

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CAPTOPRIL, LOSARTAN,  
FUROSEMIDA E ISOPROTERENOL DURANTE A GESTAÇÃO E  
LACTAÇÃO DE RATAS, NO COMPORTAMENTO INGESTIVO DOS  
FILHOTES E DA PROLE ADULTA**

**Fabírcia Gonçalves de Oliveira**

**2010**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**  
**CIÊNCIAS CLÍNICAS**

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM CAPTOPRIL,  
LOSARTAN, FUROSEMIDA E ISOPROTERENOL DURANTE A  
GESTAÇÃO E LACTAÇÃO DE RATAS, NO COMPORTAMENTO  
INGESTIVO DOS FILHOTES E DA PROLE ADULTA**

**FABRÍCIA GONÇALVES DE OLIVEIRA**

*Sob a orientação do professor*

**LUIS CARLOS REIS**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no curso de pós-graduação em Medicina Veterinária, na área de concentração em Ciências Clínicas

Seropédica, RJ  
Setembro de 2010

686.089558

O48i

T

Oliveira, Fabrícia Gonçalves de,  
1980-

Influência do tratamento com  
captopril, losartan, furosemida e  
isoproterenol durante a gestação e  
lactação de ratas, no comportamento  
ingestivo dos filhotes e da prole  
adulta / Fabrícia Gonçalves de  
Oliveira - 2010.

xvii, 71 f.: il.

Orientador: Luis Carlos Reis.

Dissertação (mestrado) -  
Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em  
Medicina Veterinária.

Bibliografia: f. 59-71.

1. Farmacologia veterinária -  
Teses. 2. Rato - Teses. 2.  
Amamentação - Teses. 3. Lactentes -  
Efeito das drogas - Teses. 4.  
Medicamentos - Efeitos colaterais -  
Teses. I. Reis, Luis Carlos, 1952-  
II. Universidade Federal Rural do  
Rio de Janeiro. Curso de Pós-  
Graduação em Medicina Veterinária.  
III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**  
**INSTITUTO DE VETERINÁRIA**  
**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**FABRÍCIA GONÇALVES DE OLIVEIRA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências** no Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, área de Concentração em Ciências Clínicas.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

Luis Carlos Reis. Ph.D. UFRRJ

(Orientador)

---

Amilton Paulo Raposo Costa, D. Sc. – UFPI

Membro

---

Wellington da Silva Côrtes, D. Sc - UFRRJ

Membro

## **DEDICATÓRIA**

A Deus, pela presença constante em minha vida,  
e ao meu esposo, pelo apoio incondicional.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu querido esposo Edilon, pelo amor e carinho que tem a mim dispensado, sobretudo pelo seu apoio.

Aos meus pais João e Maria pelo exemplo de vida. Mesmo distante sei que estão ao meu lado.

Aos meus irmãos Iara e Marcus Venicius, pelo amor incondicional.

Ao Professor Doutor Luís Carlos Reis, por ter aceitado me orientar. Você é exemplo de vida e de profissional.

A todos os professores do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCF) pelo apoio incondicional para realização do meu experimento.

Ao André, Gislaine, Robertinho, Denison, Virgínia e Brícia, pela ajuda na realização dos experimentos.

Aos amigos do laboratório (André, Gislaine, Robertinho, Brícia, Virgínia, Iracema, Danilo, Cláudio, Guínever, George, Fernanda, Camila, Aline e demais) pelos dias harmoniosos de convivência.

Aos professores do mestrado, pela valiosa transmissão de experiência profissional.

Aos amigos de mestrado (Ana Paula, Waldisílvio, Anne, Maria Clara e os demais) pelos momentos de alegria. Sucesso para todos!

Às secretárias Regina e Lorena, pela empatia mútua, pelas conversas, pelo convívio harmonioso que tivemos. Vocês são pessoas muito especiais.

Aos funcionários do Departamento de Ciências fisiológicas (Seu Juca, Lenir, Sidney e Vicente) pela ajuda na realização do experimento e pelos dias de convívio.

Ao Departamento de Ciências Fisiológicas por ter ajudado não só com o espaço físico, como também financeiramente na execução deste projeto

## EPÍGRAFE

*“A mente que se abre a uma nova idéia  
jamais voltará ao seu tamanho original.”*

**Albert Einstein**

## RELAÇÃO DE ABREVIATURAS

ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
ADH	Hormônio antidiurético
AHL	Área hipotalâmica lateral
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AP	Área postrema
AT <sub>1</sub>	Receptor de angiotensina I
AT <sub>2</sub>	Receptor de angiotensina II
BBB	Barreira hematoencefálica
CNP	Peptídeo natriurético cerebral
DG	Dia da Gestação
DPN	Dia pós-natal
FEC	Fluido extracelular
ECA	Enzima conversora de angiotensina
PGE	Prostaglandina E
HAGT	Ratos com o gene do angiotensinogênio humano
ICC	Insuficiência cardíaca congestiva
ICV	Intracerebroventricular
MNPO	Núcleo preóptico medial
NDR	Núcleo dorsal da rafe mesencefálica
NMR	Núcleo medial da rafe mesencefálica
NPBL	Núcleo parabraquial lateral
NTS	Núcleo do trato solitário
OT	Ocitocina
OVL	Órgão vascular da lâmina terminalis
P.C	Peso corporal
PNtC	Peptídeo natriurético tipo C
PVN	Núcleo paraventricular
SFO	Órgão subfornicial
SNC	Sistema nervoso central

SNS	Sistema nervoso simpático
SON	Núcleo supra-óptico
SRA	Sistema renina angiotensina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TPA	Ativador de plasminogênio tecidual
VE	Ventrículo esquerdo

## RELAÇÃO DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Esquema geral do SRA .....	04
<b>Figura 2</b>	Esquema geral do SRAA e locais de ação dos vários agentes farmacológicos.....	08
<b>Figura 3</b>	Percentual da ingestão de leite em ratos neonatos, no 4º dia de lactação, tratados com captopril, furosemida e losartan em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de leite do grupo controle .....	21
<b>Figura 4</b>	Percentual da ingestão de leite em ratos neonatos, no 8º dia de lactação, tratados com captopril, furosemida e losartan em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de leite do grupo controle .....	22
<b>Figura 5</b>	Percentual da ingestão de leite em ratos neonatos, no 12º dia de lactação, tratados com captopril, furosemida e losartan em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de leite do grupo controle ..	23
<b>Figura 6</b>	Percentual da ingestão basal de água em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de água do grupo controle.....	24
<b>Figura 7</b>	Percentual da ingestão de salina (1,8% ou 0,3M) em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan em relação à linha base, que corresponde à ingestão de salina do grupo controle. *P<0,05 comparado com grupo salina .....	25
<b>Figura 8</b>	Percentual da ingestão de alimento em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de alimento do grupo controle. ....	26
<b>Figura 9</b>	Percentual do volume de urina em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan, durante o protocolo basal, em relação à linha base, que corresponde ao volume de urina do grupo controle. <sup>†</sup> P<0,05 comparado com grupo salina. <sup>‡</sup> P<0,05 comparado com grupo salina .....	27
<b>Figura 10</b>	Percentual da ingestão de água após uma privação hídrica de 24 h, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan, em relação à linha base, que corresponde à ingestão de água do grupo controle. *P<0,05 comparado com grupo salina .....	28
<b>Figura 11</b>	Percentual da ingestão de salina após uma privação hídrica de 24 h, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan em relação à linha base, que corresponde à ingestão de salina do grupo controle. *P<0,05 comparado com grupo salina .....	29

<b>Figura 12</b>	Percentual do volume de urina em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan, durante o protocolo de privação, em relação à linha base, que corresponde ao volume de urina do grupo controle. ....	30
<b>Figura 13</b>	Percentual da ingestão de água após depleção de sódio, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan em relação à linha base, que corresponde à ingestão de água do grupo controle. *P<0,05 comparado com grupo salina. <sup>γ</sup> P<0,05 comparado com grupo salina. <sup>ψ</sup> P<0,05 comparado com grupo salina .....	31
<b>Figura 14</b>	Percentual da ingestão de salina (1,8%) após depleção de sódio, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan em relação à linha base, que corresponde à ingestão de salina do grupo controle. ....	32
<b>Figura 15</b>	Percentual do volume de urina em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e losartan, durante o protocolo de depleção de sódio, em relação à linha base, que corresponde ao volume de urina do grupo controle. ....	33

## RESUMO

OLIVEIRA, F. G. **Influência do tratamento com captopril, losartan, furosemida e isoproterenol durante a gestação e lactação de ratas, no comportamento ingestivo dos filhotes e da prole adulta.** 2010. 70p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária, Ciências Clínicas). Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

O sistema renina-angiotensina (SRA) tem sido implicado com a organização ontogênica de sistemas neurais relacionados com o comportamento afetivo. Entretanto, não são conhecidas evidências do envolvimento do SRA na ontogênese de sistemas que controlam o equilíbrio hidroeletrólítico. Nesta dissertação objetivou-se investigar o efeito do tratamento com drogas que influenciam a atividade do SRA durante a gestação e lactação de ratas e suas repercussões na resposta natriorexigênica da prole na vida adulta. A alteração do SRA foi evocada com a administração subcutânea de captopril (50 mg/kg), um inibidor da ECA; isoproterenol (300 µg/kg), um betabloqueador; losartan (50 mg/kg), um bloqueador dos receptores de ANG II e furosemida (10mg/kg), um potente diurético da alça, do sétimo dia de gestação até o décimo quarto dia após o parto. A fim de investigar a influência dessas drogas, durante e após o tratamento, sobre a programação homeostática do indivíduo, foi avaliado indiretamente, através de comportamento ingestivo, o equilíbrio hidroeletrólítico dos ratos adultos através das mensurações basais e sob estimulação (privação hídrica, depleção de sódio com furosemida 20mg. kg<sup>-1</sup>, s.c) correlacionando com a influência da alteração neonatal do SRA. Nestes ensaios experimentais foram avaliadas as ingestões de água e NaCl 0,3 M. Ademais, foram avaliadas a ingestão de leite e a ingestão de alimento sob condições basais na idade adulta. Foi avaliado também o índice de mortalidade nos tratamentos e o volume de urina, correlacionando com o efeito das drogas no SRA. Os resultados demonstraram alterações no apetite e na saciedade do neonato, refletido pela menor ingestão de leite nos animais do grupo tratado com isoproterenol, sugerindo a supra-regulação do SRA com subsequente alteração do equilíbrio hidroeletrólítico do corpo. Observou-se também que, no protocolo basal o uso de isoproterenol afetou a ingestão de salina aos 1440 min, tendo, portanto, menor ingestão em relação ao grupo controle. No protocolo de privação houve menor ingestão de água no grupo tratado com captopril no tempo 1440 min e não ocorreram alterações na ingestão de salina. Observou-se ainda que, no protocolo de depleção, houve menor percentual de ingestão de água nos grupos tratados com captopril, isoproterenol e furosemida, aos 1440 min, em relação ao grupo controle. Porém, neste protocolo, não foi observada diferença significativa na resposta natriorexigênica. Em relação à ingestão basal de ração, não houve diferença significativa dos grupos tratados em relação ao controle. Além disso, no protocolo basal, foi observado um maior percentual no volume de urina do grupo tratado com captopril enquanto que no protocolo de privação, houve menor volume nos grupos isoproterenol e furosemida. Já no protocolo de depleção, houve menor volume nos três grupos tratados. Ademais foi observado alto índice de mortalidade em animais provenientes de mães tratadas com losartan. Em suma, estes resultados demonstram que o uso de drogas durante o período neonatal altera a programação da homeostase do equilíbrio hidroeletrólítico e da expressão comportamental ingestiva em ratos adultos.

**Palavras-chave:** SRA; desenvolvimento ontogênico; programação hidroeletrólítica.

## ABSTRACT

OLIVEIRA, F. G. **Influence of treatment with captopril, losartan, furosemide and isoproterenol during pregnancy and lactation in rats on the ingestive behavior of pups and adult offspring.** 2010. 70p. Dissertation (Master Science in Veterinary Medicine, Clinical Sciences) Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2010.

The renin-angiotensin system (RAS) has been involved with the organization ontogenetic neural systems related to affective behavior. However, there is no known evidence of the involvement of RAS in ontogeny of systems that control hydroelectrolytic equilibrium. This dissertation aimed to investigate the effect of treatment with drugs affecting the activity of RAS during pregnancy and lactation of rats and its effects on offspring on natriorexigenic response in adulthood. The change of RAS was raised with the administration subcutaneous administration of captopril (50 mg / kg), an ACE inhibitor; isoproterenol (300 mg/kg), a beta-blocker; losartan (50 mg/kg), a blocker of ANG II receptors and furosemide (10 mg/kg), a potent diuretic handle, from seventh day of pregnancy to fourteenth day after parturition. To investigate the influence of these drugs during and after treatment on the homeostatic programming the individual was assessed indirectly through feeding behavior, the electrolytic equilibrium of adult rats by measurements of basal and under stimulation (water deprivation, sodium depletion with furosemide 20mg. kg<sup>-1</sup>, s.c.) as compared with the influence of neonatal changing of the RAS. In these assays were evaluated intakes of water and NaCl 0,3M. Furthermore, we tested the milk intake and intake of food under basal conditions in adulthood. Also, it was evaluated mortality rate in the treatments and the volume of urine correlating with the effect of drugs on RAS. The results showed changes in appetite and satiety of the neonate, reflected the lowest intake of milk in the treated group with isoproterenol, suggesting a supra-regulation of the RAS with subsequent change the electrolytic equilibrium of the body. It was also observed that in the baseline protocol using isoproterenol affected the intake of saline to 1440 min, and therefore have lower intake than group control. In the protocol of deprivation had lower water intake in the group treated with captopril in time 1440 min and no changes in ingestion of saline. It was also observed that in the depletion protocol, there was a lower percentage of water intake in the groups treated with captopril, isoproterenol and furosemide, at 1440 min, compared to group control. However, in this protocol, no significant difference was observed in response natriorexigenic. Regarding the baseline intake ration, no significant difference in the groups treated compared to control. Furthermore, the protocol baseline, there was a highest percentage in volume of urine in the group treated with captopril while the protocol of deprivation, there was less volume in groups isoproterenol and furosemide. In the depletion protocol, there was less volume in the three groups. Also observed a high rate of mortality in animals from mothers treated with losartan. In short, these results demonstrate that the use of drugs during the period neonatal programming alters the homeostatic balance electrolyte and expression of ingestive behavior in rats adults.

**Keywords:** RAS; ontogenetic development; programming hydrolytic.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	2
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	2
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	2
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	3
<b>3.1</b>	<b>Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona</b> .....	3
<b>3.1.1</b>	<b>Componentes do SRA do cérebro durante o desenvolvimento fetal</b> .....	4
<b>A</b>	<b>Angiotensinogênio</b> .....	4
<b>B</b>	<b>Angiotensina</b> .....	4
<b>C</b>	<b>Renina</b> .....	4
<b>D</b>	<b>Enzima conversora de angiotensina</b> .....	4
<b>E</b>	<b>Outras enzimas para formar ANG II</b> .....	7
<b>F</b>	<b>ANG II: subtipos de receptores de ANG II</b> .....	7
<b>F.1</b>	<b>Conceito de desenvolvimento AT<sub>1</sub>R e AT<sub>2</sub>R</b> .....	7
<b>F.2</b>	<b>Ontogenia e localização do AT<sub>1</sub>R e AT<sub>2</sub>R no SNC do feto</b> .....	7
<b>3.1.2</b>	<b>Estratégias terapêuticas para a regulação do SRA</b> .....	8
<b>A</b>	<b>Bloqueio do SRA pelos inibidores da ECA</b> .....	8
<b>B</b>	<b>Bloqueio do SRA pelos bloqueadores dos receptores de ANG II</b> .....	10
<b>C</b>	<b>Bloqueio do SRA pelos betabloqueadores</b> .....	10
<b>D</b>	<b>Diuréticos da alça</b> .....	111
<b>3.2</b>	<b>Sistema Peptídeo Natriurético</b> .....	11
<b>3.3</b>	<b>Regulação Hidroeletrólítica</b> .....	12
<b>3.4</b>	<b>Regulação do Apetite por Sódio</b> .....	14

3.5	<b>Estresse e Hipertensão Programada</b> .....	14
3.6	<b>Protocolos Experimentais</b> .....	16
4	<b>MATERIAL E MÉTODO</b> .....	17
4.1	<b>Animais</b> .....	17
4.2	<b>Drogas</b> .....	17
4.3	<b>Desmame</b> .....	17
4.4	<b>Fase Adulta</b> .....	17
4.5	<b>Tratamento</b> .....	17
4.6	<b>Avaliações</b> .....	18
4.7	<b>Procedimentos Experimentais</b> .....	18
4.7.1	Avaliações neonatais .....	18
	A Ingestão de leite .....	18
4.7.2	Avaliações basais .....	19
	A Experimentos envolvendo o comportamento ingestivo: ingestões basais .....	19
	A.1 Ingestão de alimentos .....	19
	A.2 Ingestão de água e salina .....	19
4.7.3	Avaliações sob estímulos .....	19
	A Experimentos envolvendo o comportamento ingestivo: ingestões sob jejum .....	19
	A.1 Privação hídrica .....	19
	A.2 Ingestão de salina .....	19
4.7.4	Experimentos envolvendo o comportamento ingestivo: ingestões sob estímulos específicos sobre a indução do apetite por sódio e da sede.....	20
	A Indução da sede .....	20

	<b>B</b>	Depleção de sódio e privação hidrossalina .....	20
	<b>4.7.5</b>	Avaliação do volume de urina .....	20
	<b>4.8</b>	<b>Análise estatística</b> .....	20
<b>5</b>		<b>RESULTADOS</b> .....	21
	<b>5.1</b>	<b>Avaliação do Peso Corporal e da Ingestão de Leite</b> .....	21
	<b>5.1.1</b>	Avaliação da ingestão de leite no 4° dia de lactação .....	21
	<b>5.1.2</b>	Avaliação da ingestão de leite no 8° dia de lactação .....	21
	<b>5.1.3</b>	Avaliação da ingestão de leite no 12° dia de lactação .....	22
	<b>5.2</b>	<b>Avaliações Basais</b> .....	23
	<b>5.2.1</b>	Avaliação da ingestão basal de água durante a vida adulta .....	23
	<b>5.2.2</b>	Avaliação da ingestão basal de NaCl (0,3M) durante a vida adulta .....	24
	<b>5.2.3</b>	Avaliação da ingestão basal de alimento .....	25
	<b>5.2.4</b>	Avaliação do volume de urina basal .....	26
	<b>5.3</b>	<b>Avaliações sob Estímulos</b> .....	27
	<b>5.3.1</b>	Avaliação da privação hídrica durante a vida adulta .....	27
	<b>5.3.2</b>	Avaliação da privação de nacl (0,3m) durante a vida adulta .....	28
	<b>5.3.3</b>	Avaliação do volume de urina (privação) .....	29
	<b>5.3.4</b>	Avaliação da ingestão de água em animais depletados de na durante a vida adulta .....	30
	<b>5.3.5</b>	Avaliação da ingestão de salina em animais depletados de na durante a vida adulta .....	31
	<b>5.3.6</b>	Avaliação do volume de urina (depleção) .....	32
	<b>5.4</b>	<b>Avaliação da Taxa de Mortalidade Durante o Tratamento com Captopril, Losartan, Isoproterenol e Furosemida</b> .....	33
<b>6</b>		<b>DISCUSSÃO</b> .....	34

<b>6.1</b>	<b>Efeito da Administração das Drogas</b> .....	34
6.1.1	Efeito da administração crônica de salina sobre a ingestão de leite em filhotes .....	34
6.1.2	Efeito da administração crônica de captopril sobre a ingestão de leite em filhotes .....	35
6.1.3	Efeito da administração crônica de isoproterenol sobre a ingestão de leite em filhotes .....	36
6.1.4	Efeito da administração crônica de furosemida sobre a ingestão de leite em filhotes .....	36
6.1.5	Efeito da administração crônica de losartan sobre a ingestão de leite em filhotes .....	36
<b>6.2</b>	<b>Avaliações Basais</b> .....	36
6.2.1	Avaliação da ingestão basal de água durante a vida adulta .....	36
6.2.2	Avaliação da ingestão basal de nacl (0,3M) durante a vida adulta .....	37
6.2.3	Avaliação da ingestão basal de alimento .....	38
6.2.4	Avaliação do volum de urina (basal) .....	38
<b>6.3</b>	<b>Avaliações sob Estímulos</b> .....	39
6.3.1	Avaliação da privação hídrica durante a vida adulta .....	39
6.3.2	Avaliação da privação de sódio durante a vida adulta .....	40
6.3.3	Avaliação da quantidade de urina (privação) .....	40
6.3.4	Avaliação da ingestão de água em animais depletados de sódio .....	41
6.3.5	Avaliação da ingestão de salina em animais depletados de sódio .....	41
6.3.6	Avaliação do volume de urina (depleção) .....	42
<b>6.4</b>	<b>Avaliação da Taxa de Mortalidade Durante o Tratamento com Captopril, Furosemida, Losartan e Isoproterenol</b> .....	43

<b>7 CONCLUSÃO .....</b>	<b>44</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>45</b>

# 1 INTRODUÇÃO

Estudos nas últimas décadas têm mostrado que o sistema renina-angiotensina (SRA) central desempenha um papel importante no controle das respostas cardiovasculares fetais, no equilíbrio de fluidos do corpo e na regulação neuroendócrina. As respostas comportamentais e endócrinas mediadas pelo SRA do cérebro são importantes na regulação do equilíbrio corporal de líquidos, incluindo a ingestão de água e sal, a excreção e reabsorção renal (MAO *et al.*, 2008).

A inibição do SRA pelos inibidores da enzima conversora da angiotensina (ECA) ou outros bloqueadores pode produzir específicas anormalidades no desenvolvimento dos tecidos e órgãos (WOLF, 2002). Inibidores da ECA têm sido amplamente empregados no tratamento de doenças cardiovasculares e são uma ferramenta útil na investigação do SRA (FERREIRA, 2000). No entanto, a sua utilização durante a gravidez é contra-indicada, pois está associada com um risco aumentado de fetopatias, incluindo malformações do sistema cardiovascular, renal e nervoso central (COOPER *et al.*, 2006). Muitos estudos têm mostrado que o SRA permanece por longos períodos em diferentes fases do desenvolvimento embrionário (SAAVEDRA, 1999).

Compreender esse aspecto da fisiologia do desenvolvimento também é importante para a compreensão de anormalidades que possam ocorrer. Alterações durante o desenvolvimento do SRA do cérebro do feto podem resultar em problemas que afetam tanto a fase de pré-natal como também a saúde e o bem-estar pós-natal (MAO *et al.*, 2008). Sabendo-se que os componentes do SRA aparecem no início do desenvolvimento e tem uma associação com o crescimento celular, é possível que irregularidades ocorridas durante a neurogênese possam contribuir para anomalias do desenvolvimento, bem como doenças subsequentes, tais como hipertensão (COOK *et al.*, 1993).

O SRA tem sido implicado com a organização ontogênica de sistemas neurais relacionados com o comportamento afetivo. Entretanto, não são conhecidas evidências do envolvimento do SRA na ontogênese de sistemas que controlam o equilíbrio hidroeletrólítico, especialmente os comportamentos homeostáticos relacionados com a regulação da tonicidade e do volume dos líquidos corpóreos. Observa-se, portanto, a importância de investigar o efeito do tratamento com drogas que influenciam a atividade do SRA durante a gestação e lactação de ratas e suas repercussões na resposta natriorexigênica da prole na vida adulta.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Este trabalho teve como objetivo avaliar indiretamente a influência do uso de substâncias que afetam a atividade do sistema renina-angiotensina durante o período neonatal, sobre o desenvolvimento ontogênico de sistemas cerebrais, correlacionando suas repercussões com a homeostase do equilíbrio hidroeletrólítico e hormonal e alterações estruturais na educação da prole adulta.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar indiretamente o equilíbrio hidroeletrólítico dos ratos adultos por meio de mensurações basais e sob estimulação (privação hídrica, privação de salina, depleção de sódio), correlacionando-o com a influência da alteração neonatal do SRA;
- Avaliar a expressão de comportamentos motivados (ingestão de ração e fluidos) em condições basais, sob jejum e sob estímulos específicos, relacionando a influência da alteração neonatal do SRA com o apetite e saciedade sob diferentes circunstâncias;
- Avaliar a ingestão neonatal de leite durante o tratamento com captopril, furosemida e isoproterenol, correlacionando o uso de substâncias que atuam nos vários estágios da cascata do SRA bem como sobre o bloqueio da liberação de ANG II, durante o período neonatal com o apetite e a saciedade do neonato;
- Avaliar a ingestão de alimento em condições basais durante a vida adulta, relacionando o efeito das drogas utilizadas sobre o SRA durante o período neonatal com os sistemas fisiológicos reguladores do metabolismo energético e de ingestão alimentar
- Avaliar a taxa de mortalidade durante o tratamento com o captopril, losartan, furosemida e isoproterenol;
- Avaliar o volume de urina em condições basais, sob jejum e sob estímulos específicos, correlacionando com o efeito das drogas utilizadas sobre o SRA.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA (SRAA)

O sistema renina-angiotensina (SRA), também identificado como sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um conjunto de peptídeos, esteróides, enzimas e receptores envolvidos em especial no controle do volume de líquido extracelular e na pressão arterial. É descrito como um eixo endócrino no qual cada componente de uma cascata é produzido por diferentes órgãos, um arranjo que é exemplo de interação de vários sistemas orgânicos, interrelacionados para manter a estabilidade hemodinâmica. O SRAA soma-se ao sistema simpático e ao hormônio antidiurético (ADH), compondo o trio de sistemas neuro-hormonais de compensação cardiovascular. Abaixo segue uma figura esquemática do sistema (figura 01).

São identificados dois diferentes tipos de SRA: o circulante e o local, que parece desempenhar papel crucial na manutenção da homeostase circulatória. Segundo citado por RAPOSO-COSTA & REIS (2000), vários órgãos, entre eles os ovários, contêm SRA locais.

No SRA circulante, o angiotensinogênio é produzido pelo fígado, que requer glicocorticóides do córtex adrenal e estrógeno das gônadas; e a renina é liberada pelos rins, enquanto que a enzima de conversora de angiotensina I em angiotensina II (ECA) é encontrada no endotélio vascular de vários órgãos. A aldosterona é liberada pelo córtex supra-renal estimulado pela ANG II. Uma vez ativada a cascata, surgem a ANG I e a ANG II que circulam pelo sangue ativando suas estruturas-alvo: vasos sanguíneos (sobretudo arteríolas e veias sistêmicas), rins, coração, supra-renais e o sistema nervoso simpático. A ANG II, o peptídeo mais ativo do SRA, liga-se aos receptores tipo 1 (AT<sub>1</sub>R) e tipo 2 (AT<sub>2</sub>R), e qualquer alteração nesse processo leva à alterações das suas funções fisiológicas (FITZSIMONS, 1998; PAUL *et al.*, 2006).

Segundo RAPOSO-COSTA & REIS (2000), outros peptídeos têm sido recentemente adicionados a esta conhecida cascata de eventos, tais como: Angiotensina-III, Angiotensina-IV e, mais recentemente, a Angiotensina-(1-7), gerada a partir de ANG I ou ANG II por endopeptidases teciduais (ver Figura 01). A Ang-(1-7) foi identificada no plasma e em tecidos humanos e animais. Sua produção independente da ECA já foi demonstrada e sua ligação a um receptor específico foi descrita .

O SRA tem importante atuação na regulação da pressão arterial, equilíbrio hidroeletrólítico, estruturação e função cardiovascular (JOHNSTON, 1992). O eixo renina-angiotensina-aldosterona está relacionado a inúmeras áreas da síndrome hipertensiva, tanto em sua origem como em sua progressão. A ativação excessiva do SRAA tem sido reconhecida como elemento de importância na progressão de lesões de órgãos-alvo como hipertrofia ventricular esquerda, insuficiência cardíaca congestiva, hipertrofia vascular, remodelação ventricular pós-infarto do miocárdio e alterações renais (CHENG, 1998).

As ações do SRA são mediadas principalmente pela ANG II, um potente peptídeo biológico que está relacionado com a etiologia da hipertensão e várias outras formas de doenças cardiovasculares e renais (FABIANI, 1999). Sua atuação na homeostase cardiovascular é incontestável, talvez mais como fator de crescimento que como hormônio vasopressor (RIBEIRO, 2000). Além de sua formação plasmática, a ANG II pode ser formada localmente nos rins, nos vasos, no coração, no cérebro, proporcionando sua função autócrina, parácrina e intrácrina. A presença de todos os componentes que participam da cascata biológica (renina, angiotensinogênio, ECA e receptores de angiotensina suporta a

possibilidade do SRA local, complementando o SRA plasmático (DZAU, 1988; JOHNSTON, 1992).

Estudos nas últimas décadas têm mostrado que o SRA central desempenha um papel importante no controle das respostas de doenças cardiovasculares fetais, no equilíbrio de fluidos do corpo e na regulação neuroendócrina. Dado que o SRA central e seus receptores no cérebro são de igual importância para o SRA periférico no controle da pressão arterial, presume-se que os estudos sobre o desenvolvimento do SRA cérebro-fetal, nos padrões normais e anormais, devem lançar luz sobre mecanismos de programação de doenças cardiovasculares, de origem fetal, em adultos (MAO et al., 2008).

Além de sua clássica função na regulação da pressão do sangue e homeostase dos fluidos do corpo, angiotensina no cérebro tem funções mais sutis que envolvem mecanismos complexos, tais como memória e aprendizagem.

Pesquisadores descobriram que a maioria dos efeitos comportamentais de ANG II estão ligados a AT<sub>1</sub>R. O efeito neuronal de ANG II no núcleo olivar inferior, especificamente por antagonistas AT<sub>2</sub>R, sugere um envolvimento no controle do SRA neuronal (MOSIMANN et al., 1996). A deleção do gene AT<sub>2</sub>R atenuou comportamento exploratório e baixou a temperatura corporal, sugerindo que AT<sub>2</sub>R regula as funções do cérebro no controle da temperatura (ICHIKI *et al.*, 1995).

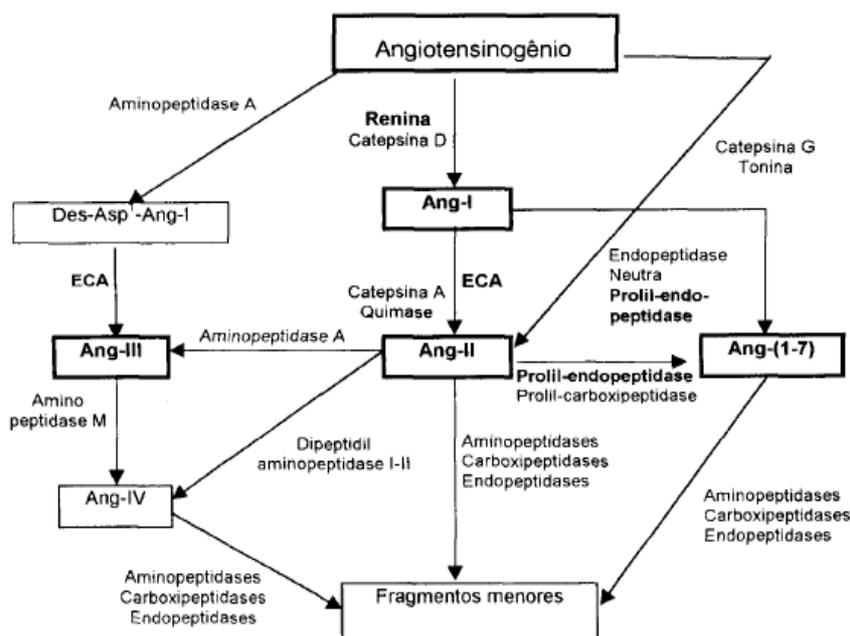


Figura 01: Esquema geral do SRA . RAPOSO-COSTA & REIS (2000)

### 3.1.1 COMPONENTES DO SRA DO CÉREBRO DURANTE O DESENVOLVIMENTO FETAL

#### A. ANGIOTENSINOGENO

O angiotensinogênio é uma proteína produzida pelo fígado, derivada principalmente da zona pericentral dos lóbulos hepáticos. Ele pode ser visualizado na Figura 02, no esquema

do SRA. Tem sido amplamente estudado em adultos e fetos. No cérebro adulto a sequência de angiotensinogênio é idêntica à que ocorre no fígado (CAMPBELL *et al.*, 1984) e ambos RNAm e proteína do angiotensinogênio foram detectados no cérebro fetal (CAMPBELL *et al.*, 1984; DESCHEPPER *et al.*, 1986; OHKUBO *et al.*, 1986; IMBODEN *et al.*, 1987; LYNCH *et al.*, 1987, THOMAS e SERNIA, 1988). A imunorreatividade detectou o angiotensinogênio estando presente no dia 19 dia de gestação (DG) em ratos (SOOD *et al.*, 1987a, b)..

Ratos com o gene do angiotensinogênio humano (HAGT) foram utilizados para determinar o desenvolvimento da regulação da expressão HAGT (YANG e SIGMUND, 1998). Expressão do gene HAGT no rato foi detectada inicialmente no embrião no 8,5° DG e era abundante após o 9,5° DG. A análise Northern blot revelou níveis moderados do RNAm do gene HAGT no cérebro fetal. Hibridização *in situ* realizada sobre secções de tecido revelou que RNAm do gene HAGT estava amplamente distribuído no cérebro fetal no 13,5° DG (YANG e SIGMUND, 1998). Além disso, o RNAm do angiotensinogênio no rato foi visto no cérebro no 15° DG, e seus níveis eram cerca de 10 vezes menores do que os dos dias 17-19° DG (LEE *et al.*, 1987; KALINYAK *et al.*, 1991; YANG e SIGMUND, 1998). De 15 a 20° DG, o RNAm do angiotensinogênio foi mais abundante no cérebro do que no fígado nos fetos de ratos. Logo após o nascimento, o nível no cérebro era de três vezes acima dos níveis fetais e estava aumentado no fígado 30 vezes, doze horas após o nascimento (KALINYAK *et al.*, 1991). Assim, a diferença temporal e as diferenças entre níveis centrais e periféricos do RNAm do angiotensinogênio sugerem intrínsecas funções do angiotensinogênio do cérebro durante a vida fetal, o que é susceptível de contribuir para a diferenciação e/ou a proliferação no SNC.

A localização imunocitoquímica de angiotensinogênio cerebral no plexo coróide e células endodimais forrando o terceiro ventrículo tem sido observado em ratos no 18° DG . Esta primeira expressão do angiotensinogênio foi seguida por uma rápida progressão da coloração, aparecendo em astrócitos no núcleo paraventricular (PVN), área preóptica, núcleo ventromedial e arqueado hipotalâmico (SERNIA *et al.*, 1997). Em geral, a coloração neuroglial foi maior nas regiões próximas aos ventrículos cerebrais e aqueduto cerebral. Ainda segundo estes autores, a expressão do angiotensinogênio cerebral é regulado, em parte, por glicocorticóides (SERNIA *et al.*, 1997).

O tempo do aparecimento e desenvolvimento do angiotensinogênio do cérebro apoia a concepção de criação de um SRA central na gestação tardia. A sua predominância no feto nos núcleos hipotalâmicos e talâmicos, cerebelo e neurônios corticais, sugere importante papel na maturação cerebral, dos fluidos e dos balanços eletrólitos pré-natal, e no desenvolvimento sensorio (MUNGALL *et al.*, 1995).

## **B. ANGIOTENSINA**

As angiotensinas são peptídeos do SRA, sendo que a ANG II é proveniente da atuação da ECA sobre a ANG I e possui múltiplas ações no organismo. Elas podem ser visualizadas na Figura 02. Os efeitos resultantes de tais ações englobam alterações de caráter sistêmico e central, tais como: aumento do volume do LEC e do débito cardíaco através da retenção de sódio e água no organismo que se dá por ação direta no epitélio tubular proximal, levando ao aumento da reabsorção de sódio neste segmento; e pelo efeito indireto, por meio da ação da aldosterona, com conseqüente aumento da reabsorção de sódio no túbulo distal e ducto coletor.

Outros efeitos são: aumento da resistência periférica total, devido à ação vasoconstritora e à ação sobre o tônus simpático e vagal e à sensibilidade barorreceptora,

assim como o aumento da ingestão de água e sódio e retenção renal de água, por meio do estímulo da sede (efeito dipsogênico); da liberação do hormônio antidiurético, induzindo a retenção de água e do apetite ao sódio.

### **C. RENINA**

A renina é uma enzima glicoproteolítica sintetizada no rim, mas também encontrada em outros tecidos como cérebro, vasos sanguíneos do trato genital e suprarenais (KOSTIS, 1998).

O RNAm de renina e os seus componentes têm sido investigados no cérebro de ratos adultos (HIROSE *et al.*, 1980; SPECK *et al.*, 1981; SCHELLING *et al.*, 1982; DZAU *et al.*, 1986; HERMANN *et al.*, 1987; SAAVEDRA, 1992; VILA-PORCILE & CORVOL, 1998; PAUL *et al.*, 2006). No entanto, a informação sobre a renina no cérebro fetal é limitado. Dado que os outros componentes importantes do SRA, como angiotensinogênio, os receptores AT<sub>1</sub>R e AT<sub>2</sub>R foram encontrados no cérebro fetal do rato no 19º DG, é provável que a ontogênese de renina no cérebro fetal também aconteça em uma fase de desenvolvimento anterior ao nascimento. SOOD e colegas de trabalho identificaram a atividade de renina acompanhada com angiotensinogênio, ECA e ANG II no cérebro fetal de rato no dia 19ºDG utilizando métodos imunquímicos (SOOD *et al.*, 1987a, b, 1989, 1990), embora a isoforma da renina do cérebro fosse diferente da presente na circulação periférica (LAVOIE *et al.* 2004).

### **D. ENZIMA CONVERSORA ANGIOTENSINA (ECA)**

A ECA, enzima encontrada no endotélio vascular de vários órgãos, atua na conversão de ANG I em ANG II. A atividade da ECA, embora predominantemente encontrada no endotélio dos vasos dos pulmões, ocorre também no endotélio de outros leitos vasculares e em outros tecidos, incluindo o coração e as artérias coronárias. A ANG II promove liberação de aldosterona pela suprarenal, que está relacionada com o aumento da pressão arterial, a hipertrofia cardíaca, a fibrose cardíaca/vascular e com as arritmias ventriculares.

Os bloqueadores dos receptores da ANG II são fármacos que atuam nos receptores AT<sub>1</sub>, responsáveis por algumas ações conhecidas da ANG II, incluindo vasoconstrição, liberação de aldosterona e efeitos no miocárdio e na vasculatura (RIBEIRO, 2000).

A imunorreatividade para a ECA foi mostrada no cérebro fetal humano (STRITTMATTER *et al.*, 1986; SCHUTZ *et al.*, 1996), e ambos RNAm e proteína da ECA foram detectados no plexo coróide e outras regiões cerebrais (MENDELSON *et al.*, 1984; STRITTMATTER *et al.*, 1984; CHAI *et al.*, 1987; WHITING *et al.*, 1991; ROGERSON *et al.*, 1995; BALATU *et al.*, 1998) em fetos de ratos e coelhos. No cérebro fetal de ratos, no 19º DG, a ECA foi detectada no plexo coróide, órgão subfornical (SFO) e hipófise posterior, mas não em estruturas extrapiramidais e na hipófise anterior (STRITTMATTER *et al.*, 1986; TSUTSUMI *et al.* 1993). Após o nascimento, a ECA foi identificada no caudado-putamen (STRITTMATTER *et al.*, 1986).

Recentes estudos têm demonstrado que ANG I exógena aplicada no ventrículo lateral de fetos de ovinos, em dois terços da gestação, pode induzir ações fisiológicas de ANG II, tais como: aumento da pressão arterial e liberação do neuropeptídeo da vasopressina, sugerindo a existência e as funções da ECA no cérebro fetal (McCKINLEY & JOHNSON, 2004).

## **E. OUTRAS ENZIMAS PARA FORMAR ANG II**

Foram descritas outras vias para formação de ANG II não dependentes da ECA ou renina, incluindo quimases, catepsina G, ativador de plasminogênio tecidual (TPA) e tonina (URATA *et al.*, 1996). Elas podem ser visualizadas na figura 02. Não há conhecimento sobre a ontogênese e funções destas enzimas relacionadas com o SRA central, durante o início do período de desenvolvimento do cérebro fetal, e sobre as consequências funcionais de alterações sobre essas vias alternativas de formação da ANG II, mas parece haver implicações fisiopatológicas, principalmente em condições como insuficiência cardíaca.

Vários estudos têm demonstrado que as enzimas como tonina, quimase e catepsina G também podem estar envolvidas na formação de ANG II no cérebro em adultos (DZAU *et al.*, 1982; KLINKSTEIN *et al.*, 1982; BALTATU *et al.*, 1997; SUMITANI *et al.*, 1997).

## **F. ANGIOTENSINA II: SUBTIPOS DOS RECEPTORES DE ANG II**

### **F.1 DESENVOLVIMENTO DO AT<sub>1</sub>R E AT<sub>2</sub>R**

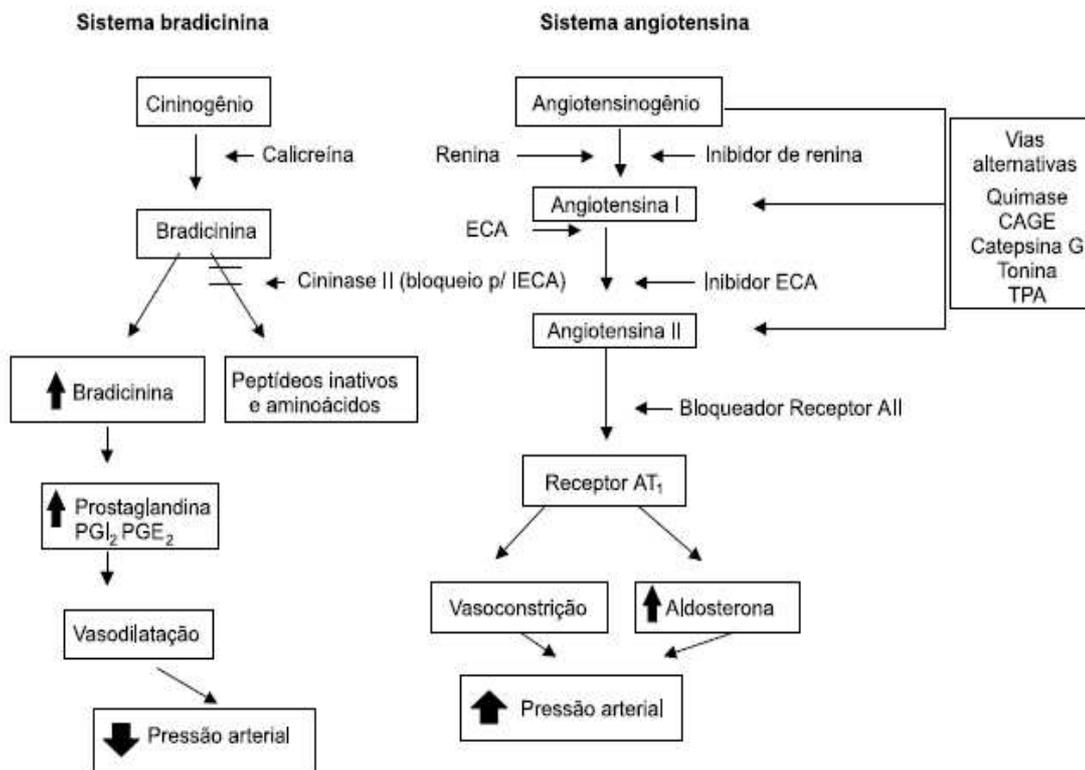
Em adultos, receptores de ANG II no cérebro têm sido extensivamente estudados, e o AT<sub>1</sub>R no SRA central desempenha um papel fundamental na regulação de respostas cardiovasculares, de sódio e de balanço hídrico, e elaboração de hormônios da hipófise. O AT<sub>2</sub>R é expresso durante o desenvolvimento fetal (SAAVEDRA, 1992; FITZSIMONS, 1998; PAUL *et al.*, 2006). Foi evidenciado, por análise quantitativa autoradiográfica, que tanto receptores AT<sub>1</sub>R e AT<sub>2</sub>R centrais estavam localizados no encéfalo fetal no 18° DG em ratos (TSUTSUMI *et al.*, 1991a, b). No cérebro fetal no rato, no 11° DG, NUYT e colegas utilizaram sondas, radiomarcadas para hibridização *in situ*, para determinar a evolução do RNAm dos dois subtipos: AT<sub>1</sub>R (AT<sub>1a</sub>R e AT<sub>1b</sub>R) e AT<sub>2</sub>R (NUYT *et al.*, 1999; 2001). Esses pesquisadores mostraram que a primeira aparição de RNAm do receptor AT<sub>1a</sub>R foi pelo 19° DG, em muitas áreas cerebrais, e que o RNAm do receptor AT<sub>2</sub>R apareceu no 13° DG no hipotálamo lateral e 15° DG em outras áreas cerebrais (NUYT *et al.*, 1999, 2001).

Culturas primárias de astrócitos obtidos de diferentes regiões cerebrais, em ratos no 17° DG e 1° dia pós-natal, expressaram receptor de ANG II pertencente ao subtipo AT<sub>1</sub>R (BOTTARI *et al.*, 1992). Nos ratos, na região pituitária anterior no 19° DG também foi verificada a presença de AT<sub>1</sub>R (TSUTSUMI *et al.*, 1993). Estes dados são de interesse, porque sugeriu-se que o subtipo AT<sub>1</sub>R era predominante em adultos, enquanto AT<sub>2</sub>R predominante em fetos. No entanto, este conceito deve ser tratado com cautela. A idéia predominante de receptores AT<sub>1</sub>R ou AT<sub>2</sub>R antes ou depois do nascimento pode ser correta apenas em parte. Para certas células, tecidos, ou órgãos isto ocorre de forma diferente. (BOTTARI *et al.*, 1992; TSUTSUMI *et al.*, 1991a, b; XU *et al.*, 2004).

### **F.2 ONTOGENIA E LOCALIZAÇÃO DO AT<sub>1</sub>R E AT<sub>2</sub>R NO SNC DO FETO**

Por meio da técnica de hibridização local foi demonstrado o desenvolvimento ontogênico de RNAm dos receptores AT<sub>2</sub>R no cérebro fetal e neonatal no rato. Por exemplo, o RNAm de AT<sub>2</sub>R foi detectado no cérebro no 13° DG no neuroepitélio lateral hipotalâmico, no 15° DG nos núcleos subtalâmico e hipoglossos; no 17° DG no núcleo motor facial, núcleo

pedunculopontíneo, cerebelo, e complexo olivar inferior; no 19° DG no tálamo, núcleo intersticial (TSUTSUMI *et al.*, 1993).



**Figura 02:** Esquema geral do SRAA e locais de ação dos vários agentes farmacológicos. RIBEIRO & FLORÊNCIO (2000).

### 3.1.2 ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS PARA A REGULAÇÃO DO SRA

#### A. BLOQUEIO DO SRA PELOS INIBIDORES DA ENZIMA DE CONVERSÃO DE ANGIOTENSINA (ECA)

O SRA pode ser bloqueado em diferentes locais e por mecanismos diversos. Os agentes que inibem a ECA interferem na conversão da ANG I em ANG II, esta considerada um dos mais importantes hormônios sistêmicos, entre os quais incluem noradrenalina, vasopressina e endotelina. Os inibidores da ECA são tão efetivos quanto outras classes de anti-hipertensivos. Vários fatores podem interferir na resposta à terapia anti-hipertensiva, entre estes, dados demográficos como idade e raça.

Os pacientes da raça negra, por exemplo, geralmente respondem menos aos inibidores da ECA que pacientes hipertensos da raça branca (WEIR *et al.*, 1995). Os inibidores da ECA são efetivos na redução da pressão arterial em uma grande população de pacientes hipertensos. Quando associados a um diurético, os inibidores da ECA aumentam sua eficácia, provavelmente mais que qualquer outra associação. A diferença de resposta terapêutica em

hipertensos idosos e de raça negra fica abolida quando é feita associação de inibidores da ECA com diuréticos (RIBEIRO, 2000).

Os inibidores da ECA atuam causando vasodilatação mista, impedindo a conversão de ANG I em ANG II, sendo esta última um potente vasoconstritor. A redução nos níveis plasmáticos de ANG II resulta na diminuição da vasoconstrição, assim como na diminuição da atividade do Sistema Nervoso Simpático (SNS). Além disso, a inibição da ECA reduz a síntese e secreção do hormônio aldosterona, levando à menor retenção de sódio e água e também controla a degradação da bradicinina e de outros peptídeos vasoativos.

Embora os inibidores da ECA diminuam a produção de ANG II, esta pode ser formada por vias alternativas não dependentes da ECA. Essas vias de formação de ANG II pela quimase e outras proteases formam ANG II no miocárdio e no tecido vascular (URATA *et al.*, 1996). Os níveis de ANG II aumentam gradualmente, apesar da manutenção da inibição da ECA (MOOSER *et al.*, 1990). Pelo fato de os inibidores da ECA reduzirem apenas transitoriamente os níveis de ANG II, outros mecanismos de redução de pressão arterial devem ser considerados. Parece existir participação da bradicinina e de outros compostos vasodilatadores influenciando esse processo (GAINER *et al.*, 1998).

O captopril foi o primeiro inibidor da ECA oralmente ativo, tem início de ação rápida e curta ação. Outros compostos com ação mais prolongada, como o enalapril, sofrem transformação metabólica no fígado e na parede intestinal, como os demais inibidores da ECA, exceto o captopril e o lisinopril. Os efeitos na redução da pressão arterial são semelhantes entre os vários inibidores da ECA, embora possa haver diferenciação na absorção, meia-vida e na ligação a proteínas (SICA, 1999). A eliminação se dá quase exclusivamente por via renal.

Comparado com outros inibidores da ECA, o captopril pode ter menos efeitos negativos sobre a qualidade de vida. Além disso, quando ingerido por via oral é rapidamente absorvido, atinge pico de concentração plasmática rapidamente e tem uma alta biodisponibilidade, que pode ser importante para os pacientes com injúrias cardiovasculares.

Outras drogas como o enalapril têm sido estudadas em medicina e estão aprovadas para o uso em humanos e animais. Dentre os efeitos benéficos dessas drogas podemos citar: diminuição da pressão capilar pulmonar, melhora do estado geral e aumento no tempo de sobrevivência dos animais tratados (KALKMAN *et al.*, 1999). Estudos em gatos sugerem que os inibidores da ECA são efetivos no controle da ICC associada à hipertrofia e outras formas de cardiomiopatia, notando, em alguns desses animais, uma significativa regressão da hipertrofia concêntrica do ventrículo esquerdo (VE). Independente da causa da insuficiência cardíaca, o tratamento com os inibidores da ECA é iniciado precocemente, não havendo indicação exata de quando se deve instituir a terapia. Há evidências de que a terapia com inibidores da ECA em dobermans e pinchers retarda o surgimento da ICC sintomática (TILLEY & GOODWIN, 2002).

Outra propriedade dos inibidores da ECA se refere à lipossolubilidade. Compostos como o quinapril e o ramipril, altamente lipofílicos, ligam-se à ECA tissular por período de tempo mais prolongado, e tem sido atribuído a essa característica efeito favorável no controle da pressão arterial e/ou proteção de órgãos-alvo. Entretanto, existem poucos estudos comparando esses dados (LEONETTI, 1995).

Inibidores da enzima têm sido amplamente utilizados no tratamento de doenças cardiovasculares e são uma ferramenta útil para investigar o SRA. No entanto, o uso desses inibidores durante a gravidez é contra-indicado devido à sua associação com um risco aumentado de fetopatias, como malformações cardiovasculares, renais e do SNC (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 1970). Além disso, muitos estudos têm mostrado que o SRA tem efeitos duradouros sobre diferentes fases do desenvolvimento embrionário (NICOLAÏDIS *et al.*, 1990; PAXINOS e WATSON, 1986; MECAWI *et al.*, 2008). Portanto,

é provável que o uso de substâncias que alteram este sistema afetará o desenvolvimento do feto.

Tendo em mente esses estudos anteriores, existe a hipótese de que o SRA do cérebro poderia ser influenciado pela inibição crônica pré-natal e neonatal da ECA e que este seria o impacto da inibição do substrato neural de ratos adultos (MECAWI *et al.*, 2008). Estudos para testar essa hipótese são viáveis, porque os inibidores da ECA podem permear a barreira fetoplacentária e podem ser liberados no leite (MOE *et al.*, 1984; FITZMONS, 1998).

## **B. BLOQUEIO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA PELOS ANTAGONISTAS DOS RECEPTORES DE ANGIOTENSINA II**

Os antagonistas dos receptores de ANG II são uma classe de anti-hipertensivos que bloqueiam a ação desse peptídeo. Sabe-se que a ANG II liga-se a dois subtipos de receptores, AT<sub>1</sub> e o AT<sub>2</sub>, e maioria das funções conhecidas da ANG II se dão pela ligação com os receptores AT<sub>1</sub>. As funções dos receptores AT<sub>2</sub> não estão bem definidas. Esses receptores podem inclusive não existir em adultos saudáveis. Desempenham papel de importância no feto e em adultos, em resposta à injúria. É provável que danos desencadeados por condições como hipertensão arterial, insuficiência cardíaca, re-estenose pós-angioplastia possam ser suficientemente capazes de expressar esses receptores e torná-los clinicamente relevantes (WEBER, 1999).

Os antagonistas dos receptores da ANG II têm como mecanismo de ação o bloqueio das ações da ANG II pela ocupação específica do receptor AT<sub>1</sub>, exercendo, conseqüentemente, ação anti-hipertensiva e protetora para os diferentes órgãos-alvos da hipertensão arterial. Fazem parte dessa classe o losartan, o valsartan, o irbesartan, o candesartan e o telmisartan. Teoricamente, os bloqueadores dos receptores AT<sub>1</sub> da ANG II promovem um bloqueio mais “seguro” e mais específico do SRA que os inibidores da ECA.

Os BRA II, como são chamados, podem atuar de modo duplo, ou seja, bloqueando as ações da ANG II pelo antagonismo dos receptores AT<sub>1</sub> e estimulando os receptores AT<sub>2</sub> por meio de elevados níveis de ANG II circulante. Dados de pesquisas demonstraram que células dos rins e do miocárdio têm habilidade de reter moléculas de ANG II (ZOU *et al.*, 1998; KATS *et al.*, 1998). A angiotensina é provavelmente seqüestrada e pode então exercer tardiamente ação funcional e estrutural nos tecidos. A recaptação da ANG II ocorre nos receptores AT<sub>1</sub>, indicando que o bloqueio seletivo dos receptores de ANG II pode ser efetivo na prevenção dessa ação (RIBEIRO, 2000). O maior objetivo do uso dos BRA II é sua terapia anti-hipertensiva segura, podendo sua eficácia ser potencializada pela associação com o uso de diuréticos. A combinação desses dois medicamentos permite atenuar os efeitos adversos dos diuréticos.

## **C. BLOQUEIO DO SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA-ALDOSTERONA PELOS BETABLOQUEADORES**

Os betabloqueadores são medicamentos simpaticomiméticos que atuam ao nível dos receptores beta adrenérgicos. São usados também para o tratamento da asma, relaxando as vias aéreas e permitindo um fluxo maior de ar. O seu uso primário ocorre nos bloqueios cardíacos ou nas bradicardias, ativando os receptores B<sub>1</sub> cardíacos, tem efeitos cronotrópico, inotrópico e dromotrópico positivos. Sua ação anti-hipertensiva se faz pela diminuição inicial do débito cardíaco, redução na secreção de renina, readaptação dos barorreceptores e diminuição das catecolaminas nas sinapses nervosas.

Como agente anti-hipertensivo, são drogas bastante eficazes quando usadas como monoterapia de primeira opção em pacientes com hipertensão portadores de doença arterial coronariana ou arritmias cardíacas. Estão indicados também em outras situações clínicas como: insuficiência cardíaca com disfunção diastólica, na prevenção secundária da extensão da área do infarto do miocárdio e no tratamento da enxaqueca e do glaucoma. Podem ser úteis nos tremores da ansiedade aguda, tremor familiar essencial e em pacientes com hipertireoidismo. Hoje existe um grande número de drogas pertencentes a esta família, incluindo os que apresentam atividade alfa-agonista. Os betabloqueadores com antagonismo alfa têm sido indicados no tratamento da insuficiência cardíaca com disfunção sistólica (PLAVNIK & JUNIOR, 2005).

Dentre os betabloqueadores de ação anti-hipertensiva pode-se citar o isoproterenol, cujo efeito sobre o sistema cardiovascular se relaciona com sua ação sobre os receptores  $\beta_1$  e  $\beta_2$  das arteríolas do músculo esquelético produzindo vasodilatação. O isoproterenol possui um efeito inotrópico e cronotrópico positivo sobre o coração, elevando a pressão arterial sistólica, enquanto que seus efeitos vasodilatadores, tendem a produzir uma pressão arterial diastólica baixa.

Os efeitos adversos do isoproterenol se relacionam com seus efeitos cardiovasculares, podendo produzir um aumento da frequência cardíaca (taquicardia), o que predispõe o indivíduo a transtornos do ritmo cardíaco. Portanto, o isoproterenol deve ser evitado por pacientes cardiopatas isquêmicos.

#### **D. DIURÉTICOS DA ALÇA**

Os diuréticos de alça são um grupo de fármacos que atuam no rim, possuem ação natriurética mais potente, mais rápida, porém de duração mais curta em relação aos outros diuréticos. Atuam aumentando o volume e diminuindo a concentração da urina. O mecanismo de ação baseia-se na inibição da reabsorção de cloreto de sódio na porção ascendente da alça de Henle, inibindo o transportador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^{2-}$ , que reabsorve sal e água do filtrado. Inibem ainda a reabsorção de íon magnésio e cálcio. Aumentam muito a diurese, sendo um dos diuréticos mais potentes. Atuam potencializando a ação dos bloqueadores do SRAA.

Dentre os potentes diuréticos da alça pode-se citar a furosemida, cuja principal utilização está na remoção de edema associado a diversas causas como: a insuficiência cardíaca ou doença hepática e renal. Estão indicados em pacientes hipertensos que cursam com insuficiência cardíaca ou insuficiência renal, síndrome nefrótica, e tem indicação de uso nos casos de emergência hipertensiva (PLAVNIK & JUNIOR, 2005).

### **3.2 SISTEMA PEPTÍDEO NATRIURÉTICO**

O sistema peptídeo natriurético (SPN) é constituído de uma série de peptídeos biológicos que estão envolvidos na regulação da pressão arterial e na volemia. Em humanos, consiste no peptídeo natriurético atrial (ANP), no peptídeo natriurético cerebral (CNP) e no peptídeo natriurético tipo C (PNt-C). Os ANP e os CNP são produzidos principalmente no miocárdio em resposta à distensão atrial. O PNt-C é liberado em resposta ao estresse de parede, sendo encontrado no coração, nos rins, nos pulmões e no endotélio (BURNETT, 1999).

Os efeitos biológicos dos peptídeos natriuréticos são mediados por receptores celulares, dos quais três foram identificados: receptores A, receptor B e receptor C. Os ANP e CNP ligam-se ao receptor A, enquanto o PNt-C tem afinidade ao receptor B (MAACK, *et al.*,

1987; WEBER, 1999). As ações fisiológicas dos peptídeos natriuréticos acontecem em vários locais e incluem vasodilatação, natriurese, diurese, redução da liberação de aldosterona, diminuição do crescimento celular, inibição do SRA e do sistema simpático central (LEVIN *et al.*, 1988). Outras ações são atribuídas aos ANP e CNP, como a inibição da endotelina pelo ANP e a inibição do crescimento celular e potente ação vasodilatadora desenvolvida pelo CNP na parede vascular, atuando, pois, de maneira autócrina e parácrina (CHEN *et al.*, 1988).

Existe uma inter-relação entre o SRA e o SPN na regulação das funções renal, vascular, cardíaca, controlada por duas enzimas: a endopeptidase e a ECA que regulam, respectivamente, o SPN e o SRA. Além do ANP, do CNP e do PNT-C, a endopeptidase catalisa o desdobramento de múltiplos hormônios, como a adrenomedulina, a bradicinina e a urodilatina (forma renal do ANP). A ECA, como descrito anteriormente, promove a transformação da ANG I em ANG II. O bloqueio simultâneo da formação de ANG II pela inibição da ECA e a potencialização da atividade do SPN pela inibição da endopeptidase tem mostrado efeito anti-hipertensivo maior que quando cada sistema é inibido isoladamente (RIBEIRO, 2000).

### 3.3 REGULAÇÃO HIDROELETROLÍTICA

O SRA desempenha importante função na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico e o SRA local tem papel crucial na manutenção da homeostase circulatória. A localização do SRA local em todo o cérebro sugeriu uma variedade de funções potenciais. A forte estimulação e função tônica do SRA central, especialmente ANG II central, tem sido intensamente estudado em adultos (FITZSIMONS, 1998). O SRA do cérebro medeia respostas comportamentais e endócrinas, importante na regulação do equilíbrio corporal de líquidos, incluindo água e ingestão de sal, a excreção renal e reabsorção.

Embora vários estudos tenham revelado os papéis do SRA central na regulação dos fluidos corporais em adultos, o desenvolvimento funcional do SRA do cérebro fetal no balanço hídrico do corpo ainda não foi totalmente elucidado. Injeção intracerebroventricular (ICV) crônica de ANG II em fetos de ovinos sondados induziu uma vigorosa deglutição no final da gestação (ROSS *et al.*, 1994, XU *et al.*, 2001; EL-HADDAD *et al.*, 2000, 2001, 2002, 2005). Além disso, a ICV de ANG II que induziu a atividade de deglutição fetal poderia ser bloqueado por um antagonista dos receptores da angiotensina (EL-HADDAD *et al.* 2001, 2005). Isto comprova que o SRA cérebro-fetal está ativo na gestação tardia e parece desempenhar um papel importante no controle de intensa resposta durante o desenvolvimento fetal.

Alguns estudos têm demonstrado o desenvolvimento funcional das áreas centrais em resposta a ANG II. SHI *et al.* (2004) mostraram que os núcleos ativados por ICV de ANG II no cérebro de fetos ovinos incluem: SFO, MnPO, OVLT, PVN do prosencéfalo, o NTS e NPBL no cérebro posterior (SHI *et al.*, 2004a, b; XU *et al.*, 2003, 2004, 2005). Os dados sugerem que todas as áreas do cérebro-fetais foram ativadas para ações de ANG II centrais. Com base nessa evidência, a ICV de ANG II estimulou a atividade de deglutição fetal e foi associada com a ativação dos núcleos do cérebro, incluindo a OFS, OVLT, AP, e NPBL (XU *et al.*, 2001).

Com base nisso, duas conclusões podem ser consideradas. Primeiro, a ANG II do cérebro é importante para o desenvolvimento comportamental do feto na regulação de fluidos do corpo. Em segundo lugar, as vias centrais relacionadas ao SRA cérebro-fetal permanecem relativamente intactas em resposta à estimulação ANG II. Isso é importante para as vias do SRA cerebral em cooperação com SRA periférica. Sob condições fisiológicas normais, ANG II não pode cruzar a barreira hematoencefálica (BBB). A BBB é relativamente impermeável, de baixo peso molecular (STONESTREET *et al.*, 1996). Contudo, em várias regiões centrais,

incluindo a OFS, OVLT, e AP, falta uma BBB. Assim ANG II na circulação periférica pode atuar sobre o cérebro através de "janelas" centrais.

Em um estudo recente na criação de ovinos, foi demonstrado que a ANG II intravenosa produz intensa expressão da proteína c-fos marcada na SFO, OVLT, MnPO, SON e PVN pode induzir a atividade celular (SHI *et al.*, 2003, 2004c). A ANG II periférica atua no hipotálamo fetal indiretamente, através dos órgãos circunventriculares (CVOs), como a SFO, OVLT no cérebro, em que falta a BBB, e são ricos em receptores de ANG II. Estes resultados são interessantes porque eles indicaram que os caminhos da SFO, OVLT e MnPO ao hipotálamo fetal foram estabelecidos e são funcionais durante a gestação tardia. Esta descoberta também forneceu uma nova abordagem da utilização do método existente (mapeamento da proteína c-fos com o modelo do feto vivo) para estudar o desenvolvimento funcional do cérebro do feto no útero. Compreender esse aspecto da fisiologia do desenvolvimento também é importante para a compreensão das anormalidades que possam ocorrer. Alterações durante o desenvolvimento do SRA cerebral do feto pode resultar em problemas que afetam não só a fase de pré-natal, mas também a saúde e o bem-estar pós-natal.

Receptores de ANG II são predominantes nos núcleos no hipotálamo fetal, nos neurônios do tálamo, no cerebelo e no córtex. O calendário de aparecimento desses receptores apoia a tese de SRA na gestação tardia (MUNGALL *et al.*, 1995). Disfunção do hipotálamo fetal rica em receptores de ANG II pode ter impacto sobre a maturação do tecido fetal e, portanto, ter profundas conseqüências na vida pós-natal (CHEN *et al.*, 2005).

É importante salientar que o sistema serotoninérgico é co-responsável pela regulação do equilíbrio hidroeletrólítico. Estruturas das regiões prosencefálicas envolvidas no controle hidroeletrólítico e cardiocirculatório são reciprocamente responsáveis pela inervação da rafe mediana cerebral (REIS *et al.*, 1991; TANAKA *et al.*, 1998, 2001; CELADA *et al.*, 2002). O contingente de neurônios sensíveis a ANG II do SFO projeta neurônios serotoninérgicos para o NDR (REIS *et al.*, 1991; TANAKA *et al.*, 1998). Esta avaliação foi realizada em um estudo no qual foi concluído que neurônios sensíveis a ANG II do SFO monitoram os níveis circulantes de ANG II e depois transmitem a informação para o NDR.

De acordo com as observações acima, pode-se constatar que existem evidências circunstanciais para a existência de um circuito neuronal SFO-NDR-SFO que deve ser atribuído à regulação do balanço hidroeletrólítico e cardiovascular como proposto outrora (REIS *et al.*, 1994, CAVALCANTE-LIMA *et al.*, 2005a, b). Deve-se levar em consideração a possibilidade de outra interação recíproca entre áreas prosencefálicas e rafe mediana, particularmente entre OVLT, MnPO, AHL e NDR. Estas especulações experimentais, realizadas por REIS *et al.* (1994) e TANAKA *et al.* (2004), aumentam a possibilidade de que outros sinais humorais (níveis plasmáticos de ANP e OT) bem como a liberação neural desses peptídeos em estruturas da *lamina terminalis* integram sistemas que monitoram o *status* hidroeletrólítico.

A relação neuroanatômica mencionada anteriormente pressupôs a elaboração de interações funcionais complexas entre estruturas cerebrais prosencefálicas e mesencefálicas. Isto diz respeito ao controle das funções autonômicas, neuroendócrinas e comportamentais durante alterações homeostáticas presentes no ambiente cerebral.

### 3.4 REGULAÇÃO DO APETITE POR SÓDIO

A regulação homeostática, pelo cérebro, da ingestão de fluídos é multifatorial. Sinais osmóticos, iônicos, hormonais e nervosos são convergidos e integrados pelo SNC. Regiões clássicas envolvidas neste controle hídrico são os órgãos circumventriculares (OVLT e SFO) situados na parede anterior do terceiro ventrículo (*lamina terminalis*). A saciedade ou extinção da sede na seqüência da ingestão de água envolve a participação de outras vias neurais sensoriais e integradoras que também interagem com este circuito (McKINLEY & JOHNSON, 2004).

O tratamento crônico com baixas doses de captopril, similarmente à sua adição a água, incrementou níveis plasmáticos de ANG I devido à ação periférica (FITZSIMONS, 1998). Esta condição induz uma supressão do *feedback* negativo nas células justaglomerulares, com subsequente hipernatremia e baixos níveis plasmáticos de ANG II. Assim, uma alta disponibilidade de ANG I cerebral permite um incremento da sua conversão central para ANG II, particularmente no SFO.

MECAWI *et al.* (2008) investigou a influência do captopril, no tratamento de ratas durante a gestação e lactação, sobre o equilíbrio hidroeletrólítico, particularmente sobre a sede e apetite por sódio, em filhotes machos adultos. Seus resultados mostraram que a inibição crônica da atividade da ECA durante a gravidez e lactação programa a regulação do apetite por sódio e sede induzida, diminuindo os valores de ingestão de água e sal na idade adulta.

Hiponatremia temporária natural (congenita) ou experimental (por depleção de sódio) ou hipernatremia (pela sobrecarga de sódio) durante o período pré-natal são sugeridos para afetar o desenvolvimento dos sistemas que regulam o apetite de beber e de sódio (LESHEM *et al.*, 1996; ANTUNES *et al.*, 1970).

A relação entre estímulos viscero-sensoriais (depleção de volume, decréscimo da carga de filtração de sódio ao longo da mácula densa, etc), níveis plasmáticos de ANG II, ANP, OT e vias serotoninérgicas ascendentes foi demonstrada ilustradamente por REIS (2007). Relações recíprocas entre SFO e NDR e entre NDR e NPBL também foram representadas mostrando a plasticidade das reações comportamentais adaptativas induzidas por depleção de volume através: da sinalização das alterações viscero-sensoriais e da monitoração dos níveis plasmáticos de ANG II, ANP e OT executados por estruturas prosencefálicas. Entretanto, segundo o autor, permanecem para ser elucidados: a relação funcional recíproca entre NDR e NPBL; a origem da transmissão dos sinais viscero-sensoriais no déficit da concentração de sódio e volume do FEC e da carga de filtração de sódio nos túbulos renais e a existência de sinais de estruturas prosencefálicas para regiões mesencefálicas, transmitindo informações sobre monitoração da concentração plasmática de sódio, ANG II, ANP e outros fatores humorais. Assim sendo, os contextos fisiológicos precisam ser investigados para esclarecer como estes sistemas homeostáticos funcionam. Além disso, qual é o curso temporal da ativação desses fatores e a correlação clínica entre o distúrbio funcional de cada sistema .

### 3.5 ESTRESSE E HIPERTENSÃO PROGRAMADA

Qualquer fator que perturbe o desenvolvimento fetal no útero pode provocar alterações inadequadas que contribuem para o risco de doenças. Tais fatores incluem a exposição da mãe à desnutrição, ou medicamentos como anti-hipertensivos ou glicocorticóides em períodos críticos da gestação. Foi proposto que permanentes mudanças na expressão dos genes e funções do cérebro e rim poderiam ser cruciais no desenvolvimento da

hipertensão inicial no adulto, como consequência da exposição pré-natal a fatores inadequados, tais como o cortisol (DODIC *et al.* 2002c).

Agressões ambientais, como hipóxia e outros estressores, também podem ser fatores inadequados para exposição dos fetos durante a gestação (MAO *et al.*, 2008). Existem hormônios corticosteróides, como o cortisol produzido pela glândula supra-renal, que estão envolvidos na resposta aos estressores. Ele aumenta a pressão arterial e o açúcar do sangue, além de suprimir o sistema imune. Estudos em carneiros mostraram alterações na expressão de angiotensinogênio e do receptor AT<sub>1</sub>R no hipotálamo e no bulbo (WINTOUR *et al.*, 2003). Portanto, o cérebro é um dos órgãos mais vulneráveis no início do desenvolvimento, especialmente em um estado extremamente primitivo de desenvolvimento.

A má alimentação compromete o desenvolvimento fetal e representa riscos à saúde em longo prazo para a prole. A restrição de proteínas em alimentos durante a gravidez aumenta a pressão arterial de ratos filhotes por 20-30 mm-Hg (SAHAJPAL & ASHTON, 2005). Um estudo anterior sugeriu que este foi associado com uma redução no número de néfrons justa medulares e aumento da sensibilidade à ANG II *in vivo* (WOODS *et al.*, 2001). Estudos mais recentes têm proposto um *link* entre nefrogênese prejudicada, diminuição da atividade do SRA e o aparecimento da hipertensão em ratos no útero de uma mãe com dieta de baixa proteína (LANGLEY & JACKSON, 1994; GILBERT *et al.*, 2007).

O aumento da expressão do receptor AT<sub>1</sub>, que pode ser uma consequência do efeito direto da restrição de proteínas, poderia contribuir para a pressão arterial elevada deste modelo (SAHAJPAL e ASHTON, 2003). Prole em ratos com história de restrição de proteína materna durante a gravidez, após quatro semanas do nascimento, tinha a expressão do receptor AT<sub>1</sub> aumentada (62%) e expressão AT<sub>2</sub> reduzida (35%), enquanto que a atividade de renina renal e as concentrações plasmáticas de aldosterona não foram diferentes. O aumento da expressão do receptor AT<sub>1</sub> nos rins é consistente com a maior sensibilidade hemodinâmica para ANG II *in vivo* (SAHAJPAL e ASHTON, 2003). Isto pode resultar em uma inadequada redução da taxa de filtração glomerular, retenção de sal e água e um aumento da pressão arterial.

Dados epidemiológicos e experimentais suportam a idéia de que a origem fetal é importante na determinação de risco subsequente para o desenvolvimento de doenças cardiovasculares e doenças metabólicas (BARKER & OSMOND, 1986; BARKER, 1995; HUXLEYM *et al.*, 2000; GODFREY & BARKER, 2001). A programação intra-uterina da hipertensão está associada com evidência de aumento da atividade SRA.

PLADYS e colegas investigaram se o barorreflexo arterial e a variabilidade da pressão arterial são alterados por programação no útero de hipertensão arterial secundária à privação proteica isocalórica e se a ativação do SRA desempenha um papel nessa alteração. (PLADYS *et al.*, 2004). Estes dados demonstram um papel tônico principal do SRA cerebral na hipertensão associada com a privação nutricional pré-natal.

Em ratos, o tratamento materno com glicocorticóides resultou em um déficit de néfron em associação com o desenvolvimento de hipertensão na prole (SINGH *et al.*, 2007). Testes com a técnica de PCR em tempo real revelaram que a corticosterona materna produziu a expressão aumentada de AT<sub>1</sub>R e a fetal de AT<sub>2</sub>R no tecido periférico. Mudanças no SRA podem contribuir para o desenvolvimento dos fenótipos da hipertensão.

Nos ovinos, a pressão arterial média foi significativamente maior na prole adulta cujas mães tinham sido tratadas com cortisol durante a gravidez. Os resultados de DODIC *et al.* (2002b) sugeriram que a expressão do gene do hipocampo alterado poderia ter um efeito significativo em seu desenvolvimento e no comportamento pós-natal. Outros trabalhos sugerem que ambas as regiões, rins e o cérebro, são afetados por eventos que também programam a elevada pressão sanguínea na prole de animais na qual o ambiente intra-uterino foi perturbado em determinada fase (DODIC *et al.*, 2001).

### 3.6 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Ingestão de água e sal são respostas comportamentais implicadas na regulação integradora do volume de líquido extracelular e na tonicidade da pressão arterial (JOHNSON & THUNHORST, 1997; FITZSIMONS, 1998; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004; REIS, 2007). Protocolos que causam a ruptura da ingestão de água e de eletrólitos, como o estímulo osmótico, a privação de água e depleção de sódio são usados para estudar os mecanismos complexos que ativam a sede e o apetite de sódio (ANDERSSON, 1952; FALK, 1965; REIS *et al.*, 1990; BADAUÊ PASSOS *et al.*, 2001, DE-LUCA *et al.*, 2007). Neste contexto, a ANG II está envolvida na mediação das respostas dipsogênicas e natriorexigênicas eliciadas por estímulos hipovolêmico e hiponatrêmico (JOHNSON & THUNHORST, 1997; FITZSIMONS, 1998; DE-LUCA *et al.*, 2000; MCKINLEY & JOHNSON, 2004; DANIELS *et al.*, 2007; REIS, 2007).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar do biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas, onde foram acasalados os animais e confirmada a gestação. As fêmeas foram tratadas do sétimo dia de gestação ao décimo quarto dias pós-natal (DPN), com o uso de substâncias que alteram os vários estágios da cascata renina-angiotensina. Após o nascimento, os animais provenientes de quatro ninhadas diferentes, com oito a doze animais, permaneceram em gaiolas até o vigésimo primeiro dia pós-natal quando foram desmamados e alocados em caixas de acrílico brancas de acordo com a ninhada e sexo. Durante o período da amamentação foi avaliada a ingestão de leite (quantidade) no dia inicial, no quarto, no oitavo e no décimo segundo dia.

### 4.2 DROGAS

Para a alteração do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRA) foram utilizados: o captopril (50 mg/kg); substância pura (manipulada) o isoproterenol (300 µg/kg), substância pura, losartan (50 mg/kg); de uso comercial, furosemida (10 mg/kg), um diurético inibidor do co-transportador de  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^{2-}$  presente no ramo ascendente espesso da alça de Henle, furosemida (Lasix®), na sua forma original.

### 4.3 DESMAME

No vigésimo primeiro dia após o nascimento (DPN) foi realizado o desmame dos animais, que foram alocados em caixas de acrílico individuais, de acordo com a ninhada e o sexo, onde permaneceram até o período de avaliações (60-75 DPN).

No período do desmame até a fase adulta os ratos permaneceram acomodados em gaiolas metabólicas com acesso a bebedouros volumétricos contendo água destilada e ração *ad libitum*. As salas de manutenção e experimentação tinham ambiente climatizado (temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade  $60 \pm 10\%$ ) com ciclo claro-escuro 12-12h.

### 4.4 FASE ADULTA

Na fase adulta, foram realizados estudos experimentais com ingestão de água, salina e alimento. Todos os procedimentos aos quais os animais utilizados neste estudo foram submetidos estavam de acordo com as normas e princípios éticos preconizados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, que segue o *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* (NIH Publicação Nº 85-23 revisado, 1996).

### 4.5 TRATAMENTO

Os animais foram alocados em cinco grupos experimentais diferentes, o grupo controle, o captopril, o isoproterenol e o furosemida. Os animais foram acasalados e foi

realizado o esfregaço vaginal nas fêmeas para a confirmação da cópula. A administração dos tratamentos nas fêmeas foi feita a partir do sétimo dia de gestação até o décimo quarto dia após o parto (DPN), contabilizando vinte e oito dias de tratamento. O grupo controle recebeu solução salina 0,9%, o segundo grupo recebeu furosemida (10 mg/kg), o terceiro isoproterenol (300 µg/kg), o quarto losartan (50 mg/kg); e o quinto captopril (50 mg/kg), todos aplicados por via subcutânea diariamente.

## **4.6 AVALIAÇÕES**

Durante o período de tratamento (7-14 DPN) os animais foram avaliados diariamente quanto à taxa de mortalidade, ganho de peso corporal e ingestão de leite. No período em que os animais foram considerados adultos (60-75 DPN), ocorreram as avaliações que envolveram o comportamento ingestivo. Os animais foram submetidos a protocolos consagrados na literatura para avaliação da ingestão basal e sob estímulos de fluídos/alimentos. Durante todo esse período os ratos permaneceram em gaiolas metabólicas alocadas em salas climatizadas (temperatura de  $24 \pm 2^\circ\text{C}$  e umidade  $60 \pm 10\%$ ) com ciclo claro-escuro 12-12h.

## **4.7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

### **4.7.1 AVALIAÇÕES NEONATAIS**

#### **A. INGESTÃO DE LEITE**

A avaliação da ingestão neonatal de leite foi realizada segundo adaptação do protocolo descrito por PERILLAN *et al.* (2007). O dia do nascimento dos animais foi designado como dia zero. A ninhada, usualmente 8-12 filhotes, foi mantida intacta até o 23º dia do teste.

O protocolo consistiu em quatro etapas: 1) Privação: quatro horas antes do teste, a ninhada foi ajustada para oito filhotes, que foram separados da mãe durante as últimas duas horas e alocados em caixas acrílicas com maravalha sob aquecimento com auxílio de uma lâmpada incandescente de 25-W. A temperatura cutânea foi monitorada por meio de um termistor e mantida a  $33^\circ\text{C}$ . 2) Pesagem: os neonatos foram pesados com auxílio de uma balança de precisão antes e depois da privação. 3) Ingestão: os neonatos foram realocados junto as suas progenitoras durante uma hora e meia e posteriormente repesados. 4) Cálculo da ingestão.

No cálculo da ingestão, ao final do período do teste, os ratos foram repesados individualmente e a porcentagem de ganho de peso foi calculada tomando como base a média percentual de ganho de peso dos animais em relação à média percentual da ingestão basal (dia zero), considerada 100%. O ganho de peso corporal foi usado como a mensuração da ingestão de leite, uma vez que não havia nenhuma outra fonte de ganho de peso. De acordo com WIRTH & EPSTEIN (1976), que primeiramente designaram este teste de ingestão, perdas por evaporação presume-se ser a mesma para todos os neonatos, tratados ou controles, e que não há excreção espontânea em ratos lactantes.

## 4.7.2 AVALIAÇÕES BASAIS

### A. EXPERIMENTOS ENVOLVENDO O COMPORTAMENTO INGESTIVO: INGESTÕES BASAIS

Foram realizadas duas séries de experimentos a fim de avaliar a ingestão basal dos animais tratados com as substâncias que alteram o SRA, durante a fase adulta (60-75 DPN).

#### A.1 Ingestão de alimento

A ingestão basal de alimento foi mensurada por um período de 24 horas a fim de avaliar a influência dos antagonistas do SRA sobre o apetite e saciedade. Durante esta avaliação os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração moída nos comedouros e água destilada em buretas volumétricas graduadas. Para análise dos resultados as vasilhas contendo as rações foram pesadas ( no dia considerado 0º) e após um período de 24 horas. Depois subtraiu-se os valores e o resultado foi considerado o valor da ingestão (em gramas).

#### A.2 Ingestão de água e salina

Com o objetivo de avaliar a resposta dipsogênica e o apetite por sódio, a preferência dos animais por água ou NaCl 0,3M ou 1,8% , solução normalmente aversiva à percepção gustatória do rato, foram mensuradas em vários períodos (15, 30, 60, 120, 180, 240 , 300 e 1440 minutos), sendo ofertadas em buretas volumétricas graduadas. Os fluidos e a ração em *pellets* foram ofertados *ad libitum*.

## 4.7.3 AVALIAÇÕES SOB ESTÍMULOS

### A. EXPERIMENTOS ENVOLVENDO O COMPORTAMENTO INGESTIVO: INGESTÕES SOB JEJUM

Foram realizados dois experimentos a fim de avaliar a ingestão, sob jejum, dos animais. Os protocolos utilizados foram baseados naqueles descritos outrora por REIS *et al.* 1990, BADAUÊ-PASSOS *et al.* 2001 e DE-LUCA *et al.* 2002.

#### A.1 Ingestão de água

Nesta condição, a ingestão de água foi mensurada nos períodos de 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 1440 minutos, após 24 horas de privação hídrica com objetivo de avaliar a influência das substâncias que alteram o SRA sobre o fenômeno da sede no animal em jejum. Durante este período o acesso a ração foi oferecida *ad libitum*.

#### A.2 Ingestão de salina

Nesta condição, a ingestão de NaCl 1,8% e foi mensurada nos períodos de 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300 e 1440 minutos, após 24 horas de privação hídrica, com objetivo de avaliar

a influência das substâncias que alteram o SRA sobre a preferência entre água e NaCl 0,3 M ou 1,8% no animal em jejum. Durante este período não houve acesso a ingestão de fluidos.

#### **4.7.4 EXPERIMENTOS ENVOLVENDO O COMPORTAMENTO INGESTIVO: INGESTÕES SOB ESTÍMULOS ESPECÍFICOS SOBRE A INDUÇÃO DO APETITE POR SÓDIO E DA SEDE**

Foram realizados dois experimentos a fim de avaliar a ingestão em animais sódio-depletados e após estímulo de hipertonidade.

##### **A. Indução da sede**

Com o objetivo de avaliar a influência dos antagonistas SRA sobre a sensação da sede, os animais receberam por via oral solução de salina hipertônica 1,8% a fim de induzir uma hipertonidade plasmática. Durante este experimento os animais tiveram acesso *ad libitum* à ração e salina hipertônica. Após um período de 24 horas, a ingestão de água foi mensurada em nove momentos distintos: 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 e 1440 minutos.

##### **B. Depleção de sódio e privação hidrossalina**

Com o objetivo de avaliar a influência das substâncias que alteram o SRA sobre o apetite por sódio em animais hiponatremicos, os ratos receberam por via subcutânea furosemida (20 mg/kg) a fim de induzir hiponatremia pela espoliação de sódio peculiar a este fármaco. Este diurético foi administrado 24 horas antes da reapresentação dos fluidos. Durante este experimento os animais tiveram acesso *ad libitum* à dieta hiponatremica (farinha de milho) e água. Após um período de 24 horas, o apetite por sódio foi avaliado mensurando-se a ingestão de NaCl 0,3M ou 1,8% em nove momentos distintos: 15, 30, 60, 120 e 180, 240, 300, 360 e 1440 minutos.

#### **4.7.5 AVALIAÇÃO DO VOLUME DE URINA**

Amostras de urina foram coletadas, durante um período de 24h, nos protocolos: basal, privação hídrica e depleção de sódio. Volume urinário foi determinado através de tubos de 0,1 ml, graduado e expresso em mililitros (ml).

#### **4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As análises foram realizadas utilizando *software* GraphPad Prism, versão 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os resultados obtidos foram expressos em valores de média e erro padrão da média. Para comparação entre mais de dois grupos sob apenas um fator de variação comum, foi realizada a análise da variância (ANOVA) para variáveis paramétricas de uma via, seguida pela determinação da significância das diferenças entre os grupos, pelo teste de Bonferroni. Mais de dois grupos submetidos à interferência simultânea de dois fatores de variação foram analisados por ANOVA duas vias, seguida do teste de Bonferroni. Para comparação entre dois grupos com um único fator de variação, utilizou-se o teste *t de Student*. O nível crítico fixado foi de 5% ( $P < 0,05$ ) para se admitir uma diferença de médias como estatisticamente significativa.

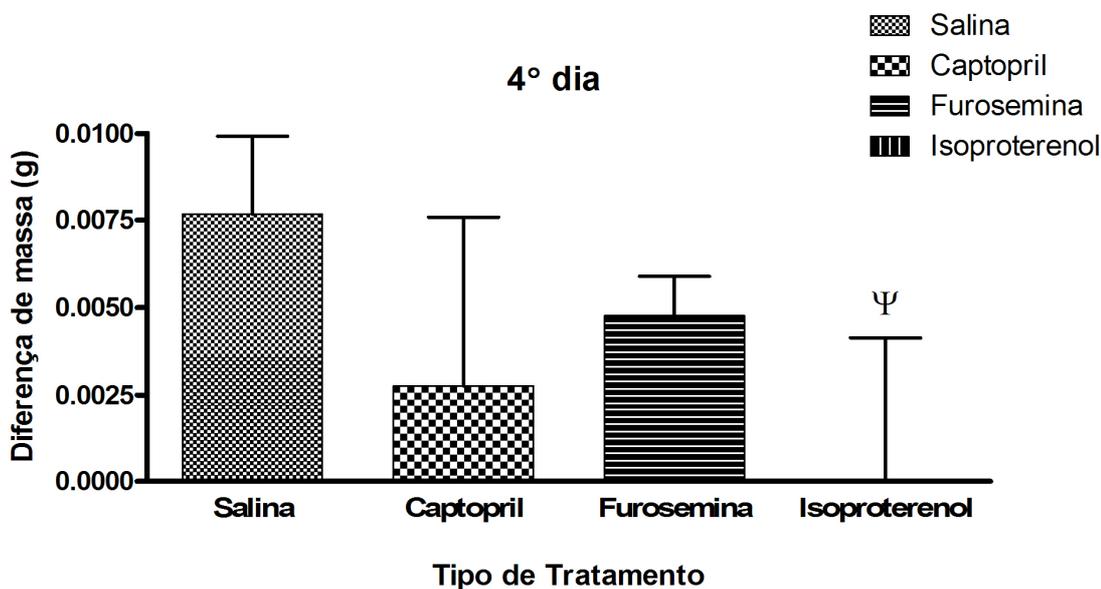
## 5 RESULTADOS

Nesta seção serão mostrados apenas os resultados. As discussões e análises destes resultados serão detalhadas no tópico de discussões (6).

### 5.1 AVALIAÇÕES DO PESO CORPORAL E DA INGESTÃO DE LEITE

#### 5.1.1 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE LEITE NO 4º DIA DE LACTAÇÃO

No 4º dia de lactação (figura 03), durante o tratamento materno com inibidores da ECA e betabloqueadores, houve uma diferença significativa da média percentual da ingestão de leite do tratamento isoproterenol em relação à média do grupo controle (salina). Houve um menor percentual da ingestão de leite no grupo captopril, mas não significativo.

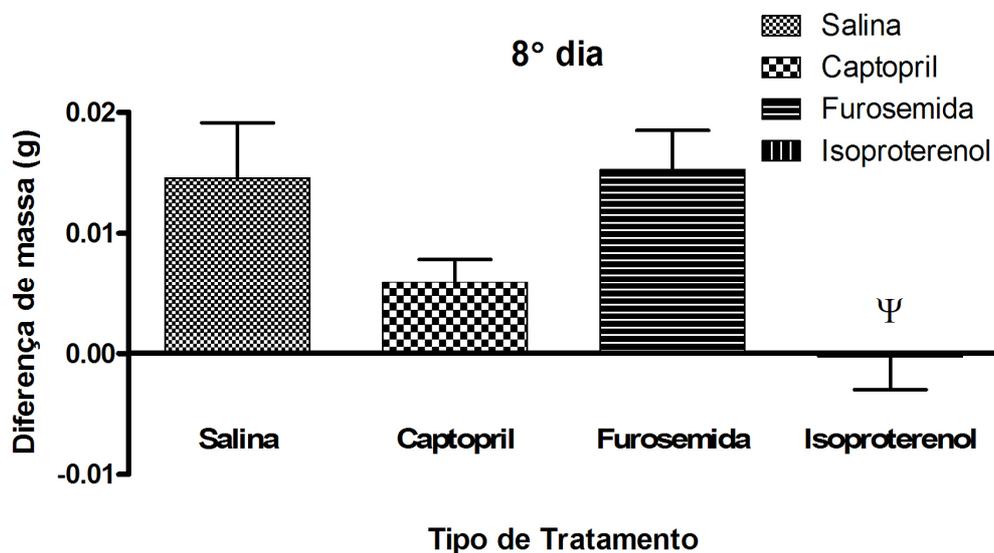


**Figura 03:** Percentual da ingestão de leite em ratos neonatos, no 4º dia de lactação, tratados com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de leite do grupo controle. <sup>Ψ</sup> P<0,05 comparado com grupo salina.

#### 5.1.2 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE LEITE NO 8º DIA DE LACTAÇÃO

Observa-se na figura 04 que, no 8º dia de lactação, durante o tratamento materno com inibidores da ECA, betabloqueadores e diurético, houve uma diferença significativa da média percentual da ingestão de leite do tratamento isoproterenol em relação ao grupo

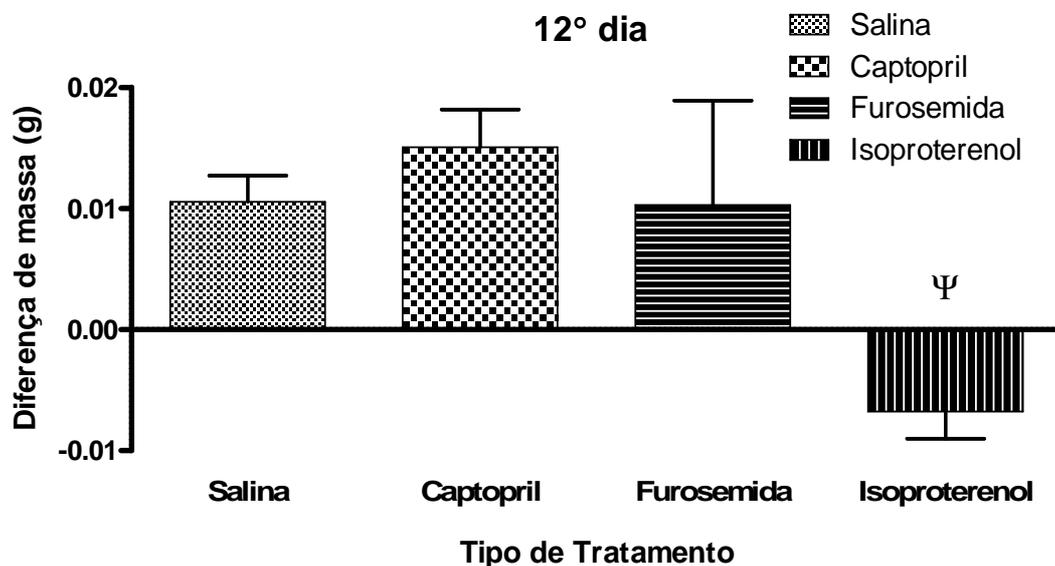
controle. Nos outros grupos não houve diferença percentual significativa em relação ao grupo controle (salina).



**Figura 04:** Percentual da ingestão de leite em ratos neonatos, no 8° dia de lactação, tratados com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de leite do grupo controle.  $\Psi$   $P < 0,05$  comparado com grupo salina.

### 5.1.3 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE LEITE NO 12° DIA DE LACTAÇÃO

No 12° dia de ingestão, também houve diferença significativa no percentual de ingestão de leite do grupo isoproterenol em relação ao controle. Não ocorreu diferença significativa no percentual de ingestão dos outros tratamentos em relação ao grupo controle (ver figura 05).

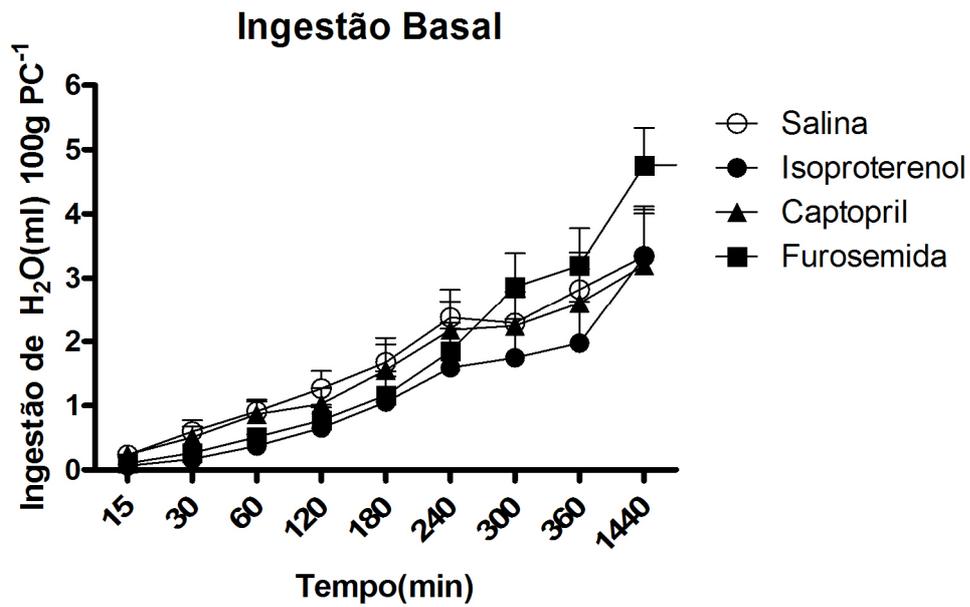


**Figura 05:** Percentual da ingestão de leite em ratos neonatos, no 12° dia de lactação, tratados com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de leite do grupo controle.  $\psi$   $P < 0,05$  comparado com grupo salina.

## 5.2 AVALIAÇÕES BASAIS

### 5.2.1 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO BASAL DE ÁGUA DURANTE A VIDA ADULTA

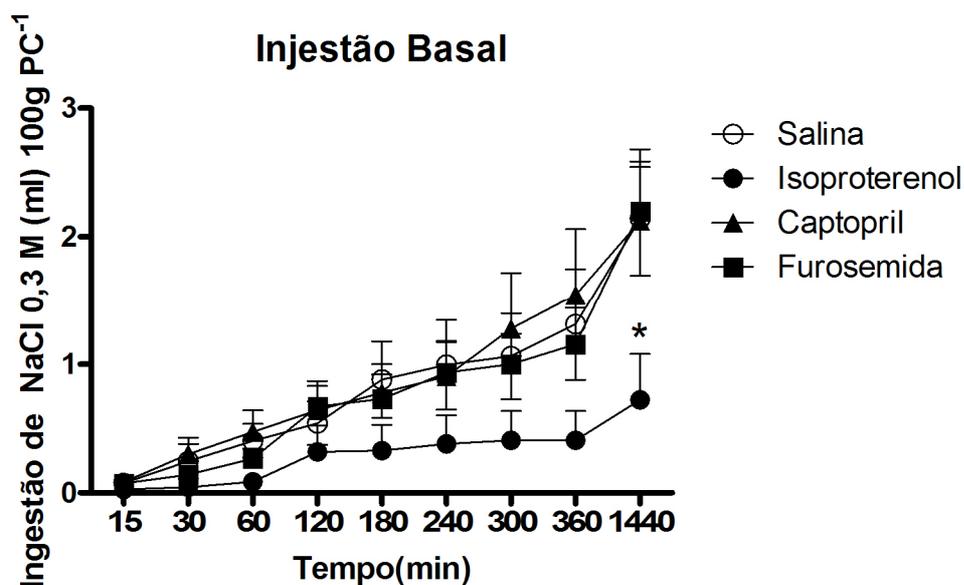
Durante a ingestão de água, não houve diferença significativa do percentual de ingestão dos animais tratados com captopril, isoproterenol e furosemida em relação ao grupo controle ( ver figura 06).



**Figura 06:** Percentual da ingestão basal de água em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de água do grupo controle.

### 5.2.2 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO BASAL DE NaCl (0,3 M ou 1,8%) DURANTE A VIDA ADULTA

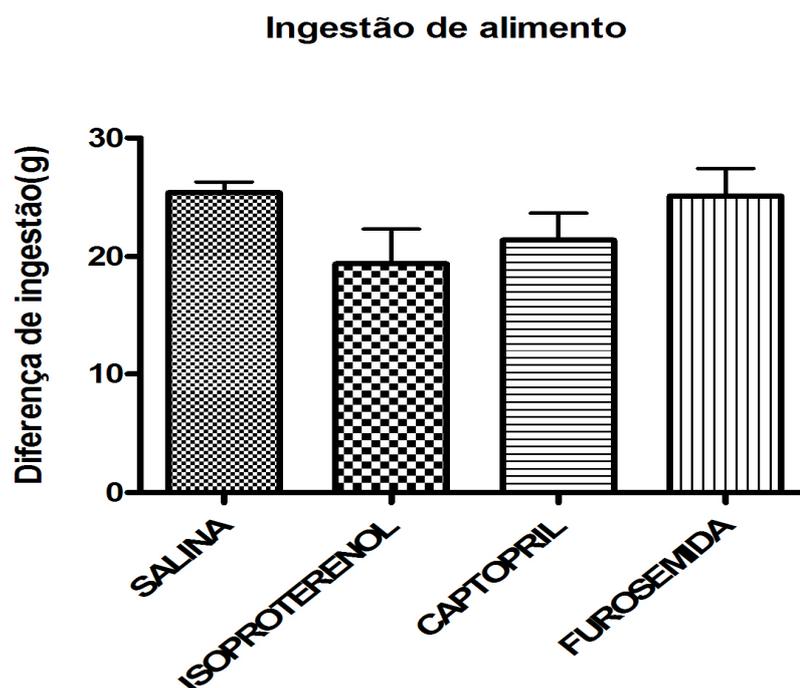
Conforme figura 07, na ingestão de salina durante o protocolo basal, houve diferença significativa do percentual de ingestão dos animais tratados com isoproterenol em relação ao grupo controle no tempo 1440 minutos ( $2,14 \pm 0,44$  N=9 *versus*  $0,72 \pm 0,36$  N=8  $P < 0,05$ ). Não ocorreu diferença significativa entre o percentual de ingestão do grupo controle com o do grupo captopril e furosemida.



**Figura 07:** Percentual da ingestão de salina (1,8%) em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde à ingestão de salina do grupo controle. \*P<0,05 comparado com grupo salina.

### 5.2.3 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO BASAL DE ALIMENTO

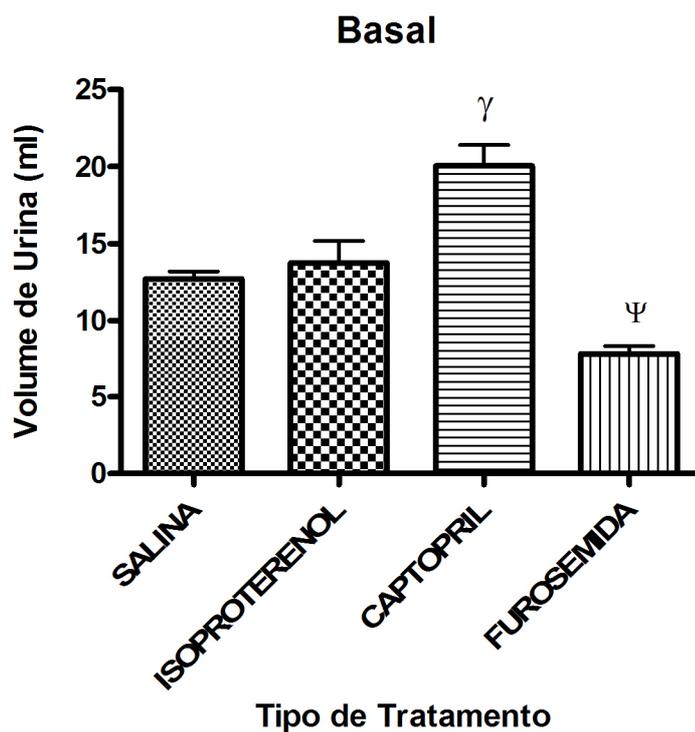
No protocolo de ingestão de alimento, não houve diferença percentual significativa na ingestão de alimento entre os grupos e de nenhum grupo em relação ao controle (salina). Respectivamente: captopril ( $21,4 \pm 0,72$  N=10 *versus*  $25,40 \pm 0,28$  N=10 P< 0,05), isoproterenol ( $19,38 \pm 1,03$  N=10 *versus*  $25,40 \pm 0,28$  N=8 P< 0,05) e furosemida ( $25,1 \pm 0,724$  N=10 *versus*  $25,40 \pm 0,28$  N=10 P< 0,05) (ver figura 08).



**Figura 08:** Percentual da ingestão de alimento em ratos de mães tratadas com isoproterenol, captopril e furosemida em relação à linha base, que corresponde à ingestão basal de alimento do grupo controle.

#### 5.2.4 AVALIAÇÃO PERCENTUAL DO VOLUME DE URINA (BASAL)

Observa-se na figura 09, no protocolo de avaliação basal, o volume de urina foi significativamente maior no grupo captopril em relação ao grupo controle ( $20,5 \pm 1,37$  N=10 *versus*  $12,71 \pm 0,49$  N=10  $P < 0,05$ ), e significativamente menor no grupo furosemida em relação ao grupo controle ( $7,80 \pm 0,48$  N=10 *versus*  $12,71 \pm 0,49$  N=10  $P < 0,05$ ). No grupo isoproterenol não houve diferença significativa em relação ao grupo controle.

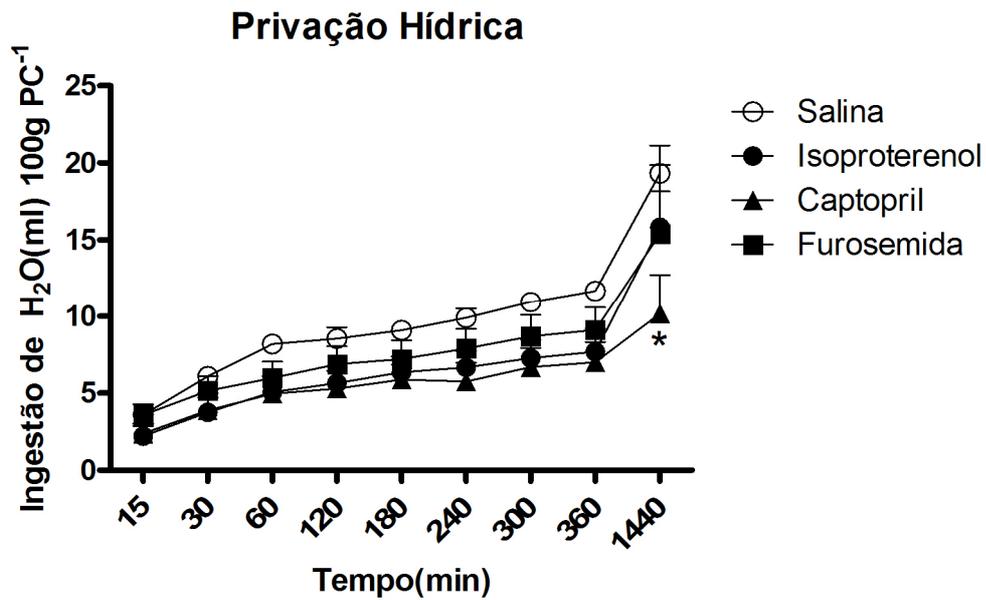


**Figura 09:** Percentual do volume de urina em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e isoproterenol, durante o protocolo basal, em relação à linha base, que corresponde ao volume de urina do grupo controle. <sup>□</sup>P<0,05 comparado com grupo salina. <sup>Ψ</sup>P<0,05 comparado com grupo salina

### 5.3 AVALIAÇÕES SOB ESTÍMULOS

#### 5.3.1 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE ÁGUA, NO PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO HÍDRICA, DURANTE A VIDA ADULTA

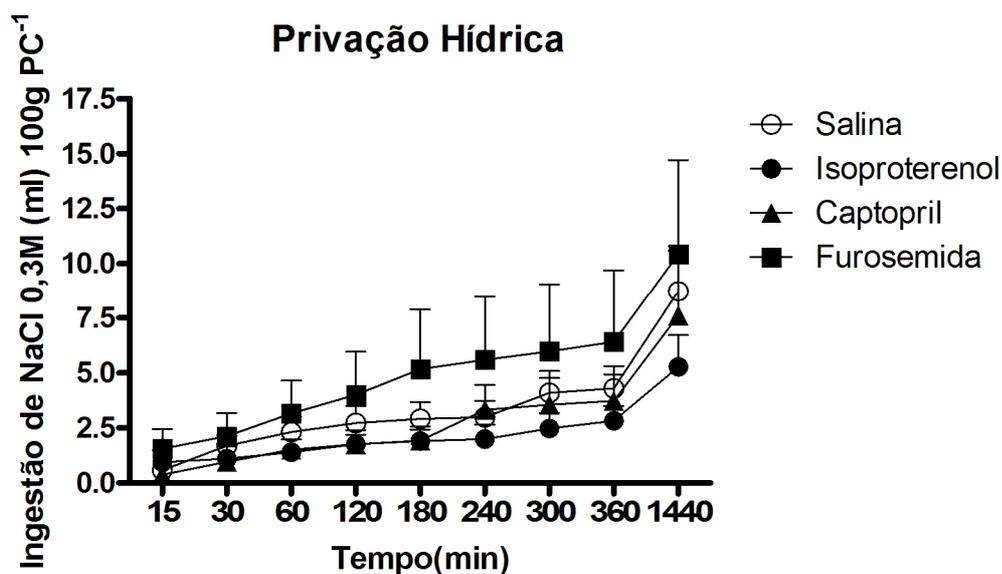
Na ingestão cumulativa de água, sob privação hídrica, houve diferença significativa no percentual de ingestão entre o grupo captopril e o controle no tempo 1440 minutos ( $19,32 \pm 1,8$  N=10 *versus*  $10,18 \pm 2,5$  N=10 P< 0,05) (ver figura 10).



**Figura 10:** Percentual da ingestão de água após uma privação hídrica de 24 h, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde à ingestão de água do grupo controle. \*P<0,05 comparado com grupo salina.

### 5.3.2 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE SALINA, NO PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO HÍDRICA, DURANTE A VIDA ADULTA

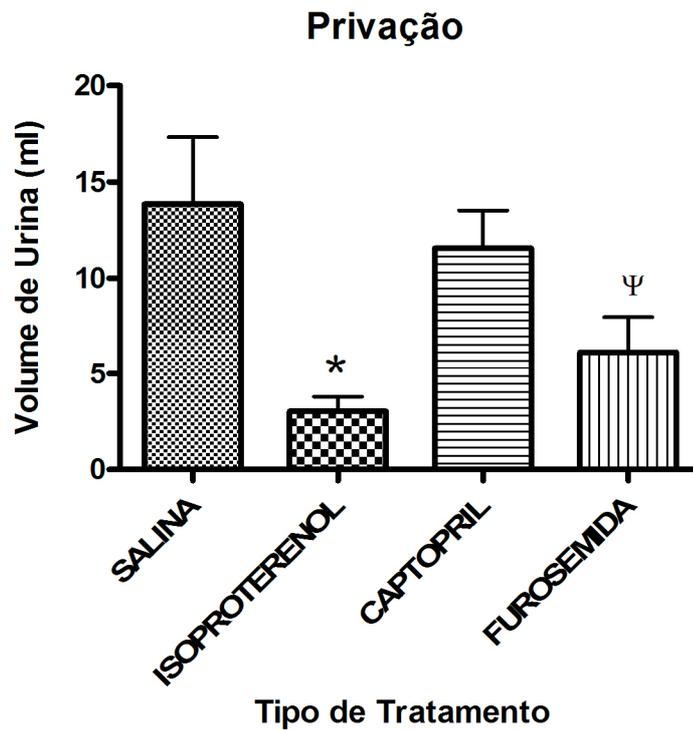
Na avaliação da ingestão de salina, no protocolo de privação, não ocorreu diferença significativa do percentual de ingestão de salina dos grupos tratados em relação ao grupo controle. Observou-se que a interação do tratamento em relação ao tempo foi considerada não significativa (ver figura 11).



**Figura 11:** Percentual da ingestão de salina após uma privação hídrica de 24 h, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde à ingestão de salina do grupo controle.

### 5.3.3 AVALIAÇÃO PERCENTUAL DO VOLUME DE URINA (PRIVAÇÃO)

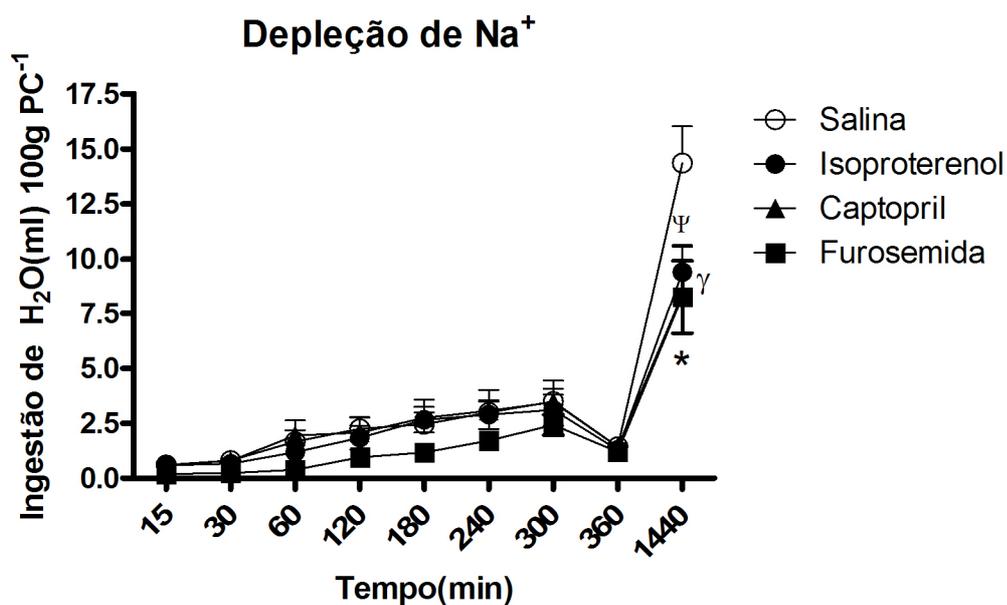
A figura 12, no protocolo de privação, mostra que o percentual do volume de urina do grupo isoproterenol em relação ao controle foi significativamente menor ( $3,04 \pm 0,27$  N=8 *versus*  $13,86 \pm 1,09$  N=10  $P < 0,05$ ). Foi significativo também o percentual do grupo furosemida em relação ao grupo controle ( $6,16 \pm 0,57$  N=10 *versus*  $13,86 \pm 1,09$  N=10  $P < 0,05$ ).



**Figura 12:** Percentual do volume de urina após uma privação hídrica de 24 h, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde ao volume de urina do grupo controle. \*P<0,05 comparado com grupo salina. <sup>Ψ</sup> P<0,05 comparado com grupo salina.

#### 5.3.4 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE ÁGUA EM ANIMAIS DEPLETADOS DE SÓDIO DURANTE A VIDA ADULTA

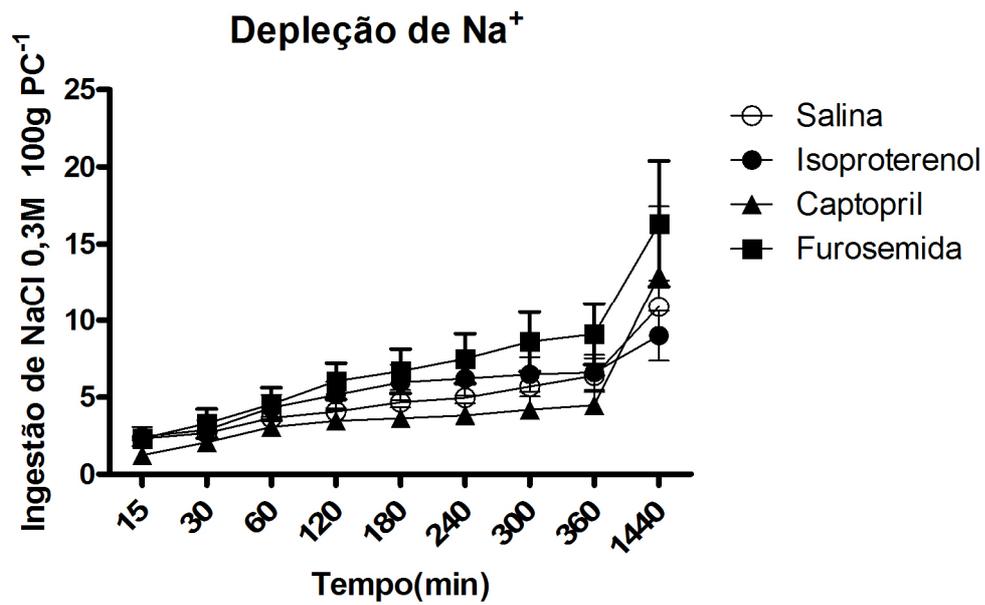
Na avaliação da ingestão de água, durante o protocolo de depleção de sódio, observou-se que o tratamento teve efeito sobre o tempo e, portanto, foi considerada significativa a interação. O efeito do tratamento foi considerado extremamente significativo. Observou-se também que o tempo teve efeito sobre os resultados, destacando-se a extrema significância no tempo 1440 minutos dos tratamentos: captopril em relação ao controle ( $14,36 \pm 1,66$  N=9 *versus*  $8,36 \pm 2,2$  N=10 P< 0,05), isoproterenol em relação ao controle. ( $14,36 \pm 1,66$  N=9 *versus*  $9,41 \pm 1,22$  N=9 P< 0,05) e furosemida em relação ao controle ( $14,36 \pm 1,66$  N=9 *versus*  $8,26 \pm 1,66$  N=9 P< 0,05) (ver figura 13).



**Figura 13:** Percentual da ingestão de água após depleção de sódio, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde à ingestão de água do grupo controle. \*P<0,05 comparado com grupo salina. □P<0,05 comparado com grupo salina. ΨP<0,05 comparado com grupo salina.

### 5.3.5 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE SALINA EM ANIMAIS DEPLETADOS DE SÓDIO DURANTE A VIDA ADULTA

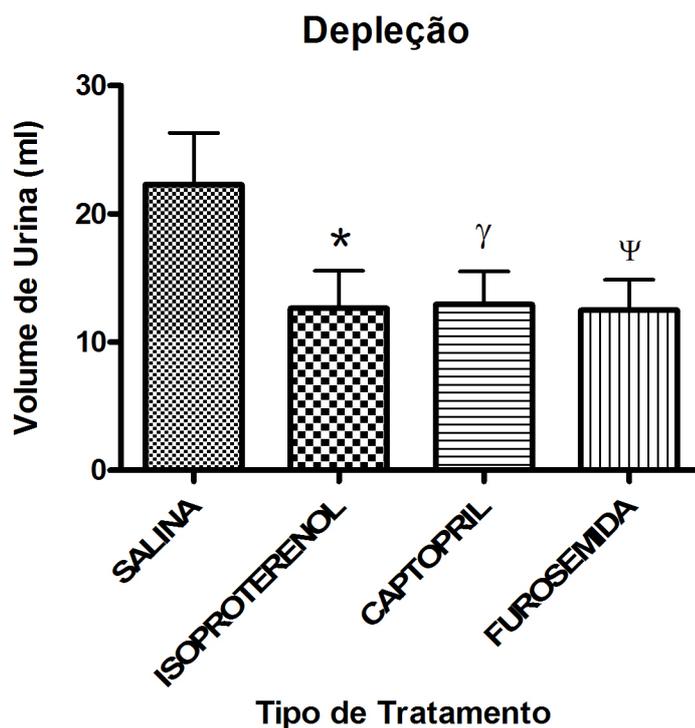
Observa-se na figura 14, na avaliação da ingestão de salina, que durante o protocolo de depleção de sódio não houve diferença significativa do percentual de ingestão nos tratamentos em relação grupo controle. Observou-se que não houve efeito do tratamento sobre o tempo, portanto, a interação foi considerada não significativa.



**Figura 14:** Percentual da ingestão de salina (1,8%) após depleção de sódio, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde à ingestão de salina do grupo controle.

### 5.3.6 AVALIAÇÃO DO VOLUME DE URINA (DEPLEÇÃO)

No protocolo de depleção, o percentual do volume dos três tratamentos foi significativamente menor em relação ao do grupo controle. O grupo isoproterenol ( $12,65 \pm 1,03$  N=8 *versus*  $22,28 \pm 1,28$ ), o captopril ( $12,93 \pm 0,81$  N=10 *versus*  $22,28 \pm 1,28$  N=10), e o furosemida ( $12,49 \pm 0,75$  N=10 *versus*  $22,28 \pm 1,28$  N=10), (conforme figura 15).



**Figura 15:** Percentual do volume de urina durante o protocolo de depleção de sódio, em ratos de mães tratadas com captopril, furosemida e isoproterenol em relação à linha base, que corresponde ao volume de urina do grupo controle. \*P<0,05 comparado com grupo salina. □P<0,05 comparado com grupo salina. ♣P<0,05 comparado com grupo salina.

#### **5.4 AVALIAÇÃO DA TAXA DE MORTALIDADE DURANTE O TRATAMENTO COM CAPTOPRIL, FUROSEMIDA, LOSARTAN E ISOPROTERENOL**

Durante o tratamento com captopril, não houve incidência de óbitos em nenhum dos grupos experimentais após o nascimento e nem durante o período de lactação. Apenas uma morte na fase adulta. Não obtivemos filhotes de mães tratadas com captopril com malformações. Enquanto que, no tratamento com furosemida houve animais natimortos e apenas uma morte na fase adulta.

O tratamento com losartan demonstrou significativas alterações, tanto sistemáticas como comportamentais. A maioria dos filhotes foi encontrado natimorto. Houve má-formações fetais. Alguns filhotes nasceram e em seguida morreram e houve um filhote apresentando teratogênese. Ocorreram quatro mortes durante a fase de lactação. No tratamento com isoproterenol não houve alterações significativas. Houve apenas um natimorto.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE MEDICAMENTOS

#### 6.1.1 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE SALINA (1,8 % ou 0,3 M) SOBRE A INGESTÃO DE LEITE EM FILHOTES

A ingestão de leite em filhotes de mães tratadas com salina hipertônica esteve elevada em todo o período de lactação. Os resultados obtidos nesse grupo salina (controle) estão de acordo com o descrito na literatura.

Sabe-se que a salina hipertônica leva à alterações no equilíbrio eletrolítico do corpo, com conseqüente aumento da sede e isto pode estar relacionado com uma alta ingestão de leite durante a lactação. Porém, muitos outros fatores podem estar envolvidos nesse processo.

Sugerindo alterações no SRA, FITZSIMONS (1972), em suas investigações observou que a liberação de renina renal com conseqüente formação de ANG II, constitui um *link* humoral no controle do balanço hídrico. Com base em estudos em ratos, foi alegado que a ANG II e elevado  $\text{Na}^+$  extracelular induziam ingestão através de mecanismos cerebrais espacialmente e funcionalmente independentes e que não havia nenhuma interação real entre estes dois fatores dipsogênicos (FITZSIMONS, 1972). Outros autores sugeriram que a ANG II provoca sede atuando no órgão subfornicial e/ou vasculosum organum localizados na parede anterior do terceiro ventrículo cerebral (FITZSIMONS, 1976; NICOLAIDES & FITZSIMONS, 1975).

Existe também a teoria dos mecanorreceptores. O principal suporte experimental para esta hipótese dos mecanorreceptores da sede foi a de que injeções de certos vasoplégicos (entre eles as prostaglandinas E) no terceiro ventrículo de ratos resultaram na redução da resposta dipsogênica induzida pela injeção posterior da angiotensina através da mesma cânula cerebral (EPSTEIN & KENNEY, 1977; NICOLAIDES & FITZSIMONS, 1975). Possíveis explicações de resultados encontrados sugeriram que osmorreceptores cerebrais são menos permeáveis a NaCl do que a sacarose, ou que existe além dos osmorreceptores, um sensor específico para a sede de sódio no cérebro. Ainda, outra possibilidade sugere que elevado  $\text{Na}^+$  e, em menor medida desidratação celular, desencadeiam um processo bioquímico que representa um elo essencial no mecanismo de excitação do osmorreceptor.

Existe outra explicação para a produção de prostaglandinas, como está descrito em ANTUNES-RODRIGUES *et al.* (2004): a angiotensina (1-7), um peptídeo endógeno bioativo constituinte do SRA, tem uma ação excitatória em algumas células da glia, aumentando a síntese de prostaglandinas em astrócitos e células de glioma.

Mediante o exposto acima, sugerimos que a ingestão crônica de salina, ainda na fase de desenvolvimento neural do feto (fase gestacional e lactacional), tenha alterado a produção de prostaglandina e ativado os mecanismos de defesa para uma readaptação frente à uma injúria. Essa prostaglandina aumentada pode interagir com  $\text{Na}^+$  do CSF para provocar a sede e aumento de ADH e conseqüente aumento de peso. Esses dados são confirmados por estudos feitos por LEKSELL em 1976 em cabras, mostrando que infusões intraventriculares de prostaglandina E (PGE), interagiram com elevada concentração de  $\text{Na}^+$  no CSF para provocar sede e liberação de ADH.

### 6.1.2 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE CAPTOPRIL SOBRE A INGESTÃO DE LEITE EM FILHOTES

Na figura 03, pode-se observar que, durante a lactação, o peso dos filhotes de mães tratadas com captopril apresentou-se reduzido no início, porém houve um aumento progressivo do percentual de ingestão de leite e conseqüente aumento de peso. Segundo DOSTAL *et al* (1991) em estudos de fertilidade realizados em ratos machos, os mesmos foram tratados por gavagem durante 60 dias antes e durante o acasalamento e as fêmeas foram tratadas por gavagem durante 14 dias antes do acasalamento, durante o acasalamento, gestação e durante a lactação, com doses de quinapril: 0, 10, 50, ou 100 mg/kg de peso corporal. Não houve efeitos significativos sobre o peso do corpo, consumo de alimento, os índices de fertilidade, o desenvolvimento fetal ou crescimento neonatal, sobrevivência, desenvolvimento, comportamento ou sobre a reprodução. Já em outro estudo com doses de 25, 75 ou 150 mg/kg durante a gestação tardia e lactação não teve efeitos sobre parto, amamentação ou desenvolvimento pós-natal; mas uma significativa redução do peso corporal neonatal durante o período de aleitamento foi observada em todas as doses.

Dessas observações pode-se sugerir que a transmissão placentária do inibidor da ECA pode ter ocorrido durante toda a lactação, além de possivelmente já estar ocorrendo durante a fase embrionária. ITA *et al.* (1982) em seus experimentos usando radioatividade, administrou <sup>14</sup>C-captopril (50 mg/kg) por via oral em ratas grávidas e teve como resultado a presença da radioatividade na passagem desta droga pela barreira feto-placentária e líquido amniótico em fetos. A presença da radioatividade detectou também a presença do captopril no leite de mães. Autoradiografias dos filhotes mostraram presença da radioatividade no cérebro. Como nenhuma radioatividade foi detectada no cérebro da mãe, parece que a barreira hematoencefálica não foi totalmente desenvolvida em sete dias de idade dos filhotes. MECAWI *et al.* (2008) em seus experimentos também sugeriram que os inibidores do SRA podem permear a barreira feto-placentária e ser liberado no leite.

Com isso, o SRA do cérebro poderia ser influenciado pela inibição crônica pré-natal e neonatal da ECA e que esta impactaria a organização ontogênica do substrato neural de ratos adultos. Estes resultados podem ser confirmados por DOSTAL *et al.* (1991), pois em seus estudos detectou baixos níveis de quinaprilato (o maior metabólito farmacologicamente ativo de quinapril) no sangue fetal e no sangue neonatal, indicando a exposição da prole ao quinapril. Observou também que as concentrações de quinaprilato no leite foram 3-5% das concentrações plasmáticas, 3-5 horas após sua administração.

Portanto, os resultados obtidos da ingestão de leite, em filhotes de mães tratadas com captopril, sugerem que pode ocorrer uma influência de inibidores da ECA sobre o desenvolvimento ontogenético de sistemas neurais que participam do controle metabólico e energético dos indivíduos e estes resultados já foram observados logo após o nascimento.

Sabe-se que o SRA possui duas vias para a formação da ANG II: direta (ativação da renina renal) e indireta (vias alternativas). O captopril bloqueou a transformação de ANG I em ANG II através da ECA via ativação da renina renal. A presença de ANG II estimula a ingestão de líquidos, porém, como ela foi bloqueada por essa via principal, teria como resultado uma menor liberação de fluidos. Isto confirma o resultado encontrado no grupo captopril no início da lactação, quando comparado com os outros tratamentos.

Houve um aumento da ingestão de leite no 12º dia. Portanto, supõe-se que, como o leite foi a única fonte de alimento (fluidos e nutrientes) para esses filhotes e os mesmos estavam numa fase de desenvolvimento, o organismo exigiu uma maior ingestão de leite. Em decorrência dessa exigência pode ter havido a ativação da formação de ANG II pelas vias alternativas do SRA (quimase, CAGE, catepsina G, tonina, TPA).

### **6.1.3 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE ISOPROTERENOL SOBRE A INGESTÃO DE LEITE EM FILHOTES**

Os resultados mostraram, na figura 04, a diferença significativa no percentual de ingestão de leite em filhotes de mães tratadas com isoproterenol em relação ao grupo controle, indicando que esta droga alterou o equilíbrio hidroeletrolítico em alguma fase do desenvolvimento fetal. Ademais houve uma diminuição progressiva da ingestão além de ter sido o grupo com menor ingestão de leite.

Faz-se necessário lembrar que, segundo HAANWINCKEL *et al.* 1995, a amamentação provoca a liberação do hormônio OT que aumenta ANP no plasma em ratos. Esse aumento de ANP leva a uma menor ingestão de fluidos, atuando em contraste com a ANG II. Ainda, segundo citação de HAANWINCKEL *et al.* 1995, um antagonista OT injetado 15 minutos antes da mamada bloqueou completamente o aumento da ANP causados por sucção. Ou seja, o ato da sucção por si só leva ao aumento de ANP e, conseqüente, menor liberação de fluidos. Esses dados confirmam os resultados encontrados em nosso trabalho.

### **6.1.4 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE FUROSEMIDA SOBRE A INGESTÃO DE LEITE EM FILHOTES**

Na figura 05, os resultados mostraram que não houve diferença significativa na ingestão de leite em filhotes de mães tratadas com furosemida. Porém, observou-se que a ingestão foi elevada e crescente em relação aos outros grupos e nas diferentes fases da lactação. Sabe-se que essa droga ativa a liberação de renina renal que leva à formação de ANG II e, conseqüentemente, estimula a ingestão de líquidos, conforme FITZSIMONS (1972). Portanto, nossos dados estão de acordo com o descrito na literatura.

### **6.1.5 EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO CRÔNICA DE LOSARTAN SOBRE A INGESTÃO DE LEITE EM FILHOTES**

Não foi possível obter dados consistentes para avaliar a ingestão de leite em filhotes de mães tratadas com losartan, pois a maioria dos animais morreu antes de completar a fase final de lactação.

## **6.2 AVALIAÇÕES BASAIS**

### **6.2.1 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE ÁGUA, NO PROTOCOLO BASAL, DURANTE A VIDA ADULTA**

Na figura 06, durante o protocolo basal, o percentual de ingestão de água do grupo captopril não foi significativo em relação ao grupo controle. Nossos dados estão de acordo com o observado por MECAWI *et al.* (2009), que investigou a influência do captopril (um inibidor da enzima conversora da angiotensina) no tratamento de ratas durante a gestação e lactação,

sobre o equilíbrio hidroeletrolítico, particularmente sobre a sede e apetite por sódio em filhotes machos adultos, e não observou alterações significativas nos parâmetros básicos hidroeletrolíticos (ingestão de água).

O percentual da ingestão de água em filhotes de mães tratadas com isoproterenol e com furosemida não foi significativo em relação ao grupo controle. Sugere-se que o uso de inibidor da ECA, de betabloqueadores e de potentes diuréticos da alça no período neonatal, apesar da suposta supra-regulação do sistema angiotensinérgico e alteração na programação hidroeletrolítica do indivíduo adulto, não altera de forma significativa a ingestão de água no protocolo basal.

### **6.2.2 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE NaCl (1,8% ou 0,3M) , NO PROTOCOLO BASAL, DURANTE A VIDA ADULTA**

Conforme visto na figura 07, durante o protocolo basal de ingestão, não foi observada diferença significativa no percentual de ingestão de salina (0,3M) em filhotes de mães tratadas com captopril em relação ao grupo controle. Nossos dados corroboram com os achados de MECAWI *et al.* (2009) que em seus estudos em ratos machos adultos tratados com captopril perinatal não observou alterações significativas nos parâmetros básicos hidroeletrolíticos de ingestão de NaCl 0,3M em relação ao controle.

Nossos resultados confirmam a hipótese formulada por DENTON *et al.* (1999) de que, em camundongos, o aumento da ingestão de sódio causada por ACTH não é alterada pelo tratamento com captopril. Confirmam também a observação feita por KUTA *et al.* (1984), de que a ingestão de sódio induzida por estresse é bloqueada por captopril, mas a induzida pela presença de ACTH não é, sugerindo que o estresse induzido de ANG II precede o aumento da ACTH. Ou seja, o uso do captopril perinatal não bloqueou a ingestão de salina na idade adulta.

Nós embasamos essas hipóteses com o raciocínio de que o trabalho de parto pode ter grande influência na liberação de ACTH. Sabe-se que o parto depende tanto da secreção de ocitocina quanto da produção de prostaglandinas, porque sem estas não haverá a adequada dilatação do colo do útero e, conseqüentemente, o parto não irá progredir normalmente. Não são bem conhecidos os fatores desencadeadores do trabalho de parto, mas sabe-se que quando o hipotálamo fetal alcança certo grau de maturação, estimula a hipófise fetal a liberar hormônio adrenocorticotróico (ACTH). Agindo sobre a adrenal do feto, esse hormônio aumenta a secreção do cortisol e outros hormônios que estimulam a placenta a secretar prostaglandinas, que promovem contrações da musculatura lisa do útero. Alguma alteração no hipotálamo fetal pode desencadear uma liberação anormal do ACTH e, conseqüentemente, de prostaglandina, até mesmo após o nascimento, agindo como se estivesse atuando em um processo inflamatório.

Para concluir nosso raciocínio, é importante salientar que o processo inflamatório se dá por mediadores químicos que, são compostos derivados do hospedeiro, secretados por células ativadas e servem para ativar ou aumentar aspectos específicos da inflamação. Eles originam-se no plasma de células, ligam-se a receptores específicos na célula alvo e podem estimular a liberação de outros mediadores pela célula-alvo, que são chamados de mediadores secundários. Estes atuam com mecanismos de amplificação ou neutralização da ação dos mediadores iniciais, eles também possuem vida curta, têm efeitos em um ou diversos alvos como também podem ter efeitos desiguais em diversas células e, podem ter possibilidade de causar efeitos danosos. Dentre esses mediadores pode-se citar as prostaglandinas.

A ingestão de salina no grupo tratado com isoproterenol foi menor em relação ao

grupo controle no tempo 1440 minutos, havendo, portanto, diferença significativa na ingestão (conforme Figura 5). Sabe-se que o isoproterenol atua causando uma diminuição da secreção de renina, com conseqüente diminuição de ANG II. Nossos dados estão de acordo com MACCANN *et al.* (2003). Segundo estes autores, ANG II e ANP desempenham papéis opostos no controle da ingestão de água e sal, com ANG II promovendo o consumo de ambos e ANP inibindo o consumo de ambos. No nosso caso, como ocorreu inibição da ingestão, estando, portanto, é provável que o ANP esteja implicado.

O CRF está envolvido na iniciação das respostas fisiológicas e comportamentais ao estresse. A sua presença é esperada para aumentar a ingestão de sódio devido à sua influência estimulante sobre a secreção de ACTH (WEISINGER *et al.*, 1980) ou atividade do SNS (BOURJEILI *et al.*, 1995; THUNHORST *et al.*, 1996). Porém, no uso do isoproterenol supõe-se que houve influência inibitória do CRF / UCN. Isto pode ter se dado pela influência do CRF em atividade do sistema nervoso simpático, como a secreção de OT (BRUHN *et al.* 1986; OLSON *et al.*, 1991).

Sabe-se que existe uma inter-relação nos papéis desempenhados pela OT, ANP e óxido nítrico no sistema cardiovascular e rim. Achados de FAVARETTO *et al.* 1997 e de GUTKOWSKA *et al.* (1997) levaram à hipótese de que a OT evoca liberação de ANP a partir do coração através de uma ação sobre supostos receptores de OT (OTR). OTR encontrados em coração de ratos parecem ser idênticos aos dos outros órgãos, como útero e hipotálamo de ratos, indicando uma estreita relação estrutural (GUTKOWSKA *et al.*, 1997). Portanto, esta é uma explicação plausível para a influência inibitória do CRF.

### **6.2.3 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE ALIMENTO NO PROTOCOLO BASAL**

Observa-se na figura 08, no protocolo basal de ingestão de alimento, o uso do captopril, isoproterenol e furosemida não influenciou de forma significativa a ingestão de ração. O grupo de mães tratadas com isoproterenol teve uma pequena diminuição em relação ao grupo controle e em relação aos outros tratamentos, mas não foi significativo.

Estes resultados sugerem a hipótese de que o uso de inibidor da ECA, de betabloqueadores e de potentes diuréticos da alça no período neonatal, apesar da suposta supra-regulação do sistema angiotensinérgico e alteração na programação metabólica energética do indivíduo adulto, não altera de forma significativa a ingestão basal de alimentos (ração).

### **6.2.4 AVALIAÇÃO DO VOLUME DE URINA (BASAL)**

Conforme figura 09, o volume de urina durante o protocolo basal, foi significativamente maior no grupo captopril em relação ao grupo controle e em relação aos outros tratamentos. Estes resultados postulam a hipótese de que o uso do captopril no período neonatal pode alterar o SRA e leva à uma desregulação do equilíbrio hidroeletrólítico do corpo animal com conseqüente perda de líquidos.

O volume de urina no grupo proveniente de mães tratadas com furosemida foi significativamente menor que no grupo controle. É importante lembrar que o SRA pode atuar também como um mecanismo de *feedback* negativo, utilizado pelo organismo como resposta ao uso prolongado da furosemida. Este sistema é ativado pela interferência do fármaco no transporte de NaCl a nível da mácula densa. Por sua vez, a estimulação do eixo renina-

angiotensina-aldosterona provoca o aumento da secreção do ADH, que irá entrar em ação diminuindo a diurese e fazendo o balanço negativo de água e eletrólitos. Sugere-se, portanto, que o uso crônico de furosemida altera a programação hidroeletrólítica com consequente diminuição do volume de urina, mesmo em condições basais. É possível também que o uso desta droga nas mães grávidas pode ter desencadeado o desenvolvimento de “resistência” à mesma.

## 6.3 AVALIAÇÕES SOB ESTÍMULOS

### 6.3.1 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE ÁGUA, NO PROTOCLO DE PRIVAÇÃO HÍDRICA, DURANTE A VIDA ADULTA

Na figura 10, no protocolo de privação hídrica, observou-se que houve diferença significativa entre grupos experimentais apenas no tempo 1440 minutos.

A ingestão de água do grupo captopril foi menor que a ingestão do grupo controle. Nossos achados estão de acordo com os estudos realizados por MECAWI *et al.* (2009), em que ratos do sexo masculino foram expostos ao captopril perinatal e mostraram atenuação significativa na ingestão de água induzida por desidratação extracelular. Isso sugere que houve influência do captopril ingerido pela mãe, pois, mesmo em um processo de privação em que o organismo necessita de água, a ingestão não foi conforme o esperado.

Sabe-se que a privação de água é um fator de estresse para o organismo e, segundo WEISINGER *et al.* (2004), um aumento de estresse relacionados com a atividade do SNS e de ANG II sistêmica também pode estimular a ingestão de sódio. Ainda, segundo STRICKER & SVED (2000) a diminuição do volume circulante devido à desidratação estimula a liberação da renina renal, o que resulta em aumento dos níveis circulantes de ANG II que age sobre receptores de ANG II no SFO estimulando a ingestão. Os nossos resultados estão de acordo com o descrito. Por isso, sugerimos que o uso de substâncias que bloqueiam a formação de ANG II, na fase neonatal, altera os resultados esperados em um processo de privação de água.

Nos nossos resultados houve um aumento da ingestão no grupo isoproterenol, porém, não significativo. Sabe-se, na literatura, que a atuação dessa droga se faz pelo aumento da renina, de ANG II e conseqüente aumento da ingestão de líquidos. Segundo ANDERSSON *et al.* (1978), isto sugere a possibilidade de que ANG II endógena, por vezes, pode atingir um nível que facilita a estimulação dos receptores justaventriculares sensíveis ao sódio e, desta maneira age indiretamente como um estímulo para a sede e liberação de ADH.

Além disso, distúrbios do equilíbrio hidromineral como a desidratação osmótica aumentam a densidade do receptor AT<sub>1</sub> de ANG II, e do receptor V<sub>1</sub> de AVP na região do SNC (SANVITTO *et al.* (1997); NAZARALI *et al.* (1987). Este padrão de distribuição dos receptores AT<sub>1</sub> sugere que angiotensina pode agir como neurotransmissor ou neuromodulador no SNC para influenciar a liberação de fluidos e eletrólitos, a homeostase, liberação do hormônio pituitário, e controle autonômico da função cardiovascular.

Para concluir, nossos achados sugerem que a privação de água pode exigir a ação da ANG II do cérebro (endógena) como um neurotransmissor ou neuromodulador no sexo masculino de ratos.

### **6.3.2 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE SÓDIO, NO PROTOCOLO DE PRIVAÇÃO HÍDRICA, DURANTE A VIDA ADULTA**

Conforme figura 11, na análise dos resultados de privação de sódio, pode-se observar que o aumento da ingestão de NaCl foi progressivo, sendo maior no tempo 1440 minutos em todos os tratamentos (ver Figura 11). Isto sugere que à medida que aumenta a desidratação extracelular, faz-se necessário a ingestão de substâncias que ativem o SRA. STRICKER *et al.* (1991) também demonstraram um aumento do apetite de NaCl em ratos adultos OVX submetidos à privação de sódio a longo prazo.

Observou-se que não houve significância dos grupos tratados em relação ao controle, mas todos tiveram uma ingestão elevada no período 1440 min. Ou seja, no caso do grupo tratado com furosemida, esta ativa o SRA que libera renina renal aumentando ANG II circulante. Nossos resultados são semelhantes ao encontrado por FITZSIMONS & STRICKER (1971), FITZSIMONS & WIRTH (1978), em que afirmaram que, ANG II circulante também contribui para o apetite de sódio em ratos. Além disso, DE LUCA *et al.* (2003) verificaram que há um aumento na atividade da renina plasmática e aumento da expressão de proteína c-fos do SFO de ratos submetidos a privação induzida de água e de sódio, mesmo após a reidratação, embora antes do consumo do sódio. Estes resultados são consistentes com um papel de ANG II circulante no controle do apetite ao sódio. O efeito da circulação ANG II sobre o apetite de sódio pode ocorrer por uma ação direta sobre as estruturas do SNC, fora da barreira hemato-encefálica, ou através da estimulação da secreção de mineralocorticóides, o que poderia agir na região medial ou basolateral da amígdala para induzir apetite por sódio (FINDLAY & EPSTEIN, 1980; ZHANG *et al.*, 1993).

Faz-se necessário salientar que, segundo CAMARGO *et al.* (2004), o apetite por sódio induzido por ANG II apresenta um tempo de latência maior do que a ingestão de água. Tem sido sugerido que um sistema ativo inibidor que pode existir restringe a ingestão de NaCl até que a água tenha sido reabastecida (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). Nossos resultados coincidiram com o descrito acima. A ingestão de sódio foi menor que a de água nos oito dos nove tempos avaliados (conforme Figura 11). Nossos resultados sugerem que o tratamento crônico das mães com substâncias que alteram o SRA causou profundas alterações na ingestão da prole adulta. Portanto, conclui-se também que essas substâncias atravessaram a barreira hemato-encefálica ainda na fase de desenvolvimento neuronal e causaram estas alterações de ingestão nos filhotes.

### **6.3.3 AVALIAÇÃO DO VOLUME DE URINA (PRIVAÇÃO)**

Na figura 12, no protocolo de privação, o volume de urina dos animais de mães tratadas com isoproterenol em relação ao grupo controle foi significativamente menor. Este resultado sugere que, a liberação de ANG II ativada pelo processo de privação foi bloqueada pelo uso neonatal do isoproterenol, diminuindo, portanto, os níveis de ANG II no organismo com conseqüente diminuição de urina. O uso de isoproterenol atua a nível de células da zona glomerular ativando a liberação de aldosterona que atuará diminuindo a taxa de excreção de sódio e conseqüente reabsorção.

O volume de urina dos animais de mães tratadas com furosemida foi significativamente menor em relação ao grupo controle. Este resultado sugere o organismo utiliza mecanismos de compensação que contrariem as perdas de volume e os desequilíbrios eletrolíticos, resultantes tanto do processo de desidratação (protocolo de privação) como da ação farmacológica da furosemida. Portanto, estes dados reafirmam o sugerido anteriormente

que, o uso crônico de furosemida pode, em determinadas situações, desencadear o desenvolvimento de “resistências” a estes fármacos. É provável que tenha ocorrido hipertrofia, a nível de néfrons, acompanhada por uma atividade aumentada da ATPase  $\text{Na}^+\text{-K}^+$ , o que permite que ocorra um aumento da reabsorção a esse nível, com consequente eliminação diminuída da urina.

#### **6.3.4 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE ÁGUA EM ANIMAIS DEPLETADOS DE SÓDIO DURANTE A VIDA ADULTA**

Pode-se observar na figura 13, na avaliação da ingestão de água, que durante o protocolo de depleção de sódio o tratamento teve efeito sobre o tempo e, portanto, foi considerada significativa a interação. O efeito do tratamento foi considerado extremamente significativo, inferindo que o uso dessas drogas, na fase neonatal, altera a programação ingestiva na fase adulta. Observou-se também que o tempo teve efeito sobre os resultados, destacando-se a extrema significância do tratamento 1440 minutos (conforme Figura 13).

SAKAI & EPSTEIN (1990) observaram em seus experimentos que animais intactos depletados de sódio tiveram um aumento nos níveis circulantes de ANG II, bem como nos níveis cerebrais de vários componentes do SRA. Além do que, segundo CHARRON *et al.* (2002), a depleção de sódio aumentou a expressão de RNAm do receptor AT1 na SFO, MnPO e PVN. A ANG II circulante contribui para a sede hipovolêmica e apetite ao sódio, agindo com os mineralocorticóides e outros hormônios (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004).

Nos nossos resultados observamos que a ingestão de água teve significância no tempo 1440 mim, em todos os grupos tratados. Isto sugere que o uso de captopril, isoproterenol e furosemida influenciaram a ingestão em animais depletados.

#### **6.3.5 AVALIAÇÃO DA INGESTÃO DE NaCl EM ANIMAIS DEPLETADOS DE SÓDIO DURANTE A VIDA ADULTA**

Em nossos resultados, na figura 14, observamos que a ingestão de NaCl (0,3M) foi maior no tempo 1440 minutos em todos os tratamentos, mas não significativo em relação ao grupo controle (ver Figura 14). Esse resultado é semelhante ao descrito por JAŁOWIEC (1974); WEISINGER *et al.* (1988), em que observaram um aumento na ingestão de sódio dentro de um dia após o tratamento com furosemida.

Os animais provenientes de mães tratadas com captopril tiveram um percentual de ingestão menor, mas não significativo, do que o do grupo controle, nos oito dos nove tempos testados. Nossos dados estão de acordo com o descrito por FITTS & THUNHORST (1996); MOE *et al.* (1984); THUNHORST & FITTS (1994); WEISINGER *et al.* (1988,1996) em ratos, WEISINGER *et al.*(1987a) em ovinos, BLAIR-WEST *et al.* (1988) em vacas, TARJAN *et al.*(1993) em coelhos, WEISINGER *et al.* (1990a) em camundongos e BLAIR-WEST *et al.* (1998) em babuínos. Segundo eles a administração periférica de inibidores da ECA, como captopril ou enalapril, diminuem a ingestão de sódio de animais depletados de sódio.

É importante salientar que a ingestão de sódio em animais depletados de sódio é mediada por ANG II gerada periféricamente, agindo em áreas do cérebro sem barreira hemato-encefálica (WEISINGER *et al.* 1996). Porém, como os inibidores da ECA podem facilmente atravessar a barreira sangue-cérebro, a contribuição relativa da ANG II periférica e central é comprometida. Ou seja, o captopril bloqueia a conversão de ANG I em ANG II,

consequentemente esta é liberada em menor quantidade e os animais, mesmo depletados de sódio não conseguem ingerir a quantidade que deveria ingerir normalmente.

Porém, no tempo 1440 minutos, a ingestão de salina no grupo tratado com captopril foi maior, mas não significativamente, do que no grupo controle. Nossos achados estão de acordo com FITTS & THUNHORST (1996); TARJAN *et al.* (1993); THUNHORST & FITTS (1994); WEISINGER *et al.*, 1987a, segundo o qual o apetite ao sódio em animais depletados de sódio tratados com captopril foi restaurado para o nível adequado quando foi administrado ANG II perifericamente. THUNHORST & FITTS (1994), SAKAI *et al.* (1990) demonstraram que a administração periférica de antagonistas do SRA bloqueiam completamente as ações de ANG II periférica, mas não as ações de ANG II central. Somente quando as ações da ANG II central estão bloqueadas é que o apetite ao sódio é diminuído ou abolido. Outra explicação provável é que ANG II pode ser formada no cérebro por outra via, diretamente do angiotensinogênio pela ação da catepsina G e tonina (LIPPOLDT, 1995), já que a formação de ANG II a partir da ANG I está impedido pelos inibidores da ECA (ONDETTI *et al.*, 1977; SONG & WHITE, 2002).

O grupo tratado com furosemida teve uma ingestão maior no tempo 1440 min, pois, conforme já explicitado em discussões anteriores, a furosemida ativa a liberação de renina renal, ANG II e conseqüente aumento de NaCl e, ainda segundo BEAUCHAMP *et al.* (1990) e LESHEM *et al.* (1999), a preferência aumentada por sódio ocorre em seres humanos posteriores à perda de sal.

Nossos resultados estão de acordo com os achados de WEISINGER *et al.* (1987) em ovinos, BLAIR-WEST *et al.* (1988) em vacas, FITTS & THUNHORST (1996); WEISINGER *et al.* (1996) em ratos, TARJAN *et al.* (1993) em coelhos e WEISINGER *et al.* (1990a) em camundongos, cujos trabalhos demonstraram que a administração periférica de ANG II aumentou a ingestão de sódio de animais depletados de sódio tratados com captopril. Nesta situação, o apetite por sódio foi diminuído no tratamento com captopril em relação aos outros, mas posteriormente foi aumentado ou restaurado o nível adequado de ANG II.

### **6.3.6 AVALIAÇÃO DO VOLUME DE URINA (PROTOCOLO DE DEPLEÇÃO)**

Na figura 15, no protocolo de depleção, o percentual do volume de urina de animais provenientes de mães tratadas com captopril, isoproterenol e furosemida foi significativamente menor em relação ao do grupo controle.

Segundo JAŁOWIEC (1974) e WEISINGER *et al.* (1988) o tratamento com furosemida faz ocorrer perda de sódio dentro de horas. Porém, nossos achados não evidenciaram uma perda de urina significativa num período de 24h. É possível que esse volume de urina aumente de forma significativa depois desse período, já que JAŁOWIEC, WEISINGER e seus respectivos colaboradores não especificaram o período exato desse aumento. Porém, é importante ressaltar que no protocolo de depleção a secreção de aldosterona é aumentada e atua sobre o rim para assegurar que a excreção urinária de sódio seja minimizada, maximizando, portanto, a reabsorção do mesmo.

Nossos achados se baseiam no fato de que ANG II administrada perifericamente pode estimular a ingestão de sódio sem aumentar excreção de sódio. Isto é especialmente evidente nos animais depletados tratados com captopril. Evidências sugerem que uma estrutura cerebral sem uma barreira hemato-encefálica como o SFO ou OVLT medeiam o apetite ao sódio induzido pela ANG II periférica (WEISINGER *et al.*, 2004). Então sugerimos que o uso

de substâncias como captopril, isoproterenol e furosemida realmente influenciam os níveis de ANG II circulante, sem necessariamente aumentar a liberação de sódio e conseqüente liberação de água.

#### **6.4 AVALIAÇÃO DA TAXA DE MORTALIDADE DURANTE O TRATAMENTO COM CAPTOPRIL, FUROSEMIDA, LOSARTAN E ISOPROTERENOL**

Nossos resultados da taxa de mortalidade com captopril demonstraram que o tratamento com inibidores da ECA não acarreta danos letais nos indivíduos mesmo durante o período crítico de maturação de diversos sistemas cerebrais.

Segundo COOPER (2008) o uso desses inibidores durante a gravidez é contraindicado devido à sua associação com um risco aumentado de fetopatias, como malformações do sistema cardiovascular, renal e nervoso central. Além disso, muitos estudos têm mostrado que a SRA tem efeitos duradouros sobre diferentes fases do desenvolvimento embrionário (SAAVEDRA, 1999; GRADY *et al.* 1991; GOMEZ *et al.* 1993). Porém, nossos achados vão de encontro aos resultados de COOPER (2008), pelo menos em parte. Ou seja, não obtivemos filhotes de mães tratadas com captopril com malformações. Algumas destas foram encontradas em filhotes de mães tratadas com losartan.

No tratamento com furosemida houve animais natimortos e apenas uma morte na fase adulta, sugerindo que o uso de um diurético da alça, cuja ação natriurética é potente, pode levar a alterações no desenvolvimento fetal resultando em morte.

O tratamento com losartan mostrou significativas alterações, tanto sistêmicas como comportamentais. Nossos resultados demonstraram que o uso de losartan (antagonista de ANG II a nível de receptores AT<sub>1</sub>) pelas mães grávidas, resultou em grandes conseqüências para os filhotes, dentre elas as fetopatias, associada em estudos anteriores ao uso de inibidores da ECA (COOPER, 2008).

Sabe-se que a maior parte das funções conhecidas da ANG II é atribuída à ligação com os receptores AT<sub>1</sub>. As reais funções dos receptores AT<sub>2</sub> ainda não foram totalmente elucidadas, mas é importante salientar que eles desempenham papel de importância no feto, em resposta à injúria (WEBER, 1999). Por isso, sugerimos que danos desencadeados por condições como o estresse durante a fase crítica do desenvolvimento são suficientemente capazes de expressar esses receptores e torná-los clinicamente relevantes, causando, por exemplo, malformações fetais.

No tratamento com isoproterenol não houve alterações significativas. Nossos resultados mostraram que o tratamento com betabloqueadores, assim como com os inibidores da ECA, não acarretam danos letais significativos nos descendentes.

## CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que o uso de captopril, isoproterenol e furosemida durante o período neonatal afeta o desenvolvimento ontogênico de sistemas cerebrais acarretando alterações:

- 1- Na homeostase hidroeletrolítica e na expressão comportamental de ingestão em ratos na vida adulta;
- 2- Na expressão de comportamentos motivados (ingestão de fluidos) em condições basais, sob jejum e sob estímulos específicos (privação hídrica, depleção de sódio), indicando a alteração do *set point* do apetite e da saciedade do rato adulto.
- 3- No apetite e na saciedade do neonato, refletido pela menor ingestão de leite nos animais do grupo tratado com isoproterenol, sugerindo a supra-regulação do SRA com subsequente alteração do equilíbrio hidroeletrolítico do corpo.
- 4- No índice de mortalidade em animais provenientes de mães tratadas com losartan;
- 5- No volume de urina durante a expressão de comportamentos basais e motivados (ingestão de fluidos) sob jejum e sob estímulos específicos (privação e depleção de sódio), indicando desregulação do SRAA.

Ademais, o uso de drogas que afetam o SRA durante o período neonatal, período crítico do desenvolvimento de diversos sistemas cerebrais, não ocasionou alterações:

- 1- Na ingestão de alimento em condições basais;
- 2- Na ingestão de água em condições basais;
- 3- Na ingestão de leite, nos animais dos grupos captopril, furosemida em relação ao grupo controle;
- 4- No índice de mortalidade em animais provenientes de mães tratadas com captopril; isoproterenol e furosemida.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAHAM, S. F., DENTON, D. D. MCKINLEY, M. J., WEISINGER, R. S. Effect of angiotensin antagonist Sar<sup>7</sup>-AlaO-angiotensin II on physiological thirst. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 4, p.243-247, 1976.

ANDERSSON, B. The effect of injections of hypertonic NaCl-solutions into different parts of the hypothalamus of goats. **Acta Physiol Scand**. v. 28, p. 188-201, 1953.

ANDERSSON, B. Thirst -and brain control of water balance. **Am Sci**. v. 59, p. 408-415, 1971.

ANDERSSON, B. Regulation of Water Intake. **Physiol Rev**, v. 58, n. 3, 1978.

ANTUNES-RODRIGUES J, MCCANN, S. M. Water, sodium chloride, and food intake induced by injections of cholinergic and adrenergic drugs into the third ventricle of the rat brain. **Proc Soc Exp Biol Med** v. 133, p. 1464-70, 1970.

ANTUNES-RODRIGUES, J., RAMALHO, M. J., REIS, L. C., MENANI, J. V., TURRIN, M. Q. A., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S. M. Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. **Proc Nat Acad Sci, USA**, 88: 2956-2960, 1991.

ANTUNES-RODRIGUES, J., MACHADO, B. H., ANDRADE, H. A., MAUAD, H., RAMALHO, M. J., REIS, L. C., SILVA-NETTO, C. R., FAVARETTO, A. L. V., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S. M. Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. **Proc Nat Acad Sci, USA**, 89: 6829-6831, 1992.

ANTUNES-RODRIGUES, J; DE CASTRO, M; ELIAS, L.L; VALENÇA, M.M; McCANN, S.M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 169-208, 2004.

BADAUË-PASSOS JR, D; VENTURA, R.R; FAVARETTO, A.L; GUTKOWSKA, J; MCCANN, S.M; ANTUNES-RODRIGUES, J. Effect of losartan on sodium appetite of hypothyroid rats subjected to water and sodium depletion and water, sodium and food deprivation. **Exp Physiol**, v. 86, n. 5, p. 621-8, 2001.

BALDISSERA, S., MENANI, J. V., SOTERO DOS SANTOS, L.F, FAVARETTO, A. L. V GUTKOWSKA, J., TURRIN, M. Q. A., MCCANN, S. M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Role of the hypothalamus in the control of atrial natriuretic peptide release. **Proc Nat Acad Sci, USA**, v. 86, p. 9621-9625, 1989.

BALTATU, O., LIPPOLDT, A., HANSSON, A., GANTEN, D., BADER, M. Local renin-angiotensin system in the pineal gland. **Brain Res**. v.54, p.237-242, 1998.

- BALTATU, O., LIPPOLDT, A., HANSSON, A., GANTEN, D., BADER, M. Local renin-angiotensin system in the pineal gland. **Brain Res.** v.54, p.237–242, 1998.
- BEAUCHAMP, G. K., BERTINO, M., BURKE, D., ENGELMAN, K. Experimental sodium depletion and salt taste in normal human volunteers. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 51, p. 881–889, 1990.
- BGOMEZ, R. A, TUFRO-MCREDDIE, A., EVERETT, A.D, PENTZ, E.S. Ontogeny of renin and AT1 receptor in the rat. **Pediatr Nephrol** .v.7, p. 635-638, 1993
- BLAIR-WEST, J. R., CAREY, K. D., DENTON, D. A., WEISINGER, R. S., SHADE, R. E. Evidence that brain angiotensin II is involved in both thirst and sodium appetite in baboons. **Am J Physiol**, v. 275, p. 1639–1646, 1998.
- BLAIR-WEST, J. R., DENTON, D. A., MCKINLEY, M. J., & WEISINGER, R. S. Angiotensin-related sodium appetite and thirst in cattle. **American Journal of Physiology**, v.255, p.205–R211, 1988.
- BOSLER, O., DESCARRIES, L. Monoamine innervation of the organum vasculosum laminae terminalis (OVLT): A high resolution radioautographic study in the rat. **J Comp Neurol**, vol. 272, p. 545-561, 1987.
- BOTTARI, S.P., OBERMULLER, N., BOGDAL, Y., ZAHS, K.R., DESCHEPPER, C.F., Characterization and distribution of angiotensin II binding sites in fetal and neonatal astrocytes from different rat brain regions. **Brain Res.** v.585, p.372–376, 1992.
- BOURJEILI, N., TURNER, M., STINNER, J., & ELY, D. Sympathetic nervous system influences salt appetite in four strains of rats. **Physiology and Behavior**, v.58, p.437–443, 1995.
- BRUHN, T. O., SUTTON, S. W., PLOTSKY, P. M., & VALE, W. W. Central administration of corticotropinreleasing factor modulates oxytocin secretion in the rat. **Endocrinology**, v. 119, p.1558–1563, 1986.
- BURNETT JR, J.C. Vasopeptidase inhibition: a new concept in blood pressure management. **J Hypertens** vol. 17, Suppl 1, p. 37-43, 1999.
- CAVALCANTE-LIMA , H.R; LIMA, H.R; COSTA E SOUSA, R.H; OLIVARES, E.L; CEDRAZ-MERCEZ, C.L; REIS, R.O; BADAUÊ-PASSOS Jr, D; DE-LUCA, W, Jr; MEDEIROS, M.A; CORTÊS, W.S; REIS, L.C. Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. **Neurosci Lett** v. 374, n. 1, p. 5-10, 2005.
- CAVALCANTE-LIMA, H.R; BADAUÊ-PASSOS Jr, D; DE-LUCA, W, Jr; LIMA, H.R; COSTA E SOUSA, R.H; OLIVARES, E.L; CEDRAZ-MERCEZ, C.L; REIS, R.O; MEDEIROS, M.A; CORTÊS, W.S; REIS, L.C. 2005a. Chronic excitotoxic lesion of dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. **Braz J Med Biol Res** v. 38, n. 11, p. 1669-75, 2005.
- CHAI, S.Y., MENDELSON, F.A.O., PAXINOS, G. Angiotensin converting enzyme in rat brain visualized by quantitative in vitro autoradiography. **Neuroscience** v.20, p.615-627,1987.

CHARRON, G., LAFOREST, S., GAGNON, C., DROLET, G., & MOUGINOT, D.. Acute sodium deficit triggers plasticity of the brain angiotensin type 1 receptors. **The FASEB Journal** v. 16, p.610–612, 2002.

CAMARGO, L. A., SAAD, W. A, DE LUCA L. A. JR, RENZI, A., SILVEIRA, J. E., MENANI, J. V. Synergist interaction between angiotensin II and DOCA on sodium and water balance in rats. **Physiol Behav**, v. 55, p. 423–427, 1994.

CELADA, P; CASANOVAS, J.M; PAEZ, X; ARTIGAS, F. Control of serotonergic neurons in the dorsal raphe nucleus by the lateral hypothalamus. **Brain Res**, v. 932, n. 1-2, p. 79-90, 2002.

CHEN, H.H., BURNETT JR, J.C. C-type natriuretic peptide: the endothelial component of the natriuretic peptide system. **J. Cardiovasc Pharmacol.** vol. 2, s. 3 p. 22-28, 1988.

CHENG, A., FRISHMAN, W.H. Use of angiotensin-converting enzyme inhibitors as monotherapy and in combination with diuretic and calcium channel blockers. **J Clin Pharmacol.** vol. 38, p. 477-91, 1998.

CHEN, K., CAREY, L.C., LIU, J., VALEGO, N.K., TATTER, S.B., ROSE, J.C. The effect of hypothalamo-pituitary disconnection on the renin–angiotensin system in the late-gestation fetal sheep. **Am. J. Physiol.** v.288, p.1279–1287, 2005.

COOPER, W.O. Clinical implications of increased congenital malformations after first trimester exposures to angiotensin-converting enzyme inhibitors. **J Cardiovasc Nurs.** Vol. 23, p: 20–24.

DE LUCA, L. A. JR, XU, Z., SCHOORLEMMER, G. H., THUNHORST, R. L., BELTZ, T. G., MENANI, J. V., JOHNSON, A. K. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol** v. 282, p. 552–559, 2002.

DENTON, D. A., BLAIR-WEST, J. R., MCBURNIE, M. I., MILLER, J. A., WEISINGER, R. S., WILLIAMS, R. M.. Effect of adrenocorticotrophic hormone on sodium appetite in mice. **American Journal of Physiology**, v.277, p.1033–1040, 1999.

DODIC, M., BAIRD, R., HANTZIS, V., KOUKOULAS, I., MORITZ, K., PEERS, A., WINTOUR, E.M. Organs/systems potentially involved in one model of programmed hypertension in sheep. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.** v. 28, p.952–956, 2001(a).

DODIC, M., HANTZIS, V., DUNCAN, J., REES, S., KOUKOULAS, I., JOHNSON, K., WINTOU, E.M., MORITZ, K., Programming effects of short prenatal exposure to cortisol. **FASEB J.** v.16, p.1017–1026, 2002(b).

DODIC, M., MORITZ, K., KOUKOULAS, I., WINTOUR, E.M., Programmed hypertension: kidney, brain or both? **Trends Endocrinol. Metab.** v.13, p.403–408, 2002(c).

DZAU, V.J., INGELFINGER, J., PRATT, R.E., ELLISON, K.E. Identification of renin and angiotensinogen messenger RNA sequences in mouse and rat brains. **Hypertension** v.8, p.544–548, 1986.

DZAU, V.J. Circulating versus local reninangiotensin system in cardiovascular homeostasis. **Circulation** **77**, parte 2, I4-I13, 1988.

EPSTEIN, A. N., AND N. J. KENNEY. Suppression of angiotensin-induced thirst by the E-prostaglandins. In: **Central Actions of Angiotensin and Related Hormones**, edited by J. P. Buckley and C. M. Ferrario. New York: Pergamon, p. 417-428, 1977.

FABIANI, M.E, JOHNSTON, C.I. Spectrum of use for the angiotensin-receptor blocking drugs. **Cur Hypert Rep I**, p. 394-401, 1999.

FAVARETTO, A. L. V. , BALLEJO, G. O., ALBUQUERQUE-ARAÚJO, W. I. C, GUTKOWSKA, J., ANTUNES-RODRIGUES, J. & MCCANN, S. M. (1997). Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. **Peptides**, vol. 18, p. 1377-1381.

FERREIRA, S. H. Angiotensin converting enzyme: history and relevance. **Semin Perinatol**, vol. 24, p. 7-10, 2000.

FINDLAY, A. L., EPSTEIN, A. N. Increased sodium intake is somehow induced in rats by intravenous angiotensin II. **Horm Behav.**, v. 14, p. 86–92, 1980.

FITTS, D. A., THUNHORST, R. L.. Rapid elicitation of salt appetite by an intravenous infusion of angiotensin II in rats. **Am J of Physiol.**, v. 270, p. 1092–1098, 1996.

FITZSIMONS, J. T., STRICKER, E. M. Sodium appetite and the reninangiotensin system. **Nat New Biol** v. 231, p. 58–60, 1971.

FITZSIMONS, J. T. Thirst. **Physiol Rev.** 52, p. 468-561, 1972.

FITZSIMONS, J. T. The renin-angiotensin system and drinking behaviour. In: **Progress in Brain Research. Hormones, Homeostasis and the Brain**, edited by W. H. Gispen, T. B. van Wimersma Greidanus, B. Bohus, and D. de Wied. Amsterdam: Elsevier, vol. 42, p. 215-233, 1975.

FITZSIMONS, J. T. The physiological basis of thirst. **Kidney Intern.** Vol. 10, p. 3-11, 1976.

FITZSIMONS, J. T., WIRTH, J. B. The renin-angiotensin system and sodium appetite. **J Physiol** v. 274, p. 63–80, 1978.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, v. 78, p. 583-686, 1998.

GAINER, J.V., MORROW, J.D., LOVELAND, A. et al. Effects of bradykinin-receptor blockade on the response to angiotensin-converting enzyme inhibitor in normotensive and hypertensive subjects. **N Engl J Med** 339: 1285-92, 1998.

GOMEZ, R.A, TUFRO-MCREDDIE, A., EVERETT, A.D., PENTZ, E.S. Ontogeny of renin and AT1 receptor in the rat. **Pediatr Nephrol** Vol. 7, p. 635–8, 1993.

GRADY, E.F., SECHI, L.A, GRIFFIN, C.A, SCHAMBELAN, M., KALINYAK, J.E. Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. **J Clin Invest**, vol. 88, p. 921-33, 1991.

GROSSMAN, S.P. A neuropharmacological analysis of hypothalamic and extrahypothalamic mechanisms concerned with the regulation of food and water intake. **Ann New York Acad Sci**, 157: 902-917, 1969.

GUTKOWSKA, J., JANKOWSKI, M., LAMBERT, C., MUKADDAM-DAHER, S., ZINGG, H. H. & MCCANN, S. M. Oxytocin releases atrial natriuretic peptide by combining with oxytocin receptors in the heart. **Proc Nat Acad Sci, USA**, vol. 94, p. 11704-11709. 1997.

GUTMAN, J. An extrarenal effect of hydrochlorothiazide. **Experientia** vol. 19, p. 544-545, 1963.

HAANWINCKEL, M. A., ELIAS, L. K., FAVARETTO, A.L.V, GUTKOWSKA, J., MCCANN, S. M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. **Proc Nat Acad Sci, USA**, 92:7902-7906, 1995.

HERMANN, K., RAIZADA, M.K., SUMNERS, C., PHILIPS, M.I. Presence of renin in primary neuronal and glial cells from rat brain. **Brain Res**. v.437, p.205–213, 1987.

HIROSE, S., YOKOSAWA, H., INAGAMI, T., WORKMAN, K.J. Renin and prorenin in hog brain: ubiquitous distribution and high concentration in pituitary and pineal. **Brain Res**. v.1, p.9–499, 1980.

IMBODEN, H., HARDING, J.W., HILGENFELDT, U., CELIO, M.R., FELIX, D. Localization of angiotensinogen in multiple cell types of rat brain. **Brain Res**. v.410, 74–77, 1987.

ITA CE, SINGHVI SM, HEALD AF, MIGDALOF BH. Distribution of captopril to foetuses and milk of rats. **Xenobiotica**, 1982 Oct;12(10):627-32.

JALOWIEC, J. E. Sodium appetite elicited by furosemide: Effects of differential dietary maintenance. **Behav Bio**, v. 10, p. 313–327, 1974.

JANKOWSKI, M., WANG, D., HAJJAR, F., MUKADDAM-DAHER, S., MCCANN, S. M., GUTKOWSKA, J. Oxytocin and its receptors are synthesized in the rat vasculature. **Proc Nat Acad Sci, USA**, 97: 6207-6211, 2000.

JOHNSTON, C.I. Franz Volhard lecture: renin-angiotensin system: a dual tissue and hormonal system for cardiovascular control. **J Hyperten** vol. 10 (Suppl 7), p. S13-S26, 1992.

KALINYAK, J.E., HOFFMAN, A.R., PERLMAN, A.J. Ontogeny of angiotensinogen mRNA and angiotensin II receptors in rat brain and liver. **J. Endocr. Invest**, v.14, p.647–653, 1991.

- KALKMAN, E.A.J., et al. Early captopril prevents myocardial infarction-induced hypertrophy but not angiogenesis. **Euro J Pharmacol**, n.369, p. 339-48, 1999.
- KLICKSTEIN, L.B., KAEMPFER, C.E., WINTROUB, B.U. The granulocyte–angiotensin system. Angiotensin I-converting activity of cathepsin G. **J. Biol. Chem.** v.257, p.15042–15046, 1982.
- KOSTIS, J.B. Angiotensin converting enzyme inhibitors. **I Pharmacol Am H Journal** vol. 6, p. 1580-8, 1998.
- KUTA, C. C., BRYANT, H. U., ZABIK, J. E., YIM, G. K. Stress, endogenous opioids and salt intake. **Appetite**, 5, 53–60. 1984.
- LAVOIE, J.L., CASSELL, M.D., GROSS, K.W., SIGMUND, C.D. Localization of rennin expressing cells in the brain, by use of a REN-eGFP transgenic model. **Physiol. Genomics** v.16, p.240–246, 2004.
- LEE, H.U., CAMPBELL, D.J., HABENER, J.F. Development expression of the angiotensinogen gene in rat embryos. **Endocrinology** v.121, p.1335–1342, 1987.
- LEKSELL, L. G. Influence of prostaglandin E, on cerebral mechanisms involved in the control of fluid balance, **Acta Physiol Stand.**, vol. 98, p. 85-93, 1976.
- LEONETTI, G., CUSPIDI, C. Choosing the right ACE inhibitor. A guide to selection. **Drugs** vol. 49, p. 516-35, 1995.
- LESHEM, M., MAROUN, M., DEL CANHO, S. Sodium depletion and maternal separation in the suckling rat increase its salt intake when adult. **Physiol Behav.**, v. 59, p. 199-204, 1996.
- LESHEM, M., ABUTBUL, A., EILON, R. Exercise increases the preference for salt in humans. **Appetite**, v. 32, p. 251–260, 1999.
- LEVIN, E.R., GARDNER, D.G., SAMSON, W.K. Natriuretic peptides. **N England J Med** v. 339, p. 321-8, 1988.
- LIPPOLDT, A., PAUL, M., FUXE, K., & GANTEN, D. The brain renin–angiotensin system: Molecular mechanisms of cell to cell interactions. **Clinical and Experimental Hypertension**, v.17, p.251–266, 1995.
- LYNCH, K.R., HAWELU-JOHNSON, C.L., GUYENET, P.G. Localization of brain angiotensinogen mRNA by hybridization histochemistry. **Mol. Brain Res** v.2, p.149–158, 1987.
- LORI A. DOSTAL, SANG-NAM KIM, JAMES L. SCHARDEIN, and JOHN A. ANDERSON. Fertility and Perinatal/Postnatal Studies in Rats with the Angiotensin-Converting Enzyme Inhibitor, Quinapril . **Toxicol. Sci.** v.17, p. 684-695, 1991.
- LUMBERS, E.R. Functions of the renin-angiotensin system during development. **Clin Exp Pharmacol Physiol** vol. 22, p. 499-505, 1995.

MAACK, T., SUZUKI, M., ALMEIDA, F.A, NUSSENZVEIG, D., SCARBOROUGH, R.M., MCENROE, G.A., LEWICKI, J.A. Physiological role of silent receptor of atrial natriuretic factor. **Sci.**, vol. 238, p. 675-8, 1987.

MAO, C., SHI, L., XU, F, ZHANG, L., XU, Z. Development of fetal brain renin–angiotensin system and hypertension programmed in fetal origins. **Progress in Neurobiology**. v. 87, p. 252–263, 2009.

MCCANN, S. M., GUTKOWSKA, J., ANTUNES-RODRIGUES. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Bra J Med Biol Res** vol. 36, p. 165-181, 2003.

McKINLEY, M.J; JOHNSON, A.K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 1-6, 2004.

MECAWI, A.S; ARAUJO,I.G; FONSECA,F.V; ALMEIDA-PEREIRA,G.; CÔRTEZ, W.S; ROCHA, F.F; REIS., L.C. Behavioural changes induced by angiotensin-converting enzyme inhibition during pregnancy and lactation in adult offspring rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v.35, 000–000, 2008.

MECAWI. A. S., LEPLETIER, A., FONSECA, F. V., ARAUJO, I. G., REIS, L. C. Oestrogenic influence on brain AT1 receptor signalling on the thirst and salt appetite in osmotically-stimulated and sodium-depleted female rats. **Exp Physiol**, v. 93, p. 1002-10, 2008.

MECAWI, AS, ARAUJO, IG, ROCHA, FF, Coimbra,T.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. AND REIS, LC. Ontogenetic role of angiotensin-converting enzyme in rats: Thirst and sodium appetite evaluation.**Physiology & Behavior** v. 99, 118-124, 2010.

MENDELSON, F.A., CHAI, S.Y., DUNBAR, M., In vitro autoradiographic localization of angiotensin-converting enzyme in rat brain using 125I-labelled MK351A. **J. Hypertens**. v. 2, p 41–44, 1984.

MOE, K. E., WEISS, M. L., EPSTEIN, A. N. Sodium appetite during captopril blockade of endogenous angiotensin II formation. *Am J Physiol* , v. 247, p. 356-65, 1984.

MOOSER, V., NUSSBERGER, J., JUILLERAT, L. et al. Reactive hyperreninemia is a major determinant of plasma angiotensin II during ACE inhibition. **J Cardiovasc Pharmacol** vol. 15, p. 276-82, 1990.

MORRIS, M., ALEXANDER, N. (1988). Baroreceptor influences on plasma atrial natriuretic peptide (ANP): sinoaortic denervation reduces basal levels and the response to an osmotic challenge. **Endocrinol**, 122: 373-375.

MUNGALL, B.A., SHINKEL, T.A., SERNIA, C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the fetal and neonatal rat brain. **Neuroscience** v.67, p.505–524, 1995.

NAZARALI, A. J., GUTKIND, J. S, AND SAAVEDRA, J. M. Regulation of angiotensin II binding sites in the subfornical organ and other rat brain nuclei after water deprivation. **Cell Mol Neurobiol** v. 7, p. 447–455, 1987.

NICOLAIDIS, S., FITZSIMONS, J. T. La dependance de la prise d'eau induite par l'angiotensine II envers la fonction vasomotrice cerebrale locale chez le rat. **Compt Rend Acad Sci.**, Ser. D 281, p. 1417-1420, 1975.

NICOLAIDIS, S., GALAVERNA, O., METZLER, C. H. Extracellular dehydration during pregnancy increases salt appetite of offspring. **Am J Physiol** v. 258, p. 281-83, 1990.

NUYT, A.M., LENKEI, Z., CORVOL, P., PALKOVITS, M., LLORENS-CORTES, C. Ontogeny of angiotensin II type 1 receptor mRNAs in fetal and neonatal rat brain. **J. Comp. Neurol.** v.440, p.192–203, 2001.

NUYT, A.M., LENKEI, Z., PALKOVITS, M., CORVOL, P., LLORENS-CORTES, C., Ontogeny of angiotensin II type 2 receptor mRNA expression in fetal and neonatal rat brain. **J. Comp. Neurol.** v.407, p.193–206, 1999.

OLSSON, K. Attenuation of dehydrative thirst by lowering of the CSF [Nat]. **Acta Physiol Stand** 94: 536-538, 1975.

OLSON, B. R., DRUTAROSKY, M. D., STRICKER, E. M., & VERBALIS, J. G.. Brain oxytocin receptors mediate corticotropin-releasing hormone- induced anorexia. **American Journal of Physiology**, v.260, p.448–452, 1991.

ONDETTI, M. A., RUBIN, B., & CUSHMAN, D. W. Design of specific inhibitors of angiotensin converting enzyme: A new class of orally active antihypertensive agents. **Science**, v.196, p.441–446, 1977.

PAUL, M. , MEHR, A.P., KREUTZ, R., Physiology of local renin–angiotensin systems. **Physiol. Rev.** v.86, p.747–803, 2006.

PAXINOS, G., WATSON, C. The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates. London: **Academic Press**, 1986.

PERILLAN, C; COSTALES, M; VIJANDE, M; ARGUELLES, J. Maternal RAS influence on the ontogeny of thirst. **Physiol Behav**, v. 92, n. 2007, p. 554-59, 2007.

RAMSAY, D. J., REID, I. A.. Some central mechanisms of thirst in the dog. **J Physiol.**, London, vol. 253, p. 517-525, 1975.

RAPOSO-COSTA, A. P., REIS, A. M. O Sistema Renina-Angiotensina em Ovário. **Arq. Bras. Endocrinol Metab.** v.44, 2000.

REIS, L.C; RAMALHO, M.J; ANTUNES-RODRIGUES, J. Central serotonergic modulation of drinking behavior induced by angiotensin II and carbachol in normally hydrated rats: effect of intracerebroventricular injection of MK-212. **Braz J Med Biol Res**, v. 23, n. 12, p. 1339-42, 1990.

REIS, L. C., RAMALHO, M. J., ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of the median raphe nucleus and central serotonergic pathways in the control of water electrolyte excretion. **Bra J Med Biol Res**, vol. 24, p. 847-854, 1991.

- REIS, L. C., RAMALHO, M. J., FAVARETO, A. L. V., GUTKOWSKA, J., MCCANN, S. M., ANTUNES-RODRIGUES, J. Participation of the ascending serotonergic system in the stimulation of atrial natriuretic peptide release. **Proc Natl Acad Sci USA** v. 91, p. 12022–12026, 1994.
- REIS, L.C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite. **An Acad Bras Cienc**, v. 79, n. 2, p. 261-83, 2007.
- RIBEIRO, J. M., FLORÊNCIO, L. F. Bloqueio farmacológico do sistema renina-angiotensina-aldosterona: inibição da enzima de conversão e do receptor AT<sub>1</sub>. **Rev Bras Hipertens**, v.7(3), p. 293-302,2000.
- ROGERSON, F.M., SCHLAWA, I., PAXINOS, G., CHAI, S.Y., MCKINLEY, M.J., MENDELSON, F.A. Localization of angiotensin converting enzyme by in vitro autoradiography in the rabbit brain. **J. Chem. Neuroanat.** v.8, p.227–243, 1995.
- ROSS, M.G., KULLAMA, L.K., CHAN, A.K., ERVIN, M.G. Central angiotensin II stimulation of ovine fetal swallowing. **J. Appl. Physiol.** v.76, p.1340–1345, 1994.
- SAAVEDRA, M.J. Brain and pituitary angiotensin. **Endocri. Rev.** v.13, p.329–380,1992.
- SAAVEDRA, J.M. Emerging features of brain angiotensin receptors. **Regul Pept**, vol. 85, p. 31-45, 1999.
- SAKAI, R. R., EPSTEIN, A. N. Dependence of adrenalectomy-induced sodium appetite on the action of angiotensin II in the brain of the rat. **Behav Neurosci**, v. 104, p. 167–176, 1990.
- SANVITTO, G. L., JOHREN, O., HAUSER, W., SAAVEDRA, J.M. Water deprivation upregulates ANG II AT<sub>1</sub> binding and mRNA in rat subfornical organ and anterior pituitary. **Am J Physiol Endocrinol Metab** v. 273, p. 156–163, 1997.
- SATO, M. A., YADA, M. M., & DE LUCA, L. A., JR. . Antagonism of the renin–angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. **Physiology and Behavior** ,v. 60, p.1099–1104, 1996.
- SCHELLING, P., MEYER, D., LOOS, H.E., SPECK, G., PHILLIPS, M.I., JOHNSON, A.K., GANTEN, D.,A micromethod for the measurement of renin in brain nuclei: its application in spontaneously hypertensive rats. **Neuropharmacology** v.1, p.435–463, 1982.
- SCHUTZ, S. , MOULLEC, J.M., LE, CORVOL, P., GASC, J.M. Early expression of all the components of the renin–angiotensin system in human development. **Am. J. Pathol.** v.149, p.2067–2079, 1996.
- SERNIA, C., ZENG, T., KERR, D., WYSE, B. Novel perspectives on pituitary and brain angiotensinogen. **Front. Neuroendocrinol.** v.18, p.174–208, 1997.
- SHI, L., HU, F., MORRISSEY, P., YAO, J., XU, Z. Intravenous angiotensin induces brain c-fos expression and vasopressin release in the near-term ovine fetus. **Am. J. Physiol.** v.285, p.1216–1222, 2003.

- SHI, L., GUERRA, C., YAO, J., XU, Z. Vasopressin mechanism-mediated pressor responses caused by central angiotensin II in the ovine fetus. **Pediatric Res.** v.56, p.756–762, 2004a.
- SHI, L., YAO, J., KOOS, B.J., XU, Z. Induced fetal depressor or pressor responses associated with c-fos by intravenous or intracerebroventricular losartan. **Dev. Brain Res.** v.153, p.53–60, 2004b.
- SHI, L., YAO, J., STEWART, L., XU, Z. Brain c-fos expression and pressor responses after i.v. or i.c.v. angiotensin in the nearterm ovine fetus. **Neuroscience** v.126, p.979–987, 2004c.
- SICA, D. A., GEHR, T. W . B. ACE inhibitors: current consideration in their use. **J Clin Hypertens** vol. 1, p. 218-30, 1999.
- SONG, J. C., & WHITE, C. M. Clinical pharmacokinetics and selective pharmacodynamics of new angiotensin converting enzyme inhibitors: An update. **Clinical Pharmacokinetics**, v.41, p.207–224, 2002.
- SOOD, P.P., PANIGEL, M., WEGMANN, R. The existence of renin–angiotensinogen system in the rat fetal brain: I. Immunocytochemical localization of renin-like activity at the 19th day of gestation. **Cell Mol. Biol.** v. 33, p. 675–680, 1987a.
- SOOD, P.P., RICHOUX, J.P., PANIGEL, M., BOUHNİK, J., WEGMANN, R. The existence of renin–angiotensinogen system in the rat fetal brain. II. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the telencephalon and the diencephalons. **Cell Mol. Neurobiol.** v.33, p.681–689, 1987b.
- SOOD, P.P., PANIGE, M.L, WEGMANN, R. Co-existence of renin-like immunoreactivity in the rat maternal and fetal neocortex. **Neurochem. Res.** v.14, p.99, 1989. 502.
- SOOD, P.P., RICHOUX, J.P., PANIGEL, M., BOUHNİK, J., WEGMANN, R. Angiotensinogen in the developing rat fetal hindbrain and spinal cord from 18th to 20th day of gestation: an immunocytochemical study. **Neuroscience** v.37, p.517–522, 1990.
- SPECK, G., POULSEN, K., UNGER, T., RETTIG, R., BAYER, C., SCHO LKENS, B., GANTEN, D. In vivo activity of purified mouse brain renin. **Brain Res.** v.9, p.371–384, 1981.
- STEIN, J. M., LIND, R. W., JOHNSON, A. K. (1987). Central serotonergic influences on renal electrolyte and water excretion. **Neuropharmacol**, v. 26, p. 1685-1692.
- STONESTREET, B.S., CLIFFORD, S.P., KAREN, D.P., CHRISTOPHER, B.R., HELEN, F.C. Ontogeny of blood–brain barrier function in ovine fetuses, lambs, and adults. **Am. J. Physiol.** v.271, p.1594–1601, 1996
- STRICKER, E. M. Inhibition of thirst in rats following hypovolemia and/or caval ligation. **Physiology and Behavior**, v.6, p.293–298, 1971.
- STRICKER, E. M., SVED, A. F. Thirst. **Nutrition** v. 16, p. 821–826, 2000.

- STRITTMATTER, S.M., LYNCH, D.R., SNYDER, S.H. Differential ontogeny of rat brain peptidases. Prenatal expression of enkephalin convertase and postnatal development of angiotensin-converting enzyme. **Brain Res.** vol. 394, p. 207–15, 1986.
- SUMITANI, M., JULIANO, L., BERALDO, W.T., PESQUERO, J.L. Distribution of toninand kallikrein-like activities in rat brain. **Brain Res.** v.769, p.152–157, 1997.
- TANAKA, J; USHIGOME, A; HORI, K; NOMURA, M. Responses of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats. **Brain Res Bull**, v. 45, n. 3, p. 315-18, 1998.
- TANAKA, J; OKUMURA, T; SAKAMAKI, K; MIYAKUBO, H. Activation of serotonergic pathways from the midbrain raphe system to the subfornical organ by hemorrhage in the rat. **Exp Neurol**, v. 169, n. 1, p. 156-62, 2001.
- TANAKA, J; HAYASHI, Y; YAMATO, K; MIYAKUBO, H; NOMURA, M. Involvement of serotonergic systems in the lateral parabrachial nucleus in sodium and water intake: a microdialysis study in the rat. **Neurosci Lett**, v. 357, n. 1, p. 41-44, 2004.
- TARJAN, E., FERRARO, T., MAY, C., WEISINGER, R. S. Converting enzyme inhibition in rabbits: Effects on sodium and water intake/excretion and blood pressure. **Physiol Behav** v. 53, p. 291–299, 1993.
- TESTA, M.A., Anderson, R.B., Nackley, J.F., Hollenberg, N.K. Quality of life and antihypertensive therapy in men. A comparison of captopril with enalapril. The Quality-of-Life Hypertension Study Group. **N Engl J Med**, v. 328, p. 907–13, 1993.
- THOMAS, W.G., SERNIA, C. Immunocytochemical localization of angiotensinogen in the rat brain. **Neuroscience** v.25, p.319–341, 1988.
- THUNHORST, R. L., KIRBY, R. F., & JOHNSON, A. K.. Role of renal nerves in sodium depletion-induced salt appetite. **American Journal of Physiology**, v.271, p.806–812, 1996.
- THUNHORST, R. L., & FITTS, D. A. Peripheral angiotensin causes salt appetite in rats. **American Journal of Physiology**, v. 267, p.171–177, 1994.
- TILLEY, L. P., GOODWIN, J. K. Manual de Cardiologia para cães e gatos. São Paulo, Ed. Roca, 3 ed., 2002.
- TSUTSUMI, K., STROMBERG, C., VISWANATHAN, M., SAAVEDRA, J.M., Angiotensin-II receptor subtypes in fetal tissue of the rat: autoradiography, guanine nucleotide sensitivity, and association with phosphoinositide hydrolysis. **Endocrinology** v.129, p.1075–1082, 1991a.
- TSUTSUMI, K., VISWANATHAN, M., STROMBERG, C., SAAVEDRA, J.M., Type-1 and type-2 angiotensin II receptors in fetal rat brain. **Eur. J. Pharmacol** v.198, p.89–92, 1991b.
- TSUTSUMI, K., SELTZER, A., SAAVEDRA, J.M. Angiotensin II receptor subtypes and angiotensin-converting enzyme in the fetal rat brain. **Brain Res.** v.631, 12–220,1993.

URATA, H., NISHIMURA, H., GANTEN, D. Mechanisms of angiotensin II formation in humans. **Eur Heart J** vol. 16 (Suppl N), p. 79-85, 1995.

URATA, H., NISHIMURA, H., GANTEN, D., ARAKAWA, K. Angiotensin-converting enzyme-independent pathways of angiotensin II formation in human tissues and cardiovascular diseases. **Blood Press** vol. 2 (Suppl), p. 22-8, 1996a.

URATA, H., NISHIMURA, H., GANTEN, D. Chymase-dependent angiotensin II forming system in humans. **Am J Hypertens**. Vol. 9, p. 277-84, 1996b.

VAN KATS, J.P, DANSER, A.H., van Meegan JR, et al. Angiotensin production by the heart: a quantitative study in pigs with the use of radiolabeled angiotensin infusions. **Circulation** vol. 98, p. 73-81, 1998.

VILA-PORCILE, E., CORVOL, P. Angiotensinogen, prorenin, and renin are colocalized in the secretory granules of all glandular cells of the rat anterior pituitary: an immunoultrastructural study. **J. Histochem. Cytochem.** v.46, p.301–311, 1998.

WEBER, M. Emerging treatments for hypertension: potential role for vasoceptidade inhibition. **Am J Hypertens**, vol 12, p.139S-147S, 1999a.

WEBER, M. Interrupting the renin-angiotensin system: the role of angiotensin-converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonist in the treatment of hypertension. **Am J Hypertens** 12 (Suppl 1), p. 189-94, 1999b.

WEISINGER, R. S., BLAIR-WEST, J. R., DENTON, D. A., MCBURNIE, M., ONG, F., TARJAN, E. ET AL. Effect of angiotensin-converting enzyme inhibitor on salt appetite and thirst of BALB/c mice. **Am J Physiol**, v. 259, p. 736–740. 1990.

WEISINGER, R. S., BLAIR-WEST, J. R., BURNS, P., DENTON, D. A., MCKINLEY, M. J., TARJAN, E. The role of angiotensin II in ingestive behaviour: A brief review of angiotensin II, thirst and Na appetite. **Regulatory Peptides**, v. 66, p. 73–81, 1996.

WEISINGER, R. S., BLAIR-WEST, J.R., BURNS, P., CHEN, N., WEISINGER, H. S..Handbook of Behavioral Neurobiology . **Plenum Publishers**. 2 Ed., v 14 , p.547-575, 2004

WEISINGER, R. S., COGHLAN, J. P., DENTON, D. A., FAN, J. S., HATZIKOSTAS, S., MCKINLEY, M. J. *et al.* ACTH-elicited sodium appetite in sheep. **American Journal of Physiology**, v.239, p.45–50, 1980.

WEISINGER, R. S., DENTON, D. A., DI NICOLANTONIO, R., MCKINLEY, M. J., MULLER, A. F., TARJAN, E. Role of angiotensin in sodium appetite of sodium-deplete sheep. **Am J Physiol.**, v. 253, p. 482–488, 1987.

WEISINGER, R. S., DENTON, D. A., DI NICOLANTONIO, R., MCKINLEY, M. J. The effect of captopril or enalaprilic acid on the Na appetite of Na- deplete rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 15, p. 55–65, 1988.

- WEISINGER, R. S., DENTON, D. A., MCKINLEY, M. J., MULLER, A. F., & TARJAN, E. Cerebrospinal fluid sodium concentration and salt appetite. **Brain Research**, v.326, p.95–105. 1985 (a).
- WEISINGER, R. S., DENTON, D. A., MCKINLEY, M. J., NELSON, J. F. Dehydration-induced sodium appetite in rats. **Physiol Behav**, v. 34, p. 45–50, 1985 (b).
- WIRTH, J.B; EPSTEIN, A.N. Ontogeny of thirst in infant rat. **Am J Physiol**, v. 230, n. 1, p. 188-98, 1976.
- WHITING, P., NAVA, S., MOZLEY, L., EASTHAM, H., POAT, J. Expression of angiotensin converting enzyme mRNA in rat brain. **Mol. Brain Res.** v.11, p.93–96, 1991
- WOLF, G. Angiotensin II and tubular development. **Nephrol Dial Transplant.** Vol. 17 (Suppl. 9), 48–51, 2002.
- WONG, J., PATEL, R.A., KOWEY, P.R. The clinical use of angiotensin-converting enzyme inhibitors. **Prog Cardiovasc Dis.** vol. 47, p. 116–30, 2004.
- WOOD, R. J., ROLLS, B. J., RAMSAY, D. J. Drinking following intracarotid infusions of hypertonic solutions in dogs. **Am J Physiol.** vol. 232, p. R88-R92, 1977.
- XU, Z., GLENDA, C., DAY, L., YAO, J., ROSS, M.G. Central angiotensin induction of fetal brain c-fos expression and swallowing activity. **Am. J. Physiol.** v.280, p.1837–1843, 2001
- XU, Z., SHI, L., HU, F., WHITE, R., STEWART, L., YAO, J. In utero development of central ANG-stimulated pressor response and hypothalamic fos expression. **Brain Res.** v.145, p.169–176, 2003.
- XU, Z., SHI, L., YAO, J. Central angiotensin II induced pressor responses and neural activity in utero and hypothalamic angiotensin receptors in preterm ovine fetus. **Am. J. Physiol.** v. 286, p.1507–1514, 2004
- XU, Z., HU, F., SHI, L., SUN, W., WU, J., MORRUSSEY, P., YAO, J. Central angiotensin mediated vasopressin release and activation of hypothalamic neurons in younger fetus at pre-term. **Peptides** v.26, p. 307–314, 2005.
- YANG, G., SIGMUND, C.D. Developmental expression of human angiotensinogen in transgenic mice. **Am. J. Physiol.** v.274, p.932–939, 1998.
- ZHANG, D. M., EPSTEIN, A. N., SCHULKIN, J. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. **Brain Res** v. 600, p. 20–26, 1993.
- ZOU, L.X., IMIG, J.D., HYMEL, A, NAVAR, L.G. Renal uptake of circulating angiotensin II in Val5-angiotensin II infused rats is mediated by AT1 receptor. **Am J Hypertens** vol. 11, p. 570-8, 1998.