nmol	6 nmol	12 nmol
NaCl 1,8%	0,8±0,7	6±6	11±6	2,5±1
Água	35±12	8±4	11±3	13±3

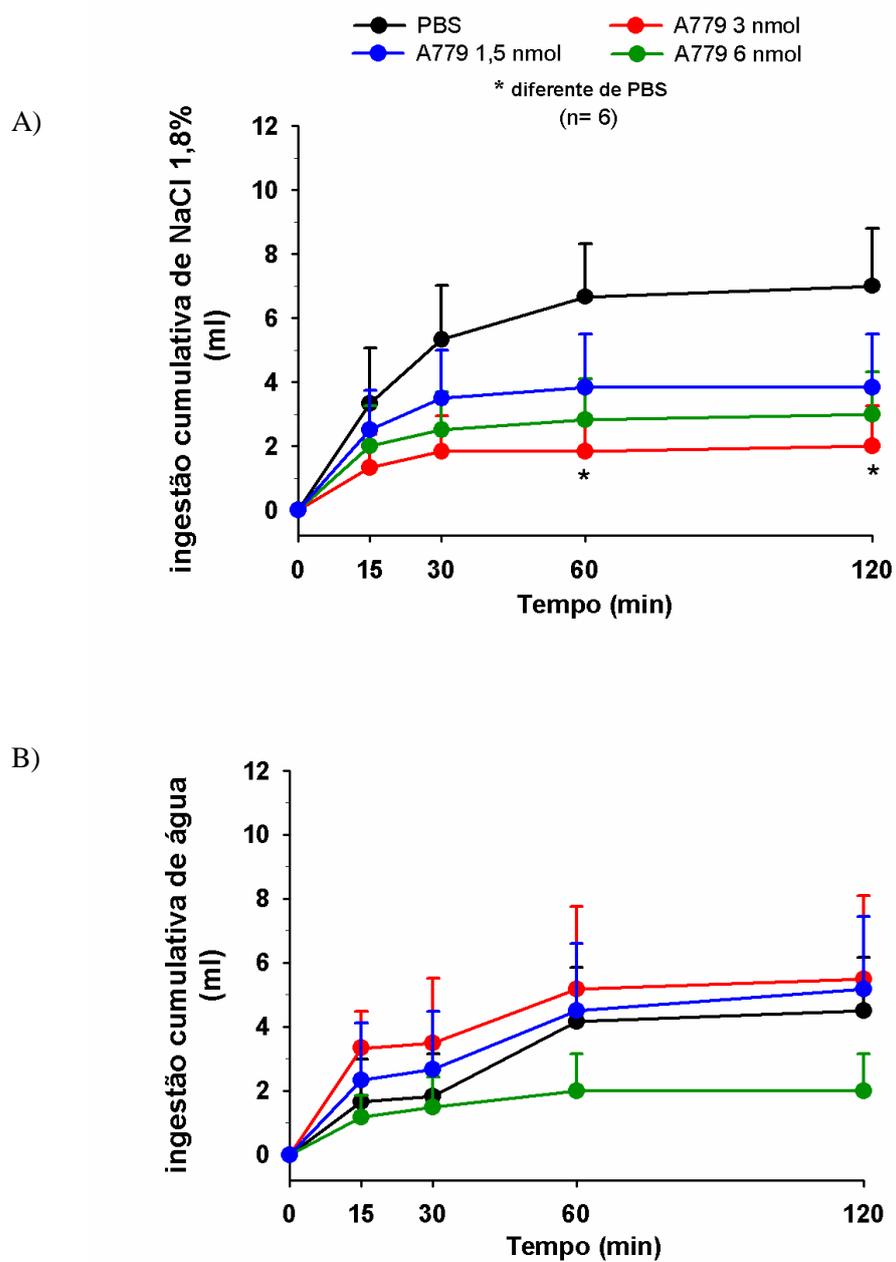
Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = 6.

#### **4.3. Efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos submetidos à desidratação extracelular (depleção de sódio por 24 h).**

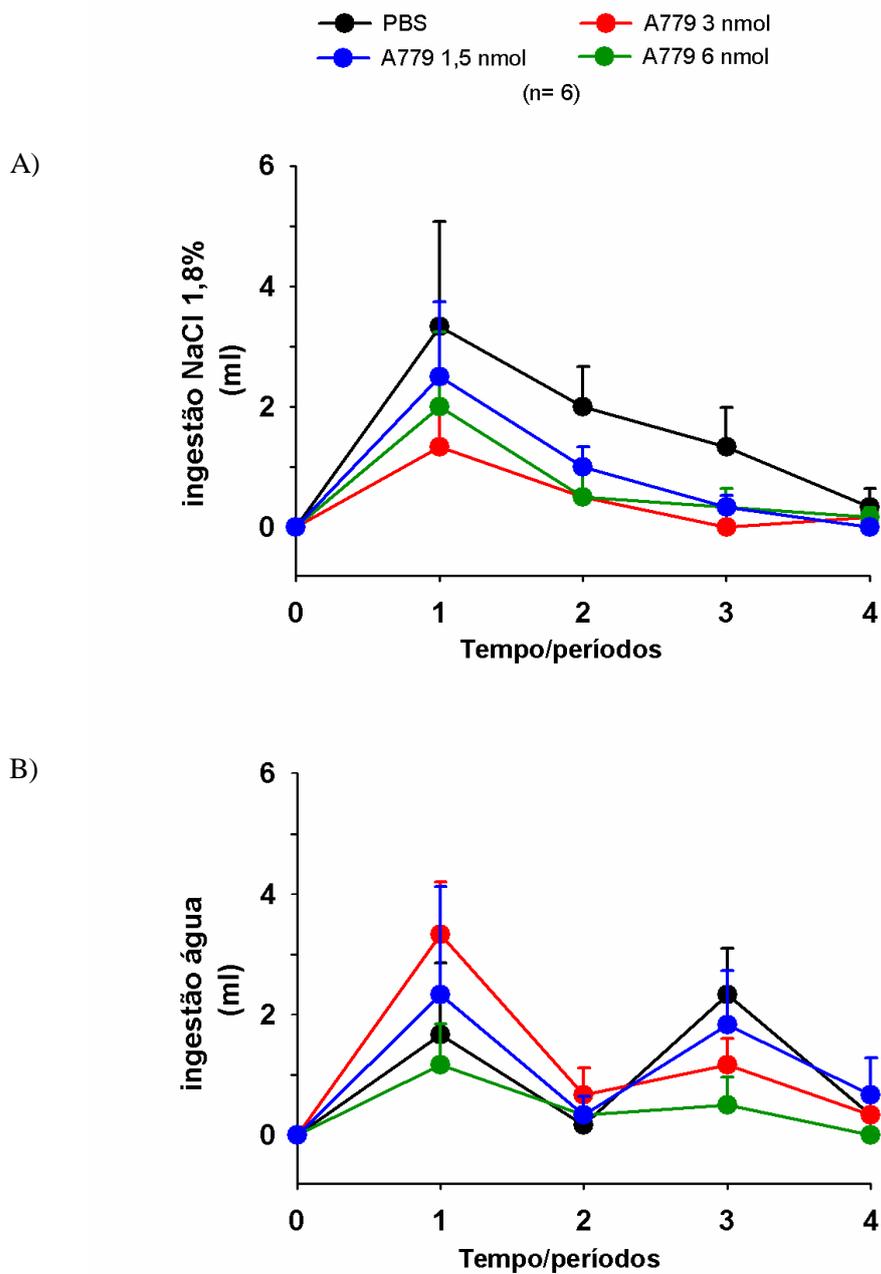
A injeção icv de A779 3 nmol/3µl nos tempos de 60 e 120 min, reduziu a ingestão cumulativa de NaCl 1,8% induzida pela depleção de sódio (teste do apetite ao sódio), sendo que ANOVA mostrou uma diferença significativa para a interação tratamento x tempo ( $p < 0,05$ , 1,8±1,1 vs. PBS 6,6±1,6 mL/60 min; 2±1,2 vs. PBS 7,0±1,7 mL/120 min, **Figura 11**). Considerando os dados de ingestão de NaCl 1,8% por período de tempo não foram observadas diferenças significativas (**Figura 12**).

ANOVA não mostrou uma diferença significativa entre tratamentos para a ingestão de água que acompanha a ingestão de sódio, nem para a ingestão cumulativa (5,1±2,2; 5,5±2,5; 2±1,1 vs. PBS 4,5±1,6 ml/120 min, respectivamente para 1,5; 3 e 6 nmol/3µL de A779, **Figura 11**), nem para análise de ingestão por período (**Figura 12**).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos de A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) na ingestão de 24h (**tabela 2**).



**Figura 11:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) e A779 (1,5;3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) em ratos submetidos a depleção de sódio. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n = 6.



**Figura 12:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) em ratos submetidos a depleção de sódio. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n= 6.

**Tabela 2:** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) em ratos que haviam sido previamente depletados de sódio.

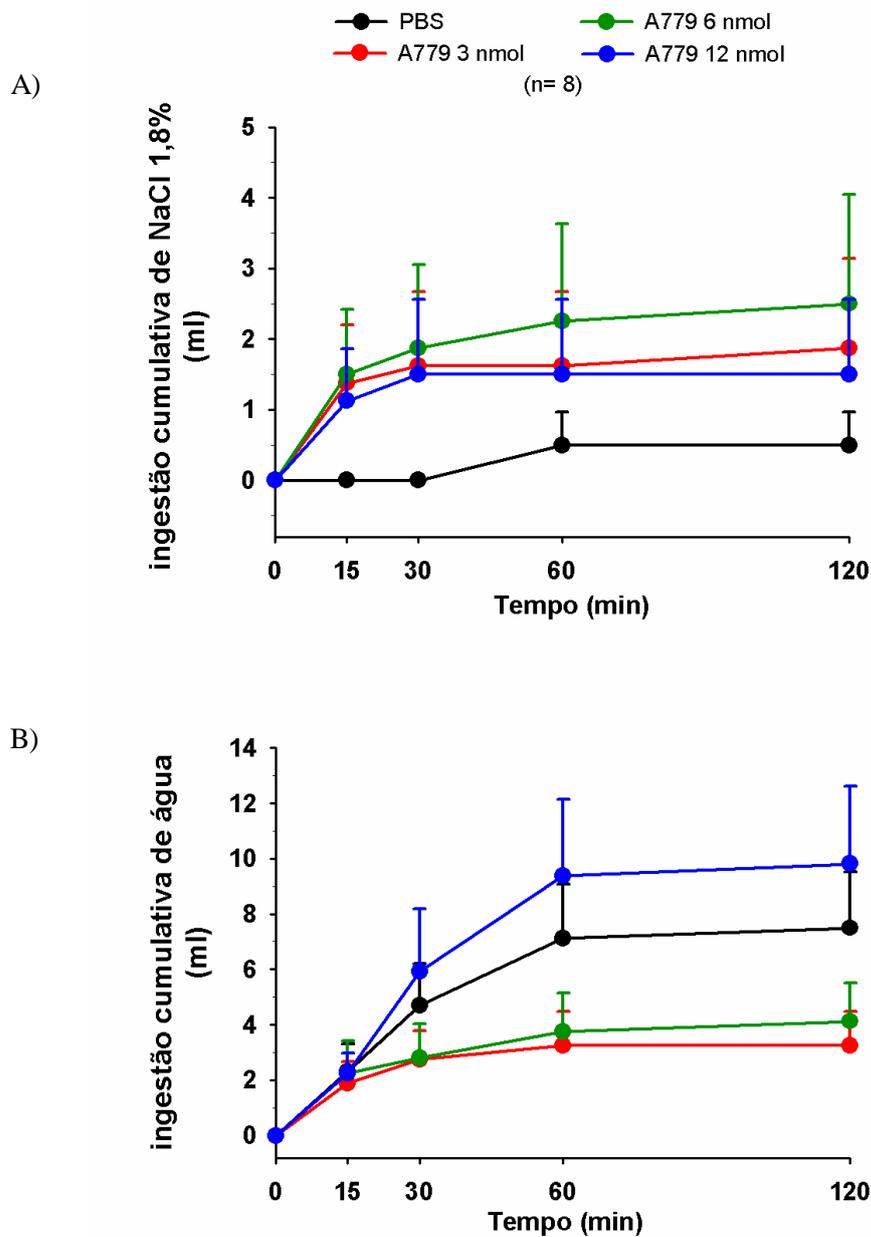
Tratamento	PBS	A779	A779	A779
		1,5 nmol	3 nmol	6 nmol
NaCl 1,8%	14 $\pm$ 7	8 $\pm$ 5	11 $\pm$ 7	8 $\pm$ 7
Água	23 $\pm$ 5	26 $\pm$ 6	28 $\pm$ 6	26 $\pm$ 6

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM, n = 6.

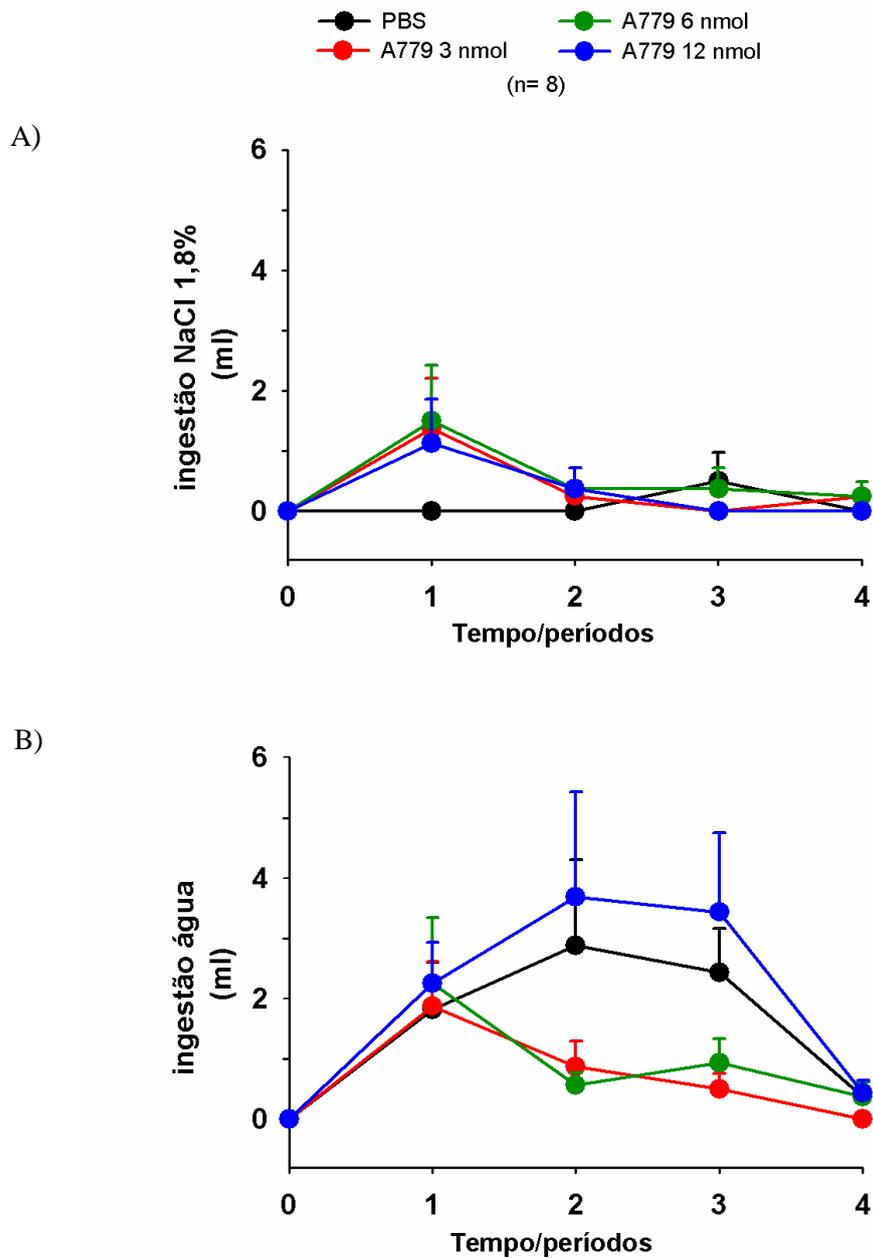
#### 4.4. Efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO/CAP.

A injeção icv de A779 não modificou a ingestão cumulativa de água (3,25 $\pm$ 1,2; 4,1 $\pm$ 1,3; 9,8 $\pm$ 2,8 vs. PBS 7,5 $\pm$ 2,0 mL/120 min, respectivamente, para A779 3, 6 e 12 nmol/3  $\mu$ L, **Figura 13**). No apetite ao sódio induzido por FURO/CAP o A779 (3, 6 e 12 nmol/3  $\mu$ L) também não interferiu na ingestão de NaCl 1,8% (1,8 $\pm$ 1,2; 2,5 $\pm$ 1,5; 1,5 $\pm$ 1,0 vs. PBS 0,5 $\pm$ 0,4 mL/120 min, **Figura 13**). Na análise por períodos também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (**Figura 14**).

Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos de A779 (3, 6 e 12 nmol/3  $\mu$ L) na ingestão de 24h (**Tabela 3**).



**Figura 13:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (3, 6 e 12 nmol/3  $\mu$ L) em ratos submetidos ao tratamento com furosemda e captopril. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n = 8.



**Figura 14:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) em ratos submetidos ao tratamento com furosemida e captopril. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n= 8.

**Tabela 3:** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (3, 6 e 12 nmol/3  $\mu$ L) em ratos que haviam sido previamente tratados com FURO/CAP.

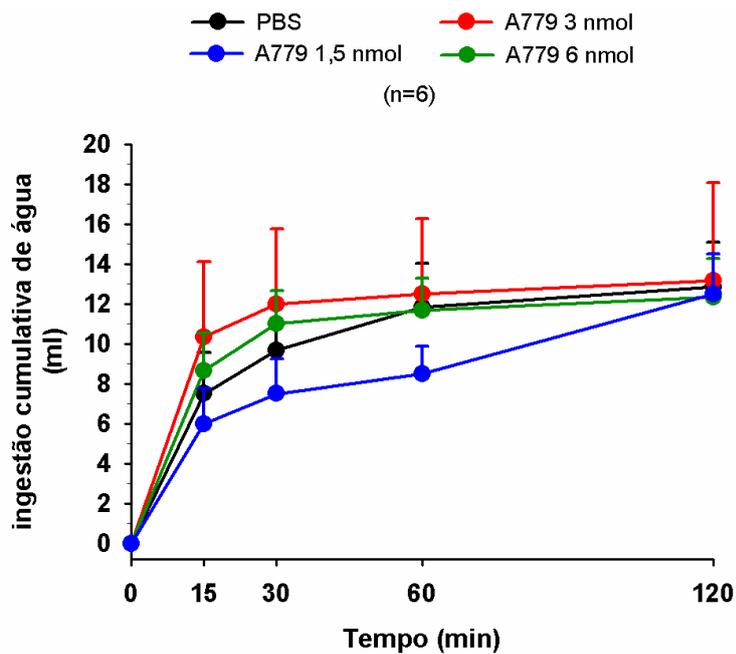
Tratamento	PBS	A779	A779	A779
		3 nmol	6 nmol	12 nmol
NaCl 1,8%	11 $\pm$ 7	11 $\pm$ 9	3 $\pm$ 2	2,5 $\pm$ 2
Água	37 $\pm$ 9	18 $\pm$ 4	29 $\pm$ 2	28 $\pm$ 2

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM, n = 8.

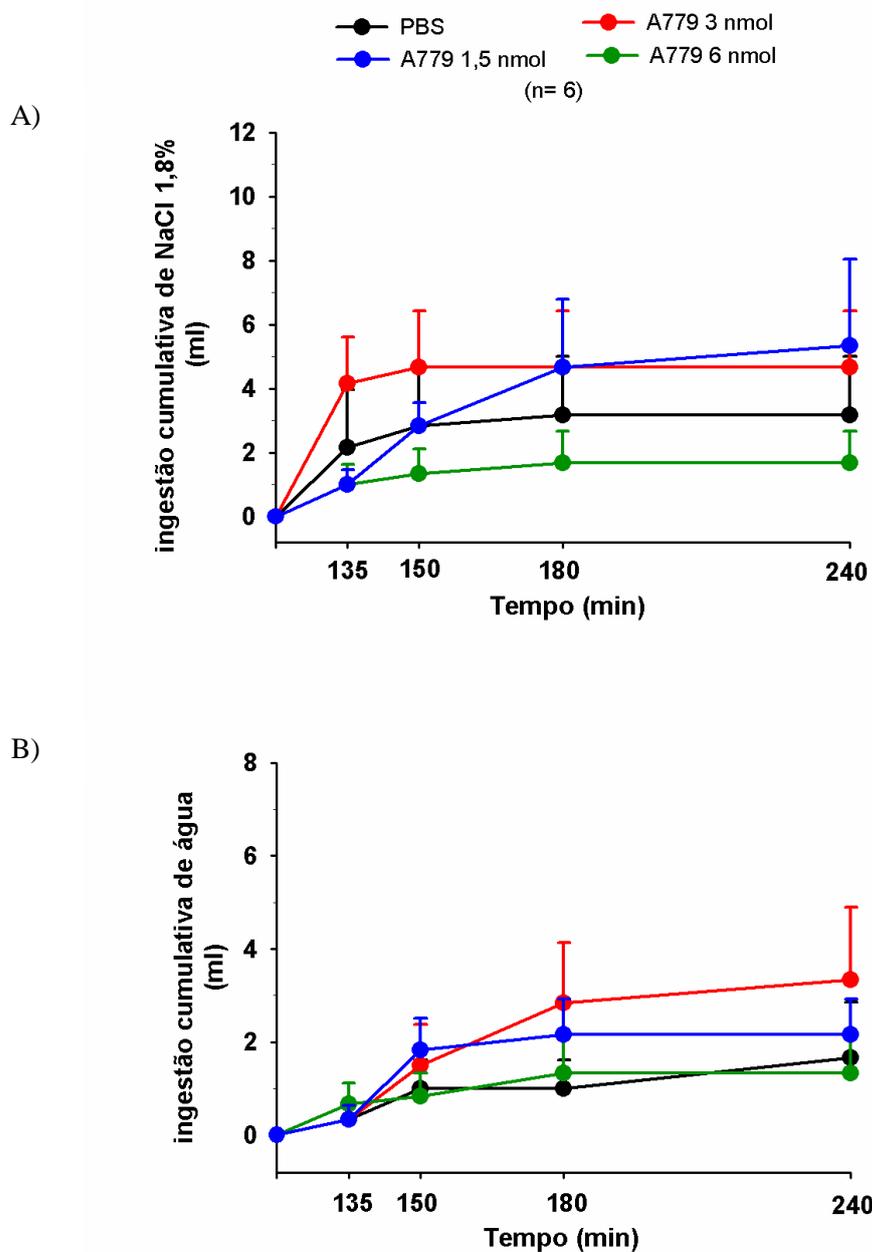
#### 4.5. Efeito central do A779 na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos privados de água por 24 h.

A injeção icv de A779 não reduziu a ingestão cumulativa de água (12,5 $\pm$ 2,0; 13,1 $\pm$ 4,9; 12,3 $\pm$ 1,9 vs. PBS 12,8 $\pm$ 2,4 mL/120 min, respectivamente para A779 1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L, **Figura 15**) na fase de reidratação (sede). No estudo do apetite ao sódio induzido por privação hídrica, A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) também não interferiu na ingestão nem de água (2,2 $\pm$ 0,8; 3,3 $\pm$ 1,6; 1,3 $\pm$ 0,8 vs. PBS 1,7 $\pm$ 1,2 mL/120 min) nem na de NaCl 1,8% (5,3 $\pm$ 3,0; 4,7 $\pm$ 1,9; 1,7 $\pm$ 1,1 vs. PBS 3,2 $\pm$ 2,0 mL/120 min, **Figura 16**). Na análise por períodos também não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos (**Figuras 17 e 18**).

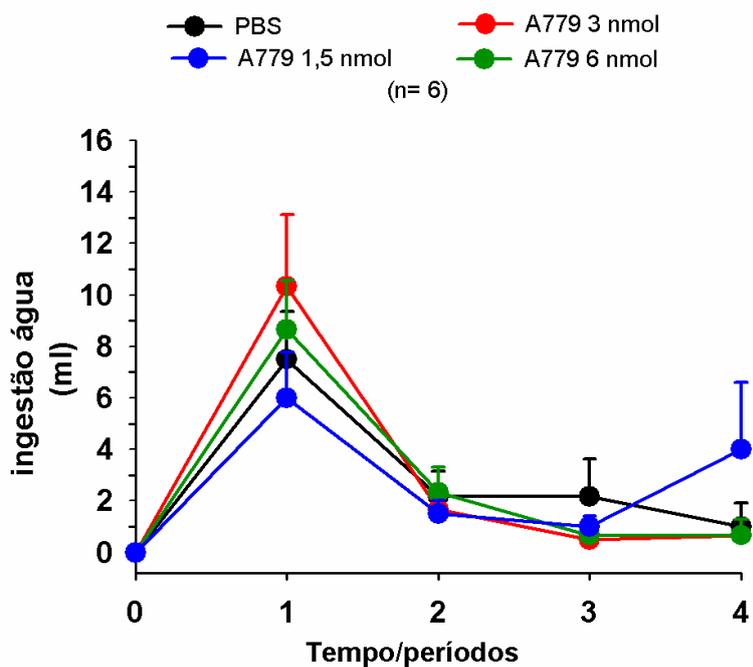
Não foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos de A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) na ingestão de 24h (**Tabela 4**).



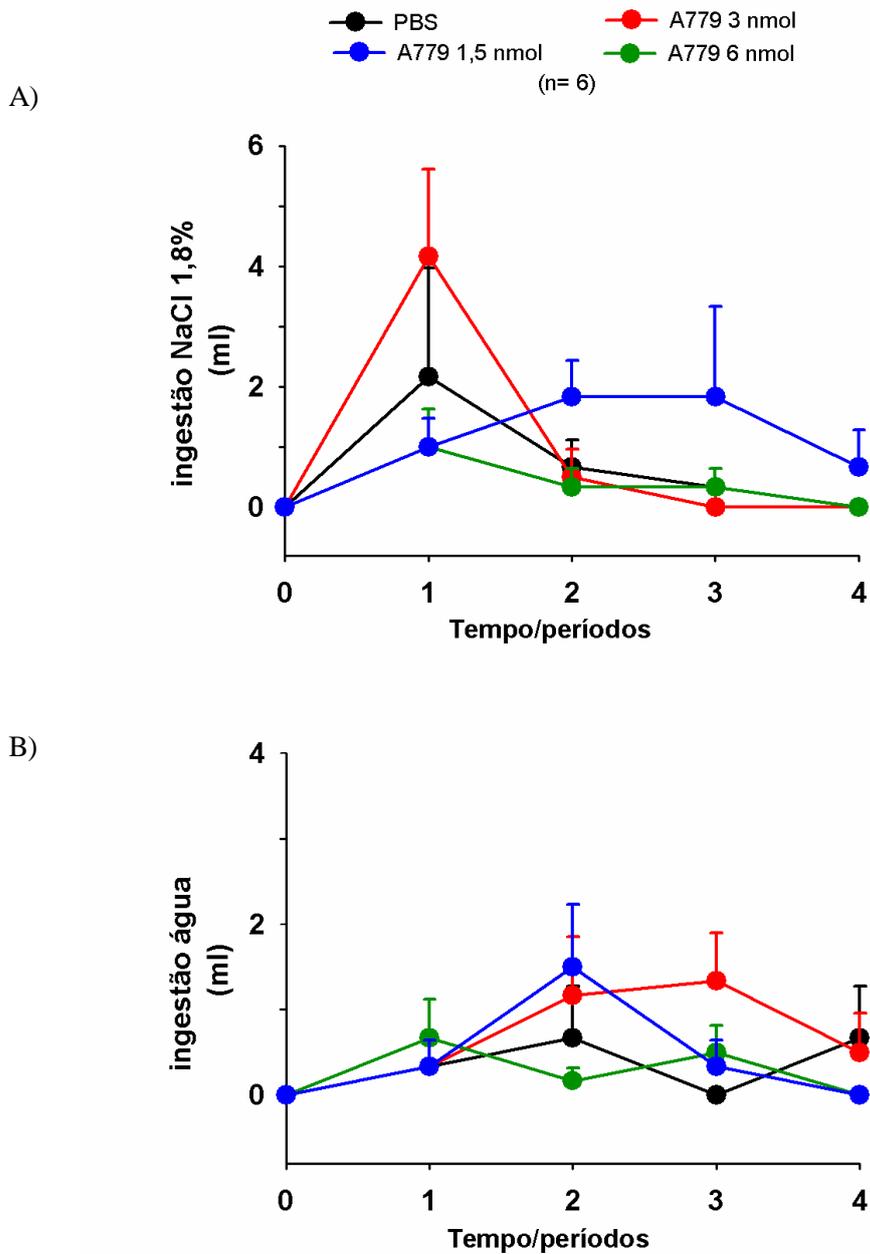
**Figura 15:** Ingestão cumulativa de água (mL) após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) em ratos privados de água por 24 h (período de reidratação – teste da sede). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n = 6.



**Figura 16:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) em ratos privados de água por 24 h. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n = 6.



**Figura 17:** Ingestão cumulativa de água (mL) após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) em ratos privados de água por 24 h (período de reidratação – teste da sede). As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média $\pm$  EPM; n= 6.



**Figura 18:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3  $\mu$ L) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3  $\mu$ L) em ratos privados de água por 24 h. As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n= 6.

**Tabela 4:** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após a injeção no VL de PBS (3 µL) ou A779 (1,5; 3 e 6 nmol/3 µL) em ratos que haviam sido previamente privados de água.

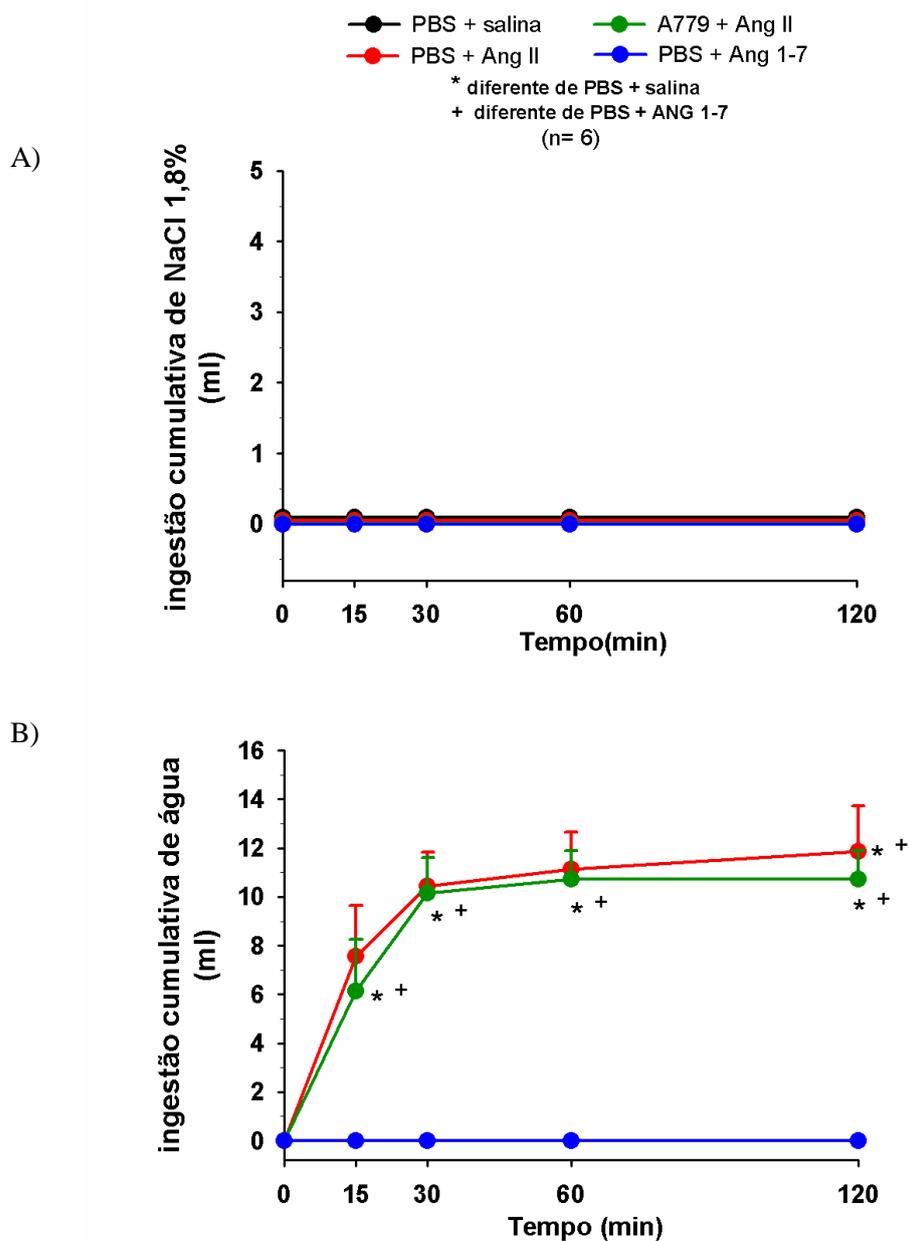
Tratamento	PBS	A779 1,5 nmol	A779 3 nmol	A779 6 nmol
NaCl 1,8%	7,5±4	3,3±1	6,6±3	10±03
água	30±5	30±3	24±3	22±3

Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = 6.

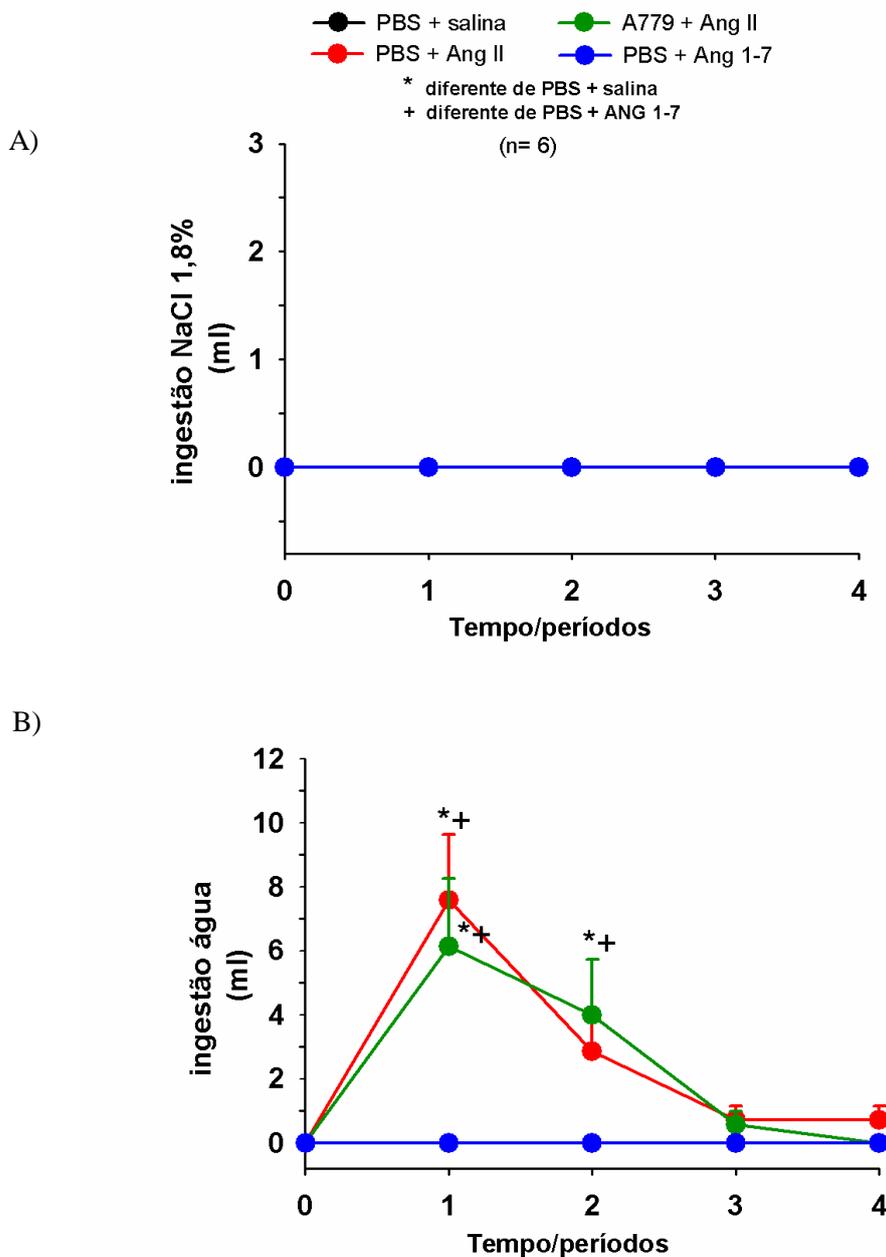
#### 4.6. Efeito da interação do A779 e ANGII na ingestão de água e sódio.

Como esperado, a ANG II (100 ng/1 µL) aumentou a ingestão cumulativa de água (11,9±1,8; vs. PBS 0±0 mL/120 min, **Figura 19**), sendo que o prévio tratamento com A779 (6 nmol/3µL) não alterou este efeito (10,7±1,7 mL/120 min, **Figura 19**). Diferentemente da ANG II, a ANG 1-7 (400 ng/µL) não foi capaz de induzir ingestão de água (**Figura 19**). Na análise por períodos observou-se que o efeito dipsogênico da ANG II ocorreu nos primeiros 15 min após sua administração (período de 0-15: 7,6±2,1vs PBS 0±0 mL, **Figura 20**). Nem ANG II nem ANG 1-7 foram capazes de induzir ingestão de NaCl 1,8% (**Figuras 19 e 20**).

Em relação à ingestão de 24 h, os animais que receberam PBS + ANG II, A779 + ANG II ou PBS + ANG 1-7 apresentaram um ingestão maior de água (respectivamente, 15,7±2,8; 21,4±3,1; 18,6±3,1 mL/24 h) do que o grupo controle (PBS + salina: 11,4±2,2 mL/24h), sem diferenças em relação à ingestão de NaCl 1,8% (**Tabela 5**).



**Figura 19:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 $\mu$ L) + salina (1  $\mu$ L); PBS (3 $\mu$ L) + ANGII (100 ng/1  $\mu$ L); A779 (6 nmol/3 $\mu$ L) + ANGII (100 ng/1  $\mu$ L); PBS (3 $\mu$ L) + ANG1-7 (400 ng/1  $\mu$ L). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  EPM; n = 6.



**Figura 20:** Ingestão de A) NaCl 1,8% (mL) e B) água (mL) após a injeção no VL de PBS (3 $\mu$ L) + salina (1  $\mu$ L); PBS (3 $\mu$ L) + ANGII (100 ng/1  $\mu$ L); A779 (6 nmol/3 $\mu$ L) + ANGII (100 ng/1  $\mu$ L); PBS (3 $\mu$ L) + ANG1-7 (400 ng/1  $\mu$ L). As medidas de ingestão foram feitas nos intervalos de 0-15(1), 15-30(2), 30-60(3) e 60-120(4) min. Os resultados foram expressos como média $\pm$  EPM; n= 6.

**Tabela 5:** Ingestão de NaCl 1,8% (mL) e água (mL) 24 h após o tratamento icv com ANG II (100 ng), ANG 1-7 (400 ng) ou A779 (6 nmol) + ANG II (100 ng).

Tratamento	PBS + salina	PBS + ANGII	A779 ANGII	PBS + ANG1-7
NaCl 1,8%	13±4	0±0	1,4±0,8	0±0
Água	11±2	15±2*	21±3*	18±3*

Os resultados foram expressos como média ± EPM, (\*) = diferente de PBS + salina, n = 6.

## 5. DISCUSSÃO:

Os resultados mostraram que a administração intracerebroventricular do antagonista de receptor MAS, o A779, não alterou nem a ingestão de água nem de NaCl 1,8% induzidas pela privação hídrica e tratamento com FURO/CAP, protocolos que estimulam tanto a sede quanto o apetite ao sódio. Todavia, quando foram utilizados protocolos específicos, o bloqueio dos receptores MAS pelo A779 reduziu a ingestão de água induzida pela desidratação intracelular (administração intragástrica de NaCl hipertônico – 12%) e a de NaCl 1,8% induzida pela desidratação extracelular (depleção de sódio por 24 h). Em relação à ingestão de 24 h, foi observado apenas um pequeno aumento na ingestão de água 24 h após o tratamento com ANG II, A779 + ANG II e ANG 1-7 em relação ao grupo controle, talvez um efeito residual da ação dipsogênica da ANG II e um efeito tardio da ANG 1-7, porém mais estudo seria necessário para se confirmar este resultado.

Um papel da ANG 1-7 na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico já foi anteriormente sugerido. A Ang-(1-7) exerce um efeito antinatriurético e antidiurético em ratos submetidos à sobrecarga hídrica (DiLauro e Burns, 2009; Pinheiro e Simões, 2012), e esse efeito parece se mediado pelo receptor MAS, já que a injeção de A779 bloqueou o efeito antidiurético da ANG 1-7 (Santos e cols., 1996; Simoes e Silva e cols., 1998). Além disso, infusão crônica (8 a 11 dias) do antagonista dos receptores MAS, o A779, promoveu um aumento da diurese associada a um aumento no clearance da creatinina, redução da reabsorção de água e aumento na excreção urinária de sódio, porém sem alterar a excreção fracionada de sódio (Simões e Silva e cols, 1998; Santos e cols, 1996). Estes dados sugerem um papel da ANG 1-7 na excreção renal de água e de sódio, podendo, desta forma, contribuir para a manutenção do equilíbrio hidroeletrólítico.

Como é sabido o equilíbrio hidroeletrólítico é mantido por um balanço entre a entrada e a saída de água e eletrólitos, ou seja, a regulação da osmolaridade e volume dos líquidos corporais envolve a ação integrada dos rins (excreção) com os comportamentos ingestivos da sede e do apetite ao sódio (Aires, 2008). Como foi mencionado anteriormente, a ANG 1-7 apresenta uma ação antidiurética e

antinatriurética (Simões e Silva e cols, 1998; Santos e cols, 1996; Santos e Baracho, 1992; DiLauro e Burns., 2009; Pinheiro e Simões.,2012), todavia será que ela também participaria dos mecanismos centrais envolvidos na sede e no apetite ao sódio?

Estudo de Becker e cols (2007) mostraram a presença de receptores MAS em diversas áreas encefálicas envolvidas na ingestão de água e de sódio, como, amígdala, núcleos hipotalâmicos (paraventricular e supraóptico) e núcleo do trato solitário (Contreras e Stetson, 1981; Kosten e cols., 1983; Hyde e Mirelis, 1984; Watson, 1985; Edwards e cols., 1993; Covian e cols., 1975; Stumpf e Sar, 1979; Sakai e cols., 1990; Galaverna e cols., 1991; Schulkin e cols., 1989; Blackburn e cols. 1992). Considerando a localização dos receptores MAS seria possível que os mesmos estivessem envolvidos na regulação da sede e do apetite ao sódio. Todavia, embora estudo de Mahon e cols (1995) tenha mostrado que injeção icv de ANG 1-7 induz expressão da proteína c-fos (marcador de atividade neuronal) no núcleo preóptico mediano e o órgão vasculoso da lamina terminal (áreas envolvidas na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico), ela não foi capaz de induzir nem ingestão de água nem de sódio em ratos saciados e normohidratados, diferentemente, do efeito da ANG II que além de induzir sede e apetite ao sódio, induziu expressão de fos nas mesmas áreas que a ANG 1-7 e também no órgão subfornicial, núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo. O dado de Mahon e cols (1995) condiz com o resultado apresentado após a injeção icv de ANG 1-7 (400 ng) em ratos saciados, a qual não foi capaz de induzir nem sede nem apetite ao sódio, embora seja uma concentração capaz de reduzir a ingestão de alimento induzida por privação de ração (De Marchi, 2014).

Assim, parece que numa situação de saciedade (sem necessidade fisiológica de ingerir água ou sódio), a ANG 1-7 não seria capaz de sozinha desencadear o comportamento da sede e do apetite ao sódio. Todavia, os resultados apresentados neste trabalho sugerem um envolvimento da ANG 1-7 quando a sede ou apetite ao sódio são estimulados separadamente, mas não em conjunto. A injeção icv de A779 reduziu a ingestão de água induzida pela desidratação intracelular e de sódio induzida pela desidratação extracelular, sugerindo um envolvimento da ANG 1-7 nestes comportamentos ingestivos, sendo que seu efeito seria facilitatório para a ingestão, assim como o da ANG II (Sakai e cols, 1986; Weiss e cols, 1986).

Associando estes resultados, com os efeitos renais da ANG 1-7 (Simões e Silva e cols, 1998; Santos e cols, 1996; Santos e Baracho, 1992; DiLauro e Burns., 2009; Pinheiro e Simões.,2012), seria possível que o objetivo da ANG 1-7 numa situação de desidratação intracelular seria ativar os mecanismos da sede e aumentar a reabsorção renal de água no intuito de normalizar a osmolaridade, talvez por meio da estimulação da secreção de vasopressina (Schiavone e cols, 1988). Em relação à desidratação extracelular, os efeitos de ingestão e excreção de sódio também se somariam, sendo que ela participaria da estimulação do apetite ao sódio ao mesmo tempo que teria um efeito em diminuir a natriurese (Pinheiro e Simões, 2012), colaborando para a restauração do volume extracelular. Todavia, os efeitos renais da ANG 1-7 foram observados após a administração periférica, não central, sendo necessários mais experimentos para se comprovar qual seria o efeito da injeção central da ANG 1-7 na excreção renal.

Curiosamente nos protocolos em que tanto a sede quanto o apetite ao sódio foram estimulados, o A779 não interferiu nos comportamentos ingestivos, diferentemente, do que acontece para a ANG II, sendo que a administração central de antagonistas de receptores de ANG II ou bloqueadores da enzima conversora de angiotensina aplicados periféricamente reduzem a ingestão de água induzida por FURO / CAP (Menani e cols., 1998; Mecawi e cols., 2008) e inibem a ingestão de sódio hipertônico e de água durante a reidratação parcial após privação hídrica de 24h (Sato e cols., 1996), Além disso, injeções icv repetidas de ANG II aumenta a ingestão de solução hipertônica de NaCl no protocolo de FURO/CAP (Bryant e cols., 1980).

Uma vez que a ANG II tem um importante papel na sede e no apetite ao sódio, e a administração icv do A779 foi capaz de reduzir tanto sede quanto o apetite ao sódio, foi estudado se o A779 poderia interferir no efeito dipsogênico da ANG II em ratos saciados/normohidratados. Como esperado a ANG II induziu ingestão de água, a qual não foi afetada pelo prévio tratamento com A779, assim os resultados confirmam evidências anteriores que mostraram que as ações do A779 é por meio da ligação em um receptor distinto dos receptores AT1 e AT2 (Ambuhl e cols., 1994; Santos e cols., 1994), o receptor MAS. Portanto, a redução da ingestão de água e de NaCl 1,8% observada após a administração de A779 não foi devida a uma ação inespecífica do

mesmo em receptores da ANG II, sugerindo, um possível papel do receptor MAS da ANG 1-7 na regulação da ingestão de água e sódio.

Os resultados apresentados mostram um envolvimento do receptor MAS, e conseqüentemente sugerem a participação da ANG 1-7, nos mecanismos centrais que norteiam a sede e o apetite ao sódio, todavia, mais estudos serão necessários para se esclarecer quais são estes mecanismos e se eles seriam similares ou não aos da ANG II.

## **6. CONCLUSÃO:**

Os resultados sugerem um possível papel facilitatório da ANG 1-7 endógena na sede induzida por desidratação intracelular e no apetite ao sódio induzido por desidratação extracelular.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS:

Abbas A, Gorelik G, Carbini LA, Scicli AG. (1997). Angiotensin-(1-7) induces bradykinin mediated hypotensive responses in anesthetized rats. *Hypertension* 30: 217-21. Angiotensins on day-night fluctuations and stress-induced changes in blood pressure. (2002). *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 282:1663–1671.

Aires, M.M. FISILOGIA. (2008). Seção 9: Fisiologia Endócrina - Regulação do Balanço Hidroeletrólítico, 1118-1136, 3ª Edição.

Ambuhl P, Felix D & Khosla MC. (1994). [7-D-ALA]-angiotensin-(1–7): selective antagonism of angiotensin-(1–7) in the rat paraventricular nucleus. *Brain Research Bulletin* 35: 289–291.

Blair- West, J. R., Burns, P., Denton, D. A., Ferraro, T., Mcburnie, M. I., Tarjan, E. And Weisinger, R. S. (1994). Thirst induced by increasing brain sodium concentration is mediated by brain angiotensin. *Brain Res.*, 637:335-338.

Blackburn, R. E., Demko, A. D., Hoffman, G. E., Stricker, E. M., Verbalis, J. G. (1992). Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.* 62:1347-53.

Botelho L.M, Block C.H, Khosla M.C, Santos R.A.S. (1994). Plasma angiotensin-(1-7) levels is increased by water deprivation, salt load and hemorrhage. *Peptides.* 4:723-9.

Bryant R.W, Epstein A.N, Fitzsimons J.T, Fluharty S.J. (1980). Arousal of a specific and persistent sodium appetite in the rat with continuous intracerebroventricular infusion of angiotensin II. *J Physiol.* 301:365–82.

Brosnihan K.B, Li P, Ferrario C.M. (1996). Angiotensin-(1–7) dilates canine coronary arteries through kinins and nitric oxide. *Hypertension.* 27.

Campagnole-Santos M.J, Heringer S.B, Batista E.N, Khosla M.C, Santos R.A. (1992). Differential baroreceptor reflex modulation by centrally infused angiotensin peptides. *Am J Physiol.* 263:89–94.

Campbell D.J, Zeitz C.J, Esler M.D & Horowitz J.D. (2004). Evidence against a major role for angiotensin converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) in angiotensin peptide metabolism in the human coronary circulation. *Journal of Hypertension.*22: 1971–1976.

Chappell M.C, Pirro N.T, Sykes. (1998). A and Ferrario C.M. Metabolism of angiotensin-(1–7) by angiotensin-converting enzyme. *Hypertension.*1: 362–367.

Chappel MC & Ferrario CM (2006). ACE and ACE2: their role to balance the expression of angiotensin II and angiotensin-(1–7). *Kidney Int* 70, 8–10.

Contreras R. J. and Stetson, P. W. (1981). Changes in salt intake after lesions of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. *Brain Res.*211: 355-366.

Covian M. R, Antunes Rodrigues J, Gentil, C. G., Saad, W. A., Camargo, L. A. and Silva Neto, C. R. (1975). Central control of salt balance. In: Neural integration of physiological mechanisms and behaviour (Stevenson, J. A. F. Memorial Volume) Mogenson, G. S. e Calaresu, F. R. (eds) University of Toronto Press 267-282.

De la Serna, F. (2006). Curso: Insuficiência Cardíaca Crônica: Sistema Renina-Angiotensina. 4: 42-63.

De Marchi P.M. (2014). Angiotensina II e Angiotensina 1-7: Ação anoréxica central em ratos privados de alimento . 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado em Saúde e Nutrição) – Escola de Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Minas Gerais.

Dilauro M. & Burns K.D. (2009). Angiotensin-(1–7) and its effects in the kidney. Scientific World Journal 9: 522–535.

Donoghue M, Hsieh F, Baronas e cols. (2000). A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. Circ Res. 87: 1-9.

Edwards G.L, Beltz, T.G., Power, J.D. & Johnson, A.K. ( 1993).Rapid-onset “need-free” sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. Am. J. Physiol. 264: 1242-1247.

Fernandes L, Fortes ZB, Casarini DE, Nigro D, Tostes RC, Santos RA, de Carvalho MH. (2005). Role of PGI<sub>2</sub> and effects of ACE inhibition on the bradykinin potentiation by angiotensin-(1-7) in resistance vessels of SHR. *Regul Pept.* 15.

Fitzsimons J.T. (1998). Angiotensin, thirst and sodium appetite. *Physiol Rev.* 38 (3): 583-686.

Fitzsimons J.T. (1980). Angiotensin stimulation of the central nervous system. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 87:117-167.

Fitzsimons J. T. (1981). The role of angiotensin II in the control of hypovolemic thirst and sodium appetite. *Adv. Physiol. Sci.* 11:555-562.

Fluharty S. J. & Epstein, A. N. (1983). Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. *Behav. Neurosci.* 97:746-758.

Fontes M.A.P, Silva L.C.S, Campagnole-Santos M.J, Khosla M.C, Guertzenstein P.G, Santos R.A.S. (1994). Evidence that angiotensin-(1-7) play a role in the central control of blood pressure at the ventro-lateral medulla acting through specific receptor. *Brain Res.* 1:175-180.

Formenti S, Colombari E. (2011). Mecanismos neuro-hormonais envolvidos na regulação do apetite ao sódio: alguns aspectos. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde*. 3: 160-167.

Garcia N.H, Garvin J.L.(1994). Angiotensin-(1-7) has a biphasic effect on fluid absorption in the proximal straight tubule. *J Am Soc Nephrol*. 5:1133-8.

Galaverna O, De Luca JR, L. A., Schulkin, J, Yao, S.Z & Epstein, A. N. (1991). Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res. Bull*. 28: 89-98.

Heitsch H, Brovkovich S, Malinski T, Wiemer G. (2001). Angiotensin-(1-7)-Stimulated Nitric Oxide and Superoxide Release From Endothelial Cells. *Hypertension*.37(1).

Hyde T. M. & Mirelis, R. R. (1984). Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance. *Am. J. Physiol*. 247 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 16: 173-182.

Johnson A.K, Thunhorst R.L. (1997). The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration, *Front. Neuroendocrinol*. 18: 292– 353.

Kostenis E, Milligan G, Christopoulos A, Sanchez-Ferrer CF, Heringer-Walther S, Sexton PM, Gemhardt F, Pharm M, Kellett E, Phill D, Vanderheyden P, Schultheiss H, Walther T. (2005). G-Protein-Coupled Receptor Mas Is a Physiological Antagonist of the Angiotensin II Type 1 Receptor. *Circulation*.111.

Kosten T, Contreras, R. J., Stetson, P. W. and Ernest, M. J. (1983). Enhanced saline intake and decrease heart rate after area postrema ablations in rat. *Physiology & Behavior*, vol. 31: 777-785.

MacGregor DP, Murone C Song K, Allen AM, Paxinos G and Medelsohn FA. (1995). Angiotensin II receptor subtypes in the human central nervous system. *Brain Res.*, 675:231-40

Machado R.D, Santos R.A, Andrade SP. (2000). Opposing actions of angiotensins on angiogenesis. *Life Sci*. 66(1).

Machado R.D, Santos R.A, Andrade SP. (2001). Mechanisms of angiotensin-(1-7) - induced inhibition of angiogenesis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 280(4).

Mahon J M, Allen M, Hernert J and Fitzsimons J.T. (1995). The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after intracerebroventricular injection of angiotensin II, angiotensin- (1-7) or carbachol. *Neuroscience*. 1: 199-208.

Mckinley, M. J., Denton, D. A., Nelson, J. F and Weisinger, R. S. (1983). Dehydration induces sodium depletion in rats, rabbits, and sheep. *Am. J. Physiol.* 245 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 14: 287-292.

Mecawi A.S, Lepletier A, Araujo I.G, Fonseca F.V, Reis L.C. ( 2008). Oestrogenic influence on brain AT1 receptor signalling on the thirst and sodium appetite in osmotically stimulated and sodium-depleted female rats. *Exp Physiol.* 93:1002–10.

Mehta P.k, Griendling K. (2006). Angiotensin II cell signaling: physiological and pathological effects in the cardiovascular system. *Am j Physiol Cell Physiol.* 292.

Menani J.V, Colombari D.S, Beltz T.G, Thunhorst R.L, Johnson AK. (1998). Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. *Brain Res;* 801:29–35.

Oudit GY, Herzenberg AM, Kassiri Z, Wong D, Reich H, Khokha R et al. (2006). Loss of angiotensin-converting enzyme-2 leads to the late development of angiotensin II dependent glomerulosclerosis. *Am J Pathol* 168, 1808–1820.

Paula R.D, Lima C.V, Khosla M.C, Santos R.A. (1995). Angiotensin-(1-7) potentiates the hypotensive effect of bradykinin in conscious rats. *Hypertension.* 26:1154-9.

Porsti I, Bara A.T, Busse R, Hecker M. (1994). Release of nitric oxide by angiotensin-

(1-7) from porcine coronary endothelium: implications for a novel angiotensin receptor. *Br J Pharmacol*. 111(3).

Pinheiro S.V.B & Silva A.C.S. (2011). Angiotensin Converting Enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and Receptor Mas Axis in the Kidney. *International Journal of Hypertension*.

Pinheiro S.V & Simoes S.A.C. (2012). Angiotensin converting enzyme 2, angiotensin-(1-7), and receptor MAS axis in the kidney. *International Journal of Hypertension*.41412.

Rice G.I, Thomas D.A, Grant P.J, Turner A.J and Hooper N.M. (2004). Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. *Biochemical Journal*. 383 (1): 45–51.

Santos R.A.S, Baracho N.C.V. (1992). Angiotensin-(1-7) is a potent antidiuretic peptide in rats. *Braz J Med Biol Res*. 25: 651-4.

Santos R.A , Campagnole-Santos M.J. (1994). Central and peripheral actions of angiotensin-(1-7). *Braz J Med Biol*. 27: 1033-47.

Santos R.A.S, Simões e Silva A.C, Maric C, Silva DM, Machado RP, Buhr I et al. (2003). Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled

receptor Mas. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 8258–8263.

Santos E.L, de Picoli Souza K, da Silva E.D, Batista E.C, Martins P.J.F, D'Almeida V, Pesquero J.B. (2009). Long term treatment with ACE inhibitor enalapril decreases body weight gain and increases life span in rats. *Biochemical Pharmacology*. 78: 951–958.

a - Santos E.L, de Picoli Souza K, Cibrian-Uhalte E, Oliveira S.M, Bader M, Costa-Neto C.M, e cols. (2008). Essential role of TM V and VI for binding the C-terminal sequences of Des-Arg-kinins. *Int Immunopharmacol*. 8: 282–288.

Santos R.A, Simões e Silva A.C, Magaldi A.J, Khosla M.C, Cesar K.R, Passaglio K.T. & Baracho N.C. (1996). Evidence for a physiological role of angiotensin-(1–7) in the control of hydroelectrolyte balance. *Hypertension* 27.

Sakai R. R, Nicolaidis, S. & Epstein, A. N. (1986). Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin and aldosterone. *Am. J. Physiol*. 251: 762-768.

Sato M. A, Yada M.M, Renzi A, Camargo L. A. A, Saad, W. A., Menani J.V. & De Luca Jr L. A. (1996). Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29:1663-1666.

Schiavone, M.T, Santos R.A.S, Brosnihan, K.B, Khosla M.C, Ferrario C.M. (1988).

Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypo-physical system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. *Proc Natl Acad Sci USA*. 85: 4095-4098.

Schiffirin E.L, Genest, J. (1982). Mechanism of captopril induced drinking. *Am J Physiol*, 136-40.

Silva A.C.S, Belloa A.P.C, Barachoa N.C.V, Khoslab M.C, Santos R.A.S. (1998). Diuresis and natriuresis produced by long term administration of selective Angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. *Regulatory Peptides*. 74:177-184.

Simões e Silva A.C, Bello AP, Baracho N.C, Khosla M.C & Santos R.A. (1998). Diuresis and natriuresis produced by long term administration of a selective angiotensin-(1-7) antagonist in normotensive and hypertensive rats. *Regulatory Peptides* 74: 177-184.

Stricker E. M., & J. E. Jalowiec. (1970). Restoration of intravascular fluid volume following acute hypovolemia in rats. *Am. J. Physiol.*218:191-196.

Schulkin, J, Marini, J. & Epstein, A. N. (1989). A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. *Behav. Neurosc.* 103,178-185.

Stumpf, W. E. & Sar, M. (1979). Glucocorticoid and mineralocorticoid hormone target sites in the brain: autoradiographic studies with corticosterone, aldosterone and dexamethasone. In: Interaction within the brain pituitary-adrenocortical system. Jones, M. T., Dallman, M. F., Chattopadhyay, S. eds., New York: Academic Press, 137-147.

Tipnis S.R, Hooper N.M, Hyde R, Karran E, Christie G e Turner A.J. (2000). A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril insensitive carboxypeptidase. *J Biol Chem* 275, 33238–33243.

Verbalis, J.G, Blackburn, R. E, Olson, B.R, Stricker, E. M. (1993). Central oxytocin inhibition of food and salt ingestion: a mechanism for intake of solute homeostasis. *Regulatory Peptides*.45:149-154.

Vickers C, Hales P, Kaushik V e cols. (2002). Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. *Journal of Biological Chemistry*.17: 14838–14843.

Ye M, Wysocki J, William J, Soler MJ, Cokic I & Batlle D (2006). Glomerular localization and expression of Angiotensin converting enzyme 2 and Angiotensin-

converting enzyme:implications for albuminuria in diabetes. *J Am Soc Nephrol* 17, 3067–3075

Watson W. E. (1985). The effect of removing area postrema on the sodium and potassium balances and consumptions in the rat. *Brain Res.* 359:224-232.

Weir M.R, Dzau, V.J. (1999). The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: A Specific Target for Hypertension Management. *American Journal of Hypertension.*12: 189-194.

Weiss M. L, Moe, K. E. & Epstein, A. L. (1986). Interference with central actions of angiotensin II suppresses sodium appetite. *Am. J. Physiol.* 250 (Regul. Integr. Comp. Physiol.19:250-259.

Weisinger R. S., Blair-West J. R, Burns P, Denton D. A, Mckinley M. J. & Tarjan, E. (1996). The role of angiotensin II in ingestive behaviour: A brief review of angiotensin II, thirst and Na appetite. *Regulatory Peptides.* 66:73-81.

Weisinger R. S, Denton D. A, Mckinley, M. J. and Nelson, J. F.(1985). Dehydration-induced sodium appetite in rats. *Physiol. Behav.* 41:45-50.

Zheng H, Liu X, Patel K.P. (2011). Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression

improves central nitric oxide-mediated sympathetic outflow in chronic heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 301: 2402-12.