UFRRJ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

TESE

AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS INGESTIVAS, ELETROLÍTICAS E CARDIOVASCULARES EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A PROTOCOLOS INDUTORES OU INIBIDORES DA SEDE E APETITE POR SÓDIO

IRACEMA GOMES DE ARAUJO

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

AVALIAÇÃO DAS RESPOSTAS INGESTIVAS, ELETROLÍTICAS E CARDIOVASCULARES EM RATOS WISTAR SUBMETIDOS A PROTOCOLOS INDUTORES OU INIBIDORES DA SEDE E APETITE POR SÓDIO

IRACEMA GOMES DE ARAUJO

Sob a Orientação do
Prof Dr Luís Carlos Reis

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor** em Ciências Fisiológicas, no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração em Fisiologia

Seropédica, RJ
2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Araujo, Iracema Gomes de , 1983-
Aa Avaliação das respostas ingestivas, eletrolíticas e cardiovasculares em ratos Wistar submetidos a protocolos indutores ou inibidores da sede e apetite por sódio / Iracema Gomes de Araujo. - 2017.
89 f.: il.

Orientador: Luís Carlos Reis. Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, 2017.

1. estradiol. 2. sobrecarga salina. 3. FuroCap. 4. sede. 5. apetite por sódio. I. Reis, Luís Carlos, 1952 , orient. II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

IRACEMA GOMES DE ARAUJO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor **em Ciências Fisiológicas,** no Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas, área de Concentração em Fisiologia.

TESE APROVADA EM 19/ 04/ 2017
Banca Examinadora:
Prof Dr Luis Carlos Reis (Orientador – UFRRJ)
(Orientador)

gov.br Documento assinado digitalmente
LUIS CARLOS REIS
Data: 17/10/2025 13:18:08-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profª Drª Andrea Cláudia Freitas Ferreira (Membro Externo – UFRJ)

gov.br Documento assinado digitalmente
ANDREA CLAUDIA FREITAS FERREIRA
Data: 20/10/2025 13:49:25-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof Dr Daniel Badauê Passos Júnior (Membro Externo – UFS)

gov.br Documento assinado digitalmente
DANIEL BADAUE PASSOS JUNIOR
Data: 17/10/2025 19:55:19-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof Dr Renato Rizo Ventura (Membro Externo – UNIFAL)

gov.br Documento assinado digitalmente
RENATO RIZO VENTURA
Data: 18/10/2025 01:13:07-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof Dr Wellington da Silva Côrtes (Membro Interno – UFRRJ)

gov.br Documento assinado digitalmente
WELLINGTON DA SILVA CORTES
Data: 17/10/2025 17:42:32-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Obs: Assinaturas atualizadas eletronicamente em outubro de 2025

Dedico este trabalho ao meu irmão Alexandre Araujo (*in memorian*), por todo o seu carinho e companheirismo e por tanto ter sonhado participar da conclusão de mais esta etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Sou grata a Deus por ser a minha força motriz, por me amparar nos momentos de queda e por me direcionar aos caminhos do recomeço, da humildade e da gratidão. À Ele, agradeço por todos os agradecimentos que tenho a fazer!

Sou grata por ter a oportunidade de ter o Mestre Luís Carlos Reis como orientador no sentido mais amplo da palavra, não apenas me direcionando no caminho da Ciência, mas também no caminho da humanidade com o próximo. Sou grata por tê-lo como um verdadeiro pai, com sensibilidade e empatia tamanha que aconselha, ajuda e corrige nos momentos adequados.

Sou grata à Sociedade Brasileira de Fisiologia pela oportunidade de realizar o doutorado no Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, pela UFRuralRJ. Sou grata pelo companheirismo do Coordenador do Programa Bruno Guimarães Marinho, e do Secretário do Programa Franklin Resende, que além de terem as suas responsabilidades com o Programa, não se eximem da empatia com os seus alunos. Sou grata pela amizade e cordialidade de todos os técnicos, em especial aos acolhedores "bom dia" do Ipojucan (Seu Juca) e aos cafés salvadores da Dione.

Sou grata pelos professores deste Departamento, onde iniciei a minha jornada em 2005 e com quem aprendi (e continuo aprendendo) tanto do ponto de vista científico quando das relações interpessoais, e pelos esforços dispendidos para elevar a qualidade do Programa. Em especial, sou grata ao Professor (e meu amigo de longa data) André Mecawi: pela realização do presente trabalho, por termos dividido tantos momentos de realizações e dificuldades, e que mesmo com o distanciamento inerente às circunstâncias da vida sei que a chama da nossa amizade permanece ali, acesa!

Sou grata aos queridos companheiros do grupo Piraquê, o grupo que de água e sal não tem nada, muito pelo contrário: é muito orgânico, tem muita fibra e é de uma parceria sem igual. Sou grata à todos aqueles do departamento que, direta ou indiretamente, torceram para a conclusão desta etapa.

Sou grata por ter a Raquel Nascimento como uma verdadeira Amiga, aquela que está disposta a ser presente nos momentos de alegrias e, quando nos momentos de dificuldade, tem uma sensibilidade aguçada para enxergar as suas falhas e te estender a mão para te ajudar.

Sou grata à pequena notável Lívia Monteiro, que tem um coração tão grande que emana bondade e carisma por onde passa.

Sou grata a todos os amigos cultivados até aqui e, principalmente, pelos que se fazem presentes, independente da distância e obrigações diárias.

Sou grata, imensamente grata, à minha família, o meu verdadeiro alicerce, à quem eu retribuo todas as minhas vitórias! Agradeço à minha mãe Sonia Araujo, por ser a minha melhor amiga, por ser a minha companheira, e por me ensinar que apesar das dificuldades, podemos atravessá-las com força de gigante e dignidade. Agradeço à minha madrinha Neusa Tripoli, a minha segunda mãe, por ser um exemplo de garra e parceria, e por me ensinar a nunca "deixar a peteca cair". Agradeço ao meu pai Alfredo Araujo, por nunca nos deixar faltar a oportunidade do estudo, e por me ensinar que nunca é tarde para a renovação. Agradeço ao meu irmão caçula, Alfredo Araujo Filho, por sua amizade sempre presente em meu coração, e por ser meu exemplo de dedicação e força de vontade. Agradeço aos meus irmãos Joana Araujo, Adriana Araujo, Wladimir Araujo, Ricardo Araujo e Maria Fátima Correia, por serem exemplos de união e perseverança em manter a família unida. Agradeço aos demais membros da minha família Araujo, pela torcida, parceria e pelo exemplo de que a "união faz a força".

Sou grata aos membros da banca Wellington Côrtes, Andrea Ferreira, Renato Ventura e Daniel Passos Júnior, por todas as contribuições feitas a este trabalho. Agradeço à CAPES, CNPq e FAPERJ pelas condições para a realização do presente projeto.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Talvez não tenhamos conseguido fazer o melhor, mas lutamos para que o melhor fosse feito.
Não somos o que deveríamos ser, não somos o que iremos ser...
mas graças à Deus, não somos o que éramos”
(Martin Luther King)

ARAUJO, Iracema Gomes de. **Avaliação das respostas ingestivas, eletrolíticas e cardiovasculares em ratos Wistar submetidos a protocolos indutores ou inibidores da sede e apetite por sódio.** 2017. 89p Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas, Fisiologia). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

O primeiro objetivo do presente trabalho foi verificar a influência do tratamento com estradiol em ratas ovariectomizadas, através do modelo de sobrecarga salina. Para tanto, ratas Wistar com aproximadamente 60 dias de idade foram ovariectomizadas (OVX), e submetidas ao tratamento com benzoato de estradiol (EB-OVX) ou veículo (OVX) ao longo de 14 dias consecutivos e, ao final deste período, foram submetidas ao paradigma de livre escolha, com acesso à água e salina hipotônica, isotônica ou hipertônica, a fim de avaliarmos a preferência por sódio. Verificamos que a preferência por sódio reduz no grupo OVX e EB-OVX quando com acesso à salina 0,3 M e, apesar de não observarmos modulação estrogênica neste caso, o grupo EB-OVX apresentou reduzida preferência por NaCl 1,8 %, quando comparados à salina isotônica. No modelo de sobrecarga salina (onde as fêmeas foram submetidas à 3 ou 15 dias consecutivos de acesso à ração normossódica e solução salina 0,3 M, como único fluido disponível), observamos que o estradiol atenuou a hipernatremia induzida por este protocolo, quando comparado ao respectivo grupo OVX, sem modular a natriurese. Apesar de o estradiol *per si* diminuir a pressão arterial sistólica e frequência cardíaca em condições basais, o esteroide apenas reverteu parcialmente a redução da frequência cardíaca mediada pelo estradiol. Por fim, verificamos que o estradiol atenuou e reverteu a redução nas concentrações plasmáticas de angiotensina II (ANG II) e peptídeo natriurético atrial (ANP), respectivamente, após 15 dias de sobrecarga salina quando comparado ao respectivo grupo controle. O segundo objetivo do trabalho foi estudar a influência de dieta hipossódica por 4 dias consecutivos em ratos submetidos à dois paradigmas: depleção aguda de sódio (através do modelo FuroCap) ou estimulação β-adrenérgica (através de Isoproterenol). Para tanto, ratos Wistar com aproximadamente 75 dias de idade foram acondicionados em gaiola metabólica e, ao final do período de adaptação, foram randomicamente divididos para receberem dieta hipossódica ou normossódica durante 4 dias consecutivos, com acesso *ad libitum* à água. O aumento na ingestão de fluidos induzido pelo FuroCap foi exacerbado pela dieta hipossódica, quando comparado ao respectivo controle. Sobre os parâmetros cardiovasculares, observamos que a dieta hipossódica potencializou a hipotensão e a taquicardia induzidos pela depleção aguda de sódio. Ainda, a dieta hipossódica atenuou o aumento nas concentrações plasmáticas de ocitocina e ANG II enquanto que exacerbou a redução nas concentrações plasmáticas de ANP. No que tange à estimulação β-adrenérgica, a dieta hipossódica também exacerbou o aumento na ingestão de água e de salina hipertônica induzidos pelo Isoproterenol quando comparado ao respectivo controle. Ao contrário do que ocorreu no protocolo FuroCap, a dieta hipossódica não modulou as alterações cardiovasculares induzidas pelo Isoproterenol. Ainda, atenuou o aumento nas concentrações de angiotensina II e peptídeo natriurético atrial induzidos pelo Isoproterenol. Em conjunto, podemos concluir que: i) o estradiol parece exercer um efeito atenuante sobre as consequências deletérias de uma dieta com elevado teor de sódio; e, ii) a dieta hipossódica potencializa os comportamentos ingestivos induzidos pela depleção aguda de sódio (FuroCap) e pela estimulação β-adrenérgica (Isoproterenol) mas atenua fatores neuroendócrinos influenciados por esses protocolos.

Palavras-chave: estradiol, sobrecarga salina, FuroCap, Isoproterenol, sede, apetite por sódio

ARAUJO, Iracema Gomes de. **Study of the ingestive, electrolytic and cardiovascular responses in Wistar rats submitted to dipsogenic challenge and induction or inhibition of sodium appetite.** 2017. 89p Thesis (Doctor in Physiological Sciences, Physiology). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

The first aim of the present study was to evaluate the influence of estradiol treatment on female Wistar rats submitted to sodium overload model. For the first purpose, female Wistar rats with approximately 60 days old were ovariectomized (OVX), and treated with estradiol benzoate (EB-OVX) or vehicle (OVX) over 14 consecutive days and, by the end of this period, the female rats were submitted to a free-choice paradigm, with free access to water and hypotonic, isotonic or hypertonic saline solution. When submitted to free-choice paradigm with water and 0.3 M NaCl, both OVX and EB-OVX groups exhibited a reduced sodium preference, and although we did not observe estrogenic modulation in this case, the EB-OVX group presented a reduced preference for 0.15M NaCl, when compared to isotonic saline. In the saline overload model (where OVX and EB-OVX group were submitted to normal sodium diet and 0.3 NaCl as only fluid) we observed that estradiol inhibited the hypernatremia induced by this protocol, when compared to the respective OVX group, without modulating natriuresis. Although estradiol *per se* reduced systolic blood pressure and heart rate at baseline, the steroid modulated only partially the estradiol-mediated heart rate reduction. Finally, we observed that estradiol attenuated and reversed the reduction in plasma concentrations of ANG II and ANP, respectively, after 15 days of saline overload when compared to the respective control group. The second goal of this study was to investigate the influence of low sodium diet on rats submitted to acute sodium depletion (FuroCap) and β-adrenergic stimulation (Isoproterenol). For this, male Wistar rats with approximately 75 days of age were conditioned in a metabolic cage for adaptation for 3 consecutive days, with normal feed, water and hypertonic saline solution *ad libitum*. At the end of the adaptation period, the animals were randomly divided to receive low or normal sodium diet during 4 consecutive days with *ad libitum* access to water. The increase in fluid intake induced by FuroCap was exacerbated by the hyposodic diet, when compared to the respective control. Regarding the cardiovascular parameters, we observed that the hyposodic diet potentiated hypotension and tachycardia induced by acute sodium depletion. Furthermore, the low sodium diet attenuated the increase in plasma concentrations of oxytocin and angiotensin II while exacerbating the reduction in plasma ANP concentrations. Regarding β-adrenergic stimulation, the low sodium diet also exacerbated the increase in hypertonic water and saline intake induced by Isoproterenol when compared to the respective control. In contrast to the acute sodium depletion protocol, the hyposodic diet did not modulate Isoproterenol-induced hypotension and reflex bradycardia. Furthermore, it attenuated the increase in angiotensin II and atrial natriuretic peptide concentrations induced by Isoproterenol. Taken together, we can conclude that: i) estradiol seems to exert an attenuating effect on the deleterious consequences of a high sodium diet; and ii) the low sodium diet potentiates ingestive behaviors induced by acute sodium depletion (FuroCap) and β-adrenergic stimulation (Isoproterenol) but attenuates neuroendocrine factors influenced by these protocols.

Key-words: estradiol, sodium overload, FuroCap, Isoproterenol, thirst, sodium appetite

LISTA DE ABREVIAÇÕES

ANG I	angiotensina I
ANG II	angiotensina II
ANOVA	Análise de Variância
ANP	peptídeo natriurético atrial (do inglês, *atrial natriuretic peptide*)
AP	área postrema
AT1	receptores para angiotensina II do tipo 1
AT2	receptores para angiotensina II do tipo 2
AVP	arginina-vasopressina
AVPV	região ânteroventral periventricular
AV3V	região anteroventral da parede do 3º ventrículo
BNST	núcleo leito da estria terminal (do inglês, *bed nucleus of stria terminalis*)
bpm	batimentos por minuto
CRH	hormônio liberador de corticotrofina (do inglês, *corticotropin release hormone*)
DNs	dieta normossódica
DHs	dieta hipossódica
EB	benzoato de estradiol (do inglês, *estradiol benzoate*)
ECA	enzima conversora de angiotensina
EDTA	ácido etilenodiamino tetra-acético (do inglês, *ethylenediamine tetraacetic acid*)
ENaC	canal de sódio epitelial
ENaC- α	subunidade α do canal de sódio epitelial
EPM	erro padrão da média
EVEC	expansão de volume extracelular
ER	receptores estrogênicos
ER β	receptores estrogênicos (do inglês, *estradiol receptors*) do tipo β
ER α	receptores estrogênicos (do inglês, *estradiol receptors*) do tipo α
E2	estrógenos ovarianos
FC	frequência cardíaca
FuroCap	administração simultânea de furosemida e captopril
icv	intracerebroventricular
ip	intraperitoneal
ir-Fos	imunorreatividade para Fos
LC	locus coeruleus
LHA	área hipotalâmica lateral (do inglês, *lateral hypothalamic area*)
LPBN	núcleo parabraquial lateral (do inglês, *lateral parabraquial nucleus*)
MnPO	núcleo preóptico mediano (do inglês, *median preoptic nucleus*)
NArc	núcleo arqueado
NOS	enzima óxido nítrico sintase
OCV's	órgãos circunventriculares
OT	ocitocina
OVLT	órgão vasculoso da lâmina terminal
OVX	ovariectomia, ovariectomizadas
PAD	pressão arterial diastólica
PAM	pressão arterial média
PAS	pressão arterial sistólica
PE	polietileno
PMSF	fluoreto de fenilmetilsulfonil (do inglês, *phenylmethylsulfonyl fluoride*)

PVN	núcleo paraventricular do hipotálamo (do inglês, *paraventricular nucleus*)
s.c.	subcutâneo
SFO	órgão subfornicial (do inglês, *subfornical organ*)
SNC	sistema nervoso central
SON	núcleo supraóptico do hipotálamo (do inglês, *supraoptic nucleus*)
SRA	sistema renina-angiotensina
TFA	ácido trifluoroacético
V_1a	receptores para vasopressina do tipo 1a
V_2	receptores para vasopressina do tipo 2

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação esquemática dos procedimentos experimentais 30

Figura 2: Ingestão basal de água (A), ingestão basal de fluidos (paradigma de livre escolha) (B) e preferência por sódio (C) em animais OVX e EB-OVX 32

Figura 3: Ingestão de salina hipertônica (como único fluido disponível) no modelo de sobrecarga salina em animais OVX e EB-OVX 33

Figura 4: Influência da sobrecarga salina nas concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANG II e ANP em ratas OVX e sobre influência estrogênica 36

.

Figura 5: Representação esquemática dos procedimentos experimentais 54

Figura 6: Influência da administração de FuroCap na ingestão de água (A) e NaCl 1,8 % (B) em animais previamente submetidos à dieta normossódica (DNs) ou hipossódica (DHs) por 4 dias consecutivos 57

Figura 7: Influência da dieta hipossódica (DHs) por 4 dias consecutivos na pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) de ratos Wistar 58

Figura 8: Influência da dieta hipossódica ou normossódica por 4 dias consecutivos na variação (Δ) da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) induzida pelo FuroCap 59

Figura 9: Influência da dieta hipossódica ou normossódica por 4 dias consecutivos nas concentrações hormonais de vasopressina (A), ocitocina (B), angiotensina II (C) e peptídeo natriurético atrial (D) em resposta à administração de FuroCap 60

Figura 10: Influência da administração de Isoproterenol na ingestão de água (A) e NaCl 1,8 % (B) em animais previamente submetidos à dieta normossódica (DNs) ou hipossódica (DHs) por 4 dias consecutivos 62

Figura 11: Influência da dieta hipossódica ou normossódica por 4 dias consecutivos na variação (Δ) da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) induzida pelo Isoproterenol 64

Figura 12: Influência da dieta hipossódica ou normossódica por 4 dias consecutivos nas concentrações hormonais de vasopressina (A), ocitocina (B), angiotensina II (C) e peptídeo natriurético atrial (D) em resposta à administração de Isoproterenol 65

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL 16
CAPÍTULO I: MODULAÇÃO ESTROGÊNICA EM RATOS SUBMETIDOS À SOBRECARGA SALINA: INFLUÊNCIAS NA NATREMIA E PERFIL HORMONAL 18
RESUMO 19
ABSTRACT 20
1 INTRODUÇÃO 21
1.1 Influência Estrogênica na Modulação Exercida do Sistema Renina Angiotensina Sobre a Regulação Hidroeletrolítica 21
1.2 Envolvimento do Estradiol Sobre os Peptídeos Neurohipofisários e Atriais Relacionados ao Balanço Hidroeletrolítico 22
1.3 Modelo de Sobrecarga Salina 23
2 OBJETIVOS 25
3 METODOLOGIA 26
3.1 Animais e Manutenção 26
3.2 Cirurgias 26
3.3 Procedimentos 26
3.4 Métodos de Análises 27
3.5 Protocolos Experimentais 28
3.6 Análise Estatística 29
4 RESULTADOS 31
4.1 Ingestão de Água e Solução Salina em Ratas OVX e EB-OVX, em Condição Basal ou de Sobrecarga Salina 31
4.2 Avaliação das Concentrações Plasmáticas e Urinárias de Proteína, Na^+ e K^+ em Ratas OVX e EB-OVX em Condição Basal ou de Sobrecarga Salina 33
4.3 Parâmetros Cardiovasculares em Condição Basal ou de Sobrecarga Salina sob Influência Estrogênica 35
4.4 Influência sobrecarga salina nas concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANG II e ANP em ratas OVX e EB-OVX. 35
5 DISCUSSÃO 37
6. CONCLUSÕES 43
CAPÍTULO II: INFLUÊNCIA DA DIETA HIPOSSÓDICA NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS, NEUROENDÓCRINAS E CARDIOVASCULARES EM RATOS SUBMETIDOS AOS PROTOCOLOS FUROCAP E ISOPROTERENOL 44
RESUMO 45
ABSTRACT 46
1 INTRODUÇÃO 47
1.1 Sistemas Neuroendócrinos que Influenciam a Sede e Apetite por Sódio. 48
1.2 Modelos Experimentais para o Estudo da Sede e Apetite por Sódio 49
2. OBJETIVOS 51
3. MATERIAIS E MÉTODOS 52
3.1 Animais e Manutenção 52
3.2 Cirurgia 52
3.3 Procedimentos 52
3.4 Métodos de Análises 53
3.5 Protocolo Experimental 54
3.6 Análise Estatística 55

4 RESULTADOS 56
4.1 Avaliação das Respostas Comportamentais, Cardiovasculares e Neuroendócrinas em Ratos Submetidos ao Protocolo FuroCap Modificado 56
4.2 Influência da Dieta Hipossódica sobre as Respostas Comportamentais, Cardiovasculares e Neuroendócrinas em Ratos Submetidos à Administração de Isoproterenol 61
5 DISCUSSÃO 66
6. CONCLUSÕES 71
CONSIDERAÇÕES FINAIS 72
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 73

INTRODUÇÃO GERAL

A regulação do volume e da osmolalidade dos líquidos corporais é fundamental para a sobrevivência dos organismos vivos, e tal regulação depende de mecanismos endócrinos, comportamentais e autonômicos que atuam de forma coordenada sob a modulação de uma complexa rede neural com o objetivo de controlar a ingestão, excreção e reabsorção renal de água e eletrólitos. O íon sódio (Na^+), como principal eletrólito do fluido extracelular, é o principal determinante da osmolalidade plasmática bem como do volume do fluido extracelular (ANDERSSON, 1978; MECAWI *et al.*, 2015).

A osmolalidade, volume e pressão do compartimento extracelular são normalmente mantidos dentro de estreitas janelas. Para tanto, pequenas alterações de volume / pressão ou osmolalidade são responsáveis pelo recrutamento e ativação de mecanismos específicos através de receptores de volume / pressão ou osmoreceptores / Na^+ - receptores, para a regulação da composição e volume dos líquidos corporais (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2013). Por sua vez, as informações provenientes de tais sensores, convergem para estruturas prosencefálicas localizadas na lâmina terminal: núcleo preóptico mediano (MnPO) e órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), que formam a região anteroventral da parede do 3º ventrículo (AV3V), e órgão subfornicial (SFO), sendo os dois últimos núcleos considerados órgãos circunventriculares (OCV's), por serem desprovidos de barreira hematoencefálica, o que também faz deles importantes sítios sensores da osmolalidade do líquido extracelular circulante (FRY & FERGUSON, 2007; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2013; MCKINLEY *et al.*, 2015). Nesse contexto, o AV3V (BISLEY *et al.*, 1996) e SFO (NODA, 2006; MATSUDA *et al.*, 2017) possuem células sensíveis às alterações na osmolalidade / concentrações de sódio plasmática ou do líquido cérebro – raquidiano (NODA & SAKUTA, 2013) que possuem conexões diretas com o núcleo paraventricular (PVN) e supraóptico (SON) do hipotálamo (WEISS & HATTON, 1990a), núcleos da rafe mesencefálica e locus coeruleus (LC) (SLY *et al.*, 1999). Por outro lado, estruturas do rombencéfalo como o núcleo do trato solitário (que recebe tanto informações viscerais quanto acerca de alterações no volume / pressão periféricos) e a área postrema (AP, um OCV) também enviam projeções [noradrenérgicas (WEISS & HATTON, 1990b) ou serotoninérgicas, via núcleo parabraquial lateral (LPBN) (MENANI *et al.*, 2014) para o PVN e para o SON. Adicionalmente, áreas límbicas integrativas (amígdala e núcleo leito da estria terminal, BNST) são implicadas no controle do balanço hidrossalino, enviando projeções tanto para o LPBN quanto para o núcleo do trato solitário (NTS) (MOGA *et al.*, 1989; ZARDETTO-SMITH *et al.*, 1989; ANDRADE-FRANZÉ *et al.*, 2010; 2015) ao passo que recebem aferências serotoninérgicas do LPBN e angiotensinérgicas do SFO (JOHNSON & THUNHORST, 1997; MENANI *et al.*, 2014).

Dessa forma, tal conjunto de complexas conexões parece ser crucial para modular as alterações hormonais, comportamentais e autonômicas necessárias para manter a homeostase dos fluidos corporais, tais como: i) indução da sede, apetite ao sódio ou ambos; ii) alterações na atividade autonômica; iii) ativação do sistema renina – angiotensina; e iv) secreção de vasopressina, ocitocina e, de peptídeo natriurético atrial.

Diversos modelos experimentais são utilizados para acessar os mecanismos através dos quais a regulação hidroeletrolítica ocorre nas mais diversas situações desafiadoras. A ingestão de água, assim como a sede, são continuamente estudadas através de vários protocolos experimentais como privação de água, sede induzida por Isoproterenol, estímulos osmóticos induzidos pela injeção de salina hipertônica e depleção de fluido extracelular induzida pela administração de fluido coloidosmótico (LEHR *et al.*, 1967; RETTIG *et al.*, 1981; SALISBURY & ROWLAND, 1990; FITZSIMONS, 1998; BADAUÊ-PASSOS *et al.*, 2001; DE-LUCA *et al.*, 2000; MECAWI *et al.*, 2008). Já a ingestão de sal e o apetite por

sódio podem ser induzidos através de protocolos de depleção de sódio, tais como após diálise peritoneal e protocolos de depleção de sódio aguda ou ao longo de 24 horas (FITTS & MASSON, 1989; FITZSIMONS, 1998; BADAUÊ-PASSOS *et al.*, 2001; FRANCHINI *et al.*, 2002; BADAUÊ-PASSOS *et al.*, 2003; MECAWI *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2009). Por outro lado, a influência de dieta com elevado teor de sódio pode ser estudada através de protocolos tanto com acesso à ração quanto à solução hipersódica, em protocolo conhecido como sobrecarga salina crônica, bem como através de injeção aguda de salina hipertônica (GODINO *et al.*, 2013; MOREIRA *et al.*, 2014). No presente trabalho, fizemos uso de três paradigmas distintos: sobrecarga salina (a fim de verificarmos as influências que o estradiol exerce sobre parâmetros ingestivos, cardiovasculares e neuroendócrinos em resposta à este protocolo) e, depleção aguda de sódio e estimulação β-adrenérgica (a fim de avaliarmos de que forma a inserção de dieta hipossódica durante 4 dias anteriores à realização desses protocolos alteraria as respostas ingestivas, cardiovasculares e neuroendócrinas).

CAPÍTULO I

MODULAÇÃO ESTROGÊNICA EM RATOS SUBMETIDOS À SOBRECARGA SALINA: INFLUÊNCIAS NA NATREMIA E PERFIL HORMONAL

RESUMO

A homeostase dos fluidos corporais é regulada principalmente pelo balanço entre a ingestão e a excreção de sódio (Na^+), funções que são fortemente moduladas pelos esteroides gonadais. Sabendo que o estradiol está implicado no balanço de sódio, o objetivo de nosso estudo foi avaliar as modulações exercidas pelo estradiol em ratas sob condição basal ou submetidas à sobrecarga salina. Para tanto, fêmeas Wistar foram ovariectomizadas (OVX) bilateralmente e, após 24 horas, foram randomicamente distribuídas em dois grupos, onde seriam submetidas à administrações diárias de benzoato de estradiol (EB-OVX, 10 µg/0.1 mL/animal, s.c.) ou veículo (OVX, 0.1 mL/animal, s.c.). Três dias após o início do tratamento, os animais foram acondicionados em gaiolas metabólicas para adaptação por 4 dias consecutivos e, ao final deste período, foram submetidos às avaliações em condição basal ou após sobrecarga salina. Em condições basais, ratas OVX e EB-OVX tiveram a ingestão de água ou preferência por sódio (através da livre escolha entre água e salina hipotônica, isotônica e hipertônica) avaliadas, assim como parâmetros cardiovasculares, concentrações plasmáticas e urinárias de de Na+ e K+ e concentrações plasmáticas de vasopressina, ocitocina, angiotensina II e peptídeo natriurético atrial. Outro grupo de animais OVX e EB-OVX foi submetido à sobrecarga salina, onde salina hipertônica (1,8%) foi oferecida aos animais como único fluido, ao longo de 3 dias consecutivos, de forma que os mesmos parâmetros acima mencionados foram mensurados. Não observamos modulação do estrógeno sobre a ingestão dos fluidos: i) quando o único fluido disponibilizado foi água, o estrógeno não modulou a sua ingestão basal; ii) a ingestão de solução salina pelo grupo OVX reduziu à medida que a concentração da solução oferecida aumentou, sendo tal comportamento não influenciado pelo tratamento com estradiol; e, iii) animais submetidos à sobrecarga salina apresentaram um aumento progressivo na ingestão de salina hipertônica (como único fluido disponível), sem modulação estrogênica. Além disso, apesar de o estrógeno não influenciar nos parâmetros eletrolíticos e neuroendócrinos, verificamos que o grupo EB-OVX apresentou uma redução na pressão arterial sistólica além de bradicardia, quando comparado ao grupo OVX. Por outro lado, o grupo OVX submetido à 3 e 15 dias de sobrecarga salina apresentou hipernatremia que foi revertida pelo tratamento com estradiol, enquanto que o aumento na natriurese não foi influenciado por tal esteroide. Adicionalmente, apesar de não influenciar no aumento da secreção de vasopressina e ocitocina em resposta à sobrecarga salina, o estrógeno reverteu a redução nas concentrações de angiotensina II e peptídeo natriurético atrial com 15 dias de desafio osmótico. Em conjunto, apesar de não observarmos modulação do estradiol nos comportamentos de ingestão, verificamos uma importante adaptação do sistema cardiovascular mediada pelo estrógeno. Ainda, o tratamento com estradiol promoveu alterações neuroendócrinas para aumentar a espoliação de sódio, além de induzir uma intrigante inibição da hipernatremia induzida pela sobrecarga salina. Desta forma, podemos sugerir que o tratamento com estradiol nessas condições ameniza os possíveis efeitos deletérios induzido por uma dieta com elevado conteúdo de sódio.

Palavras chave: estrógeno, natremia, sobrecarga salina, angiotensina II

ABSTRACT

Body fluids homeostasis is mainly regulated by sodium (Na^+) ingestion/excretion balance, which are strongly modulated by gonadal steroids. Since estrogen is controversially implicated on sodium balance, our aim in the present study was to evaluate the estrogen modulations on female rats under basal and salt-overload conditions. Female Wistar rats were bilaterally ovariectomized (OVX) and, 24 hours after, were randomly divided in two groups to receive either estradiol benzoate (E2-OVX, 10 µg/0.1 mL/animal, s.c.) or vehicle (OVX, 0.1 mL/animal, s.c.). Three days after estrogen or vehicle treatment beginning, the animals were placed in metabolic cages for adaptation and, 4 days after, two experimental protocols begun: i) basal water or water plus saline (0.075, 0.15 and 0.3 M NaCl) intake and preference were measured in OVX and E2-OVX rats and, with access to tap water as only fluid, cardiovascular parameters, plasma and urinary Na+ and K+ content and plasma vasopressin, oxytocin, angiotensin II and atrial natriuretic peptide concentrations were also evaluated; ii) salt-overload (0.3 M NaCl offered as only fluids) was continually performed in OVX and E2-OVX groups during 3 and the same parameters abovementioned were measured. We did not observe estrogen modulation on fluids ingestion: i) as only fluid offered, the estrogen did not affect the basal water ingestion; ii) the saline intake from OVX group reduced as the solution concentration was increased, and this behavior was not modulated by estrogen treatment; iii) OVX and EB-OVX presented progressively increase on the hypertonic saline ingestion under sodium overload protocol, with no modulations by estrogen. Also, besides the estrogen did not modulate electrolytic and neuroendocrine parameters in basal conditions, we observed that EB-OVX showed bradycardia and reduction on systolic arterial pressure, when compared to OVX group. On the other hand, sodium overload during 3 and 15 days induced hypernatremia in OVX rats, which was inhibited by estrogen treatment, in both periods, besides no influences on natriuresis had been observed. Additionally, estrogen inhibited the reduction on ANG II and ANP plasma concentrations 15 days after sodium overload beginning, with no changes on vasopressinergic and oxytocinergic responses. Taken together, besides we did not observe estrogen modulation on ingestive behaviors, we observed an important and positive cardiovascular effect induced by this steroid. Also, estrogen induced a neuroendocrine adaptation to enhance the sodium clearance as well as, as interesting inhibition in hypernatremia induced by sodium overload. Thus, we can suggest that the estradiol treatment attenuates the deleterious effects of a high sodium consumption.

Keywords: estrogen, natremia, sodium overload, angiotensin II

1 INTRODUÇÃO

O íon sódio representa o principal componente iônico envolvido com o controle do volume extracelular. Alterações no ajuste homeostático das concentrações plasmáticas de sódio e, consequentemente, no balanço dos fluidos corporais tem sido sugerido como os principais responsáveis pela hipertensão sensível ao sódio (MENETON *et al.,* 2005; KARPPANEN & MERVAALA, 2006). Uma complexa rede envolvendo sistemas endócrino, autônomo, renal e comportamental está interconectada com o objetivo de regular o conteúdo corporal de sódio e, consequentemente o volume extracelular e pressão arterial. Dentre as alterações comportamentais, o sistema nervoso central coordena o apetite e saciedade específicos por sódio, assim como os seus componentes motivacionais (DIBONA & KOPP 1997; JOHNSON & THUNHORST, 1997; FITZSIMONS 1998; Reis 2007; ANTUNES-RODRIGUES *et al.,* 2013; RUGINSK *et al.,* 2014). Por outro lado, tais respostas são moduladas por vários fatores como os esteroides gonadais por exemplo, com particular atenção para os estrógenos ovarianos (E2).

A demonstração de receptores estrogênicos (ER) em núcleos cerebrais que não possuem relação direta com a reprodução e / ou que são fundamentais para a manutenção dos fluidos corporais, sugere fortemente o papel deste hormônio na homeostase hidroeletrolítica (SOMPONPUN, 2007; SANTOLLO & DANIELS, 2015). Em ratos, receptores para estrógeno do tipo β (ER β) são expressos em neurônios magnocelulares secretores de arginina-vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) (SIMONIAN & HERBISON, 1997; SOMPONPUN & SLADEK, 2003;) e os ER do tipo α (ER α) estão extensivamente distribuídos em neurônios do prosencéfalo basal (SOMPONPUN *et al.,* 2004; VARGAS *et al.,* 2016), que possui os principais sítios cerebrais empenhados na defesa contra perturbações nos fluidos corporais (ANTUNES-RODRIGUES *et al.,* 2013; NODA & SAKUTA, 2013).

Nesse contexto, diversos autores descreveram a modulação estrogênica sobre os comportamentos de sede e apetite ao sódio. Sabe – se, por exemplo, que a administração *i.m.* aguda de estradiol reduz a ingestão espontânea (FINDLAY *et al.,* 1979; FITZSIMONS, 1998) ou induzida de água (KRAUSE *et al.,* 2003; GRAVES *et al.,* 2011; ARAUJO *et al.,* 2013; VILHENA-FRANCO *et al.,* 2016). Em relação ao apetite específico ao sódio, diversos trabalhos demonstraram que ratas ovariectomizadas exibem exagerada resposta natriorexigênica em comparação com intactas e ratos machos: ratas ovariectomizadas (OVX) expressam um elevado apetite por sódio quando comparado com fêmeas inteiras ou machos (STRICKER et. al. 1991; SCHEIDLER et. al. 1994; FITZSIMONS, 1998). Por outro lado, KENSICKI *et al.,* (2002) descreveram uma correlação positiva entre os níveis plasmáticos de estradiol e a ingestão diária de sal em ratas ovariectomizadas, enquanto que CHOW *et al.,* (1992) reportaram mudanças no consumo diário de sal por ratas OVX em idade adulta e STRICKER *et al.,* (1991) demonstraram um aumento no apetite ao sódio em ratas OVX depois de prolongado tempo de privação de sódio, que foi atenuado pela reposição com estrógeno, como descrito em outras condições natriorexigênicas (SCHEIDLER *et al.,*1994; FITZSIMONS, 1998).

1.1 Influência Estrogênica na Modulação Exercida pelo Sistema Renina Angiotensina Sobre a Regulação Hidroeletrolítica

As diversas evidências que demonstram o envolvimento dos esteroides ovarianos no balanço hidroeletrolítico implicam a modulação destes, principalmente o estradiol, sobre o Sistema renina angiotensina (SRA) (GALLAGHER *et al.,* 1999; KISLEY *et al.,* 1999a, b; KISLEY *et al.,* 2000; KENSICK *et al.,* 2002; SANTOLLO & DANIELS, 2015). Nesse contexto, sabe – se que a microinjeção de ANG II no MnPO induz ingestão de sal de forma

mais intensa em ratas intactas do que em ratas OVX (DE-ANGELIS *et al.*, 1996). Entretanto, trabalhos prévios demonstraram que o tratamento de ratas OVX com estrógenos diminui o *binding* de ANG II em sítios prosencefálicos relacionados com a deflagração da sede, apetite ao sódio e regulação da pressão arterial (JONKLAAS & BUGGY, 1984, 1985; FITZSIMONS, 1998; KISLEY *et al.*, 1999a,b), além de reduzir a ingestão de água e abolir a ingestão de sal (FREGLY & THRASHER, 1978; DO-VALE *et al.*, 1995; FITZSIMONS, 1998) e de atenuar a resposta pressórica induzida pela administração intracerebroventricular (icv) de ANG II (JONKLAAS & BUGGY, 1984; 1985; FITZSIMONS, 1998).

Adicionalmente, evidências de nosso laboratório mostraram pela primeira vez o envolvimento dos receptores AT1 na ingestão noturna basal de água e salina hipertônica em ratas OVX (MECAWI *et al.*, 2007). Demonstramos também através de diferentes paradigmas natriorexigênicos que a terapia estrogênica ou o bloqueio dos receptores AT1 cerebrais reduzem drasticamente as respostas comportamentais, particularmente de ingestão de salina hipertônica (MECAWI *et al.*, 2008).

Além disso, trabalhos demonstraram que a reposição estrogênica atenua a ingestão de água induzida pela angiotensina II via ativação de projeções específicas do SFO para o MnPO (TANAKA *et al.*, 2003) e diminui a ingestão de água evocada pela ativação de vias angiotensinérgicas provenientes da área hipotalâmica lateral (LHA) para o SFO (FUJISAWA *et al.*, 2001). Recentemente, foi demonstrado que a modulação inibitória exercida pelo estrógeno sobre a ingestão de água mediada pela angiotensina II é, pelo menos em parte, devido a sua modulação sobre vias da cascata de sinalização intracelular do receptor para AT1 (ALMEIDA-PEREIRA *et al.*, 2016).

1.2 Envolvimento do Estradiol Sobre os Peptídeos Neurohipofisários e Atriais Relacionados ao Balanço Hidroeletrolítico

Apesar de a secreção de AVP ser fortemente modulada pelo estradiol (SANTOLLO & DANIELS, 2015), os trabalhos descrevem resultados contraditórios. KISLEY e colaboradores (2000) demonstraram que a administração de estrógeno em ratas OVX aumenta a expressão de proteína *FOS* em neurônios magnocelulares do PVN**.** Por outro lado**,** a sede e a secreção de AVP induzidas por estímulo osmótico em mulheres está diminuída na fase lútea em relação à fase folicular do ciclo menstrual (VOKES *et al.*, 1988) enquanto que, após a menopausa, a reposição estrogênica não altera a secreção de AVP em condições basais (FORSLING *et al.*, 1982), ao contrário do aumento na secreção deste hormônio ter sido relatado posteriormente (WILLIAMS *et al.*, 1985). Em ratas, CROFTON *et al.*, (1985) não observaram flutuações nas concentrações plasmáticas de AVP durante o ciclo estral, enquanto que SKOWSKY *et al.*, (1979) observaram aumento durante o proestro (em relação ao diestro) e após a reposição estrogênica em ratas OVX. Por outro lado, CROFTON *et al.*, (1985) observaram que o aumento na secreção de AVP após a castração é revertido pelo tratamento com estradiol e PEYSNER & FORSLING (1990), que observaram uma redução na secreção de AVP após a OVX, relataram um efeito dose dependente do estradiol: doses baixas de E2 aumentaram a secreção de AVP enquanto que as doses maiores, reduziram.

Em relação à OT, além de a contração uterina e sucção mamilar, sua síntese e secreção também são estimuladas pelos mesmos fatores básicos que estimulam a secreção de AVP de forma que a OT plasmática possui uma importante função sobre o metabolismo de água e sódio corporal (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). No que diz respeito à secreção de OT relacionada ao equilíbrio hidrossalino, sabe – se que tal hormônio apresenta um efeito natriurético direto e indireto, ao estimular a secreção do peptídeo natriurético atrial (ANP) a partir dos cardiomiócitos atriais (JANKOWSKI *et al.*, 1998) e, apesar de ainda controversos, a OT parece exercer uma ação inibitória sobre o apetite específico ao sódio, inclusive o induzido pela ANG II (STRICKER & VERBALIS, 1996; FITZSIMONS, 1998; FITTS *et al.*,

2003). Sua secreção é regulada por alterações na osmolalidade plasmática (SLADEK *et al.*, 2000; CALIGIONI & FRANCI, 2002; LÚCIO-OLIVEIRA & FRANCI, 2011; VILHENA-FRANCO *et al.,* 2011; MARGATHO *et al.,* 2013) e, CROWLEY & AMICO (1993) verificaram que os esteroides gonadais seriam necessários para o acúmulo de RNAm para OT em neurônios do SON e PVN de ratas sob esse estímulo, além de AMICO *et al.,* (1981) demonstrarem uma correlação positiva entre a concentração plasmática de E2 e OT no plasma de mulheres jovens. Adicionalmente, trabalhos observaram que a hipovolemia induz a secreção de OT bem como a ativação de neurônios ocitocinérgicos do PVN e SON, e que tais respostas podem ser positivamente moduladas pela reposição com estradiol em fêmeas ovariectomizadas (SMITH & DAY, 2003; MECAWI *et al.,* 2011).

Em relação ao peptídeo natriurético atrial, sabe – se que é sintetizado pelos cardiomiócitos atriais e secretado sob o estímulo do estiramento da parede do átrio direito, em decorrência do aumento do volume circulante e do retorno venoso (HEDNER *et al.*, 1987; DE BOLD, 1982). O ANP exerce um potente efeito natriurético, agindo sobre o túbulo contorcido distal do néfron (DE BOLD *et al.*, 1981), e pode influenciar o controle neuroendócrino do balanço hidrossalino, agindo via receptores localizados em OCV's (MCKINLEY *et al.*, 1998). Como também é expresso em importantes áreas do SNC relacionadas ao controle do apetite ao sódio [como PVN (PALKOVITS *et al.,* 1987), AV3V e NTS (SKOFITSCH *et al.*, 1985) o ANP cerebral parece inibir o comportamento ingestivo (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 1985a), atenuando ou inibindo a ingestão de fluidos induzida pela angiotensina II (ANTUNES-RODRIGUES *et al.,* 1985b; EHRLICH & FITTS, 1990), de forma que a inibição da ação cerebral deste peptídeo pode estar envolvida com a deflagração do apetite ao sódio.

Além disso, a co-localização de receptores de estrógeno e ANP em miócitos cardíacos (BACK *et al.*, 1989) e o estímulo à secreção de ANP a partir de átrio isolado perfundido com estrógeno (DENG & KAUFMAN, 1993) fornecem argumentos para a hipótese de que o ANP atue como um mediador de ação estrogênica, sendo tal peptídeo considerado fundamental na manutenção da homeostase hidroeletrolítica e cardiovascular (DE BOLD *et al.*, 1981). JANKOWSKI *et al.,* (2001) demonstraram que a diminuição da expressão de ER α e a transcrição do ANP no átrio induzido pela ovariectomia é revertida pelo tratamento com 17-β-estradiol. Por outro lado, o tratamento com estradiol aumentou a secreção plasmática de ANP induzida pela expansão de volume extracelular (VILHENA-FRANCO *et al.,* 2011) apesar de não modular a redução na secreção deste hormônio após hemorragia hipovolêmica (MECAWI *et al.,* 2011) em ratas. Adicionalmente, neurônios imunorreativos para ANP foram descritos recentemente, no núcleo arqueado (NArc) e região ânteroventral periventricular (AVPV), onde co – expressam RNAm para ER α (dados não publicados de MARGATHO colaboradores), sugerindo que o sistema ANPérgico central também possa ser modulado pelo estradiol.

1.3 Modelo de Sobrecarga Salina

Disfunções no controle das concentrações plasmáticas de sódio aumenta em várias espécies a partir do declínio na produção de hormônios esteroidais relacionado à idade (TIPPETT *et al.,* 1987; CLARK *et al.,* 2004; RECKELHOFF & FORTEPIANI, 2004; HINOJOSA-LABORDE *et al.,* 2000, 2004; SONG *et al.,* 2005; HAY *et al.,* 2014). Adicionalmente, adicionar sódio à dieta moderna é comum, seja para conservação do alimento e/ou para acentuação do paladar (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

Um fator que tem sido bastante estudado na gênese da hipertensão na pós-menopausa é a diminuição dos hormônios ovarianos levando ao aumento da sensibilidade ao sal na dieta. Estudos de HARRISON-BERNARD *et al.,* (2003) demonstraram que o desenvolvimento da hipertensão em uma cepa de animais "sensíveis a sal" (*Dahl salt-sensitive rats*) foi prevenida

pela terapia de reposição hormonal com estrógeno. Atualmente não estão completamente esclarecidos os mecanismos pelos quais a hipertensão se instala no período da pós-menopausa e vários pesquisadores tem utilizado a ovariectomia como modelo para estudar tal fenômeno.

Neste contexto, a fim de mimetizar, pelo menos em parte, os efeitos de uma dieta com elevado conteúdo de sódio, lançamos mão de um protocolo osmótico não invasivo conhecido como sobrecarga salina. Apesar de algumas variações (quanto ao tempo e concentração da solução de salina oferecida), o protocolo de sobrecarga salina consiste em os animais terem acesso *ad libitum* à solução de salina como único fluido (não havendo, portanto, acesso à água). Esse protocolo induz alterações graduais na natremia e osmolalidade plasmática, podendo ser utilizado como modelo para o estudo dos mecanimos comportamentais, cardiovasculares e neuroendócrinos induzidos pela hiperosmolalidade.

MOREIRA *et al.,* (2014) demonstraram que animais submetidos à sobrecarga salina por 60 dias consecutivos (desde o desmame) apresentaram aumento na pressão arterial média e frequência cardíaca quando comparado aos animais controle. Ainda, observaram que a sobrecarga salina induziu uma hipersensibilidade desses animais ao apetite ao sódio induzido pelo protocolo de depleção de sódio (furosemida associada à dieta hipossódica durante 24 horas). VENTURA *et al.,* (2005) mostraram que ratos machos submetidos à sobrecarga salina (por 1 ou 7 dias consecutivos, com salina hipertônica como único fluido disponível) apresentaram um aumento nas concentrações plasmáticas de vasopressina e ocitocina correlacionado à hipernatremia induzida pela sobrecarga salina. Além disso, estudo com o modelo de sobrecarga salina (NaCl 2 %) por 7 dias consecutivos induziu aumento na osmolalidade plasmática e redução na osmolalidade urinária, associadas ao aumento nas concentrações plasmáticas de vasopressina e redução nos níveis plasmáticos de peptídeo natriurético atrial, em ratos Wistar (GREENWOOD *et al.,* 2015). Adicionalmente, estudos feitos em fêmeas mostraram que o mesmo estímulo osmótico por 3 dias com acesso apenas à salina hipertônica (como único fluido disponível) promoveu uma depleção de ERβ em neurônios magnocelulares sintetizadores de AVP e OT (SOMPONPUN & SLADEK, 2003), sugerindo que a depleção de ERβ em neurônios magnocelulares induzida pela sobrecarga salina poderia afetar a modulação do estrógeno na secreção de vasopressina e ocitocina.

Baseados em tais dados que relacionam o consumo excessivo de sódio, estrógeno e outros fatores neuroendócrinos em desequilíbrios hidroeletrolíticos e, até, no desenvolvimento de doenças sensíveis ao sal, como a hipertensão, a proposta geral do presente trabalho foi investigar a influência da terapia com estrógeno sobre aspectos comportamentais, cardiovasculares e neuroendócrinos de ratas ovariectomizadas, em condição basal e após a sobrecarga salina.

2 OBJETIVOS

Considerando i) o elevado teor de sódio na dieta da sociedade moderna, ii) o aumento na incidência de distúrbios relacionados ao sal em mulheres após a menopausa e iii) os ainda controversos estudos sobre a participação do estradiol na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico, o objetivo geral do presente trabalho foi estudar as possíveis alterações comportamentais, neuroendócrinas e cardiovasculares em ratas Wistar submetidas à dieta com elevado conteúdo de sódio, através do modelo de sobrecarga salina.

Especificamente, buscamos avaliar o efeito da ovariectomia e do tratamento com benzoato de estradiol em ratas Wistar sobre:

- o padrão de ingestão de água ou água associada à diferentes concentrações de solução de NaCl;
- o perfil de ingestão de solução salina 0,3 M (modelo de sobrecarga salina);
- as possíveis alterações da sobrecarga salina em parâmetros eletrolíticos urinário e plasmático;
- os parâmetros cardiovasculares em resposta à sobrecarga salina;
- a influência da sobrecarga salina nas concentrações plasmáticas de vasopressina, oxitocina, angiotensina II e peptídeo natriurético atrial.

3 METODOLOGIA

3.1 Animais e Manutenção

Ratos Wistar (fêmeas), pesando 200 a 220 g (com aproximadamente 60 dias de idade), obtidos junto ao Biotério de Criação do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis – UFRRJ), foram mantidos em caixas coletivas (contendo cinco animais cada) no Biotério de Manutenção do DCFis (ICBS – UFRRJ), em condições de fotoperíodo de 12/12 horas (luz acesa entre as 06:00 e as 18:00 horas), temperatura de 22 ± 2ºC, e com acesso *ad libitum* à água e à ração. Para minimizar o estresse inespecífico, os ratos foram manuseados diariamente durante a semana anterior aos experimentos. Por sua vez, para minimizar possíveis interferências da variação circadiana da secreção hormonal, os experimentos foram realizados no período da manhã, entre as 07:00 – 11:00 horas.

A manipulação dos animais e os procedimentos experimentais foram submetidos e avaliados junto à Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ (COMEP – UFRRJ) e realizados de acordo com o "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"* publicado por *US National Institutes of Health* (*NIH, Publication No. 85-23*, revisado em 1996) e com a legislação brasileira para experimentação animal (Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008).

3.2 Cirurgias

Para as cirurgias, os ratos foram submetidos à anestesia pela injeção intraperitoneal (*ip*) de ketamina (100 mg / kg, Agener®, Brasil) associada à xilazina (20 mg / kg, Dopaser®, Espanha). No período pós-cirúrgico, os animais permaneceram em um local aquecido até a recuperação da anestesia e receberam uma dose profilática de antibiótico veterinário (Fort Dodge, Brasil). Em seguida, os animais foram recolocados em suas caixas coletivas e reconduzidos ao Biotério de Manutenção do DCFis (ICBS – UFRRJ), onde permaneceram por um período de 3 a 7 dias, nas mesmas condições citadas anteriormente.

3.2.1 Ovariectomia

Resumidamente, após anestesia e perda dos reflexos medulares, as fêmeas foram submetidas à tricotomia da região para – costal direita e esquerda e posicionadas em decúbito lateral. O acesso aos ovários foi possível através de incisões na pele, tecido conjuntivo e musculatura da região para-costal. Em seguida à visualização, os ovários foram expostos e removidos a partir de uma ligadura envolvendo as trompas, artérias e veias ovarianas. Por fim, suturas na musculatura e na pele foram realizadas para finalizar o procedimento cirúrgico.

3.2.2 Canulação da artéria femoral

Para a mensuração dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram previamente submetidos à canulação da artéria femoral direita, sob protocolo anéstésico mencionado anteriormente. Uma cânula de polietileno (PE-10 conectada à uma PE-50; BD Intramedic) foi inserida na artéria femoral e então, exteriorizada na região cervical dorsal. Logo em seguida, a cânula foi lavada e preenchida com solução de salina isotônica heparinizada (100 IU/ml, Liquemine, Roche) a fim de prevenir possíveis obstruções. Os animais permaneceram em recuperação durante 24 horas, para então, os procedimentos experimentais serem realizados.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Tratamento hormonal

Ratas Wistar OVX foram divididas em dois grupos: um grupo de animais (OVX) foi submetido a administrações subcutâneas de veículo (óleo vegetal, 0,1 mL / animal / dia) e, o

segundo grupo (EB-OVX), à reposição estrogênica com benzoato de estradiol (Pfizer; 10 µg / 0,1 mL / animal / dia). As administrações foram realizadas no período da manhã (entre as 08:00 e 09:00 horas), desde o dia seguinte à ovariectomia até o término do protocolo experimental. Dados de análises do index uterino confirmaram a eficiência da ovariectomia e tratamento com estradiol, como descrito previamente (MECAWI *et al.*, 2007; 2008).

3.3.2 Estudo em gaiola metabólica

Cerca de quatro dias antes dos experimentos, os animais foram acondicionados nas gaiolas metabólicas para adaptação, com ração e água *ad libitum*. A fim de avaliarmos as respostas dipsogênicas e natriorexigênicas durante os procedimentos experimentais, água e solução salina hipertônica (0,075, 0,15 ou 0,3 M) foram oferecidos aos animais, em bebedouros volumétricos, em um paradigma de livre escolha. A ingestão de fluidos está expressa como mL/100g de peso corporal/24 horas (MECAWI *et al.*, 2007; 2008; 2010). Especificamente, o índice de preferência por sódio foi calculado pela razão entre o volume de solução salina ingerida e o volume total de fluidos consumido (salina / água + salina).

Ainda, o volume urinário foi mensurado, estando expresso em mL/100g de peso corporal/24 horas. Alíquotas de urina foram coletadas e armazenadas em freezer -20 C até o momento de sua utilização para os respectivos métodos de análises.

3.3.3 Coleta de sangue

O sangue foi coletado através de decapitação, em tubos de microhematócrito (hematócrito), ou tubos em gelo contendo heparina (para quantificação de proteína, osmolalidade e sódio plasmático e para dosagens de vasopressina e ocitocina) ou inibidores de peptidases [fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, benzoato de *p*-hidroximercúrio 1 mM, 10-fenantrolina 30 mM, pepstatina A 1 mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 7,5%, em um volume de 50 µl/ml de sangue] para as dosagens de ANP e ANG II. O plasma foi obtido após a centrifugação por 20 minutos, 3000 rotações/min a 4ºC e estocado a -20 ºC, até o momento das análises.

3.4 Métodos de Análises

3.4.1 Dosagem de Na^+e K^+urinário e plasmático

A determinação da concentração de Na^+ e K^+ plasmático e urinário foi realizada com o auxílio de um fotômetro de chama (Micronal, b262). Os valores obtidos foram expressos em mmol/L normalizados por 100 g do peso corporal.

3.4.2 Osmolalidade urinária e plasmática

A osmolalidade plasmática e urinária foi determinada pelo método de redução do ponto de congelamento da água através de um micro-osmômetro (Precision System, Inc). Os valores obtidos foram expressos em mOsm/Kg de H_2O.

3.4.3 Concentração de proteínas plasmáticas totais

A dosagem de proteínas totais foi realizada através do método colorimétrico de Bradford (1976) utilizando-se um leitor de ELISA (Microplater reader, Bio-Rad Laboratories, Inc.) Para tanto, o plasma foi diluído (1:200) e, uma alíquota de 10 microlitros foi solubilizada em 200 microlitros do corante diluído (1:5) em um leitor de ELISA (BIORAD).

3.4.4 Extração de hormônios do plasma

O AVP e OT foram extraídos do plasma com acetona e éter de petróleo: um mL de plasma foi transferido para um tubo contendo 2 ml de acetona gelada (MercK, Brasil),

seguido por agitação de 30 segundos e centrifugação (2500 rpm, 25 min, 4 °C); a seguir, o sobrenadante foi decantado para um tubo contendo 2 mL de éter de petróleo (Reagen, Brasil), sendo submetido a agitação e reservado durante 2 minutos; o sobrenadante (éter de petróleo) foi desprezado por aspiração e o líquido restante (acetona) contendo o AVP e OT foi submetido ao processo de liofilizacão. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuspenso com 250 µL de tampão do ensaio.

Os hormônios ANG II e ANP foram extraídos a partir de 1 mL de plasma acidificado com 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA; Sigma-Aldrich, EUA) 0,1% em colunas Bond-Elut (Peninsula Laboratories, EUA). Para tanto, as colunas foram pré-ativadas com 4 mL de uma solução de acetonitrila a 60% (Merck, EUA) diluída em TFA 0,1% seguido de 20 mL de TFA 0,1%. Em seguida as amostras foram aplicadas individualmente nas colunas e lavadas com mais 20 mL de TFA 0,1%. Os peptídeos absorvidos foram então eluídos em 3 mL de uma solução a 60% de acetonitrila em TFA 0,1%, sendo coletados e liofilizados. No momento do ensaio, o liofilizado foi ressuspenso em 400 µL de tampão de ensaio.

Todos os procedimentos de extração foram realizados sobre gelo. Para determinar a eficiência da extração dos hormônios pelos métodos utilizados, uma quantidade de (~ 25.000 cpm) do peptídeo marcado (com ^{125}I) foi adicionada a um mL de plasma, o qual foi submetido às extrações, como descrito acima. Os sobrenadantes e os precipitados, gerados em cada uma das etapas da extração, foram analisados no contador Gama e, a partir dos valores de suas radioatividades obtidas, foi calculada a proporção do hormônio recuperado no final do processo de extração. A extração foi considerada eficiente quando a porcentagem de recuperação do hormônio marcado foi acima de 90%.

3.4.5 Dosagens hormonais

Todas as dosagens hormonais foram realizadas através de radioimunoensaios específicos usando as técnicas descritas por ELIAS *et al.,* (1998), HAANWINCKEL *et al.,* (1995), GUTKOWSKA *et al.,* (1984) e BOTELHO *et al.,* (1994) para AVP, OT, ANP e ANG II, respectivamente. Os anticorpos específicos para ANG I e II, AVP e OT foram obtidos a partir da Peninsula Inc. (ANG II: T4007; AVP: T4561; e OT: T4084), e aquele para ANP foi gentilmente cedido por Jolanta Gutkowska (Universidade de Montreal, Canadá). Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata.

Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata. A sensibilidade do ensaio e o coeficiente de variação intra- e inter-ensaio foram: 0,7 pg/mL, 4,8% e 10,0% para ANP; 0,5 pg/mL, 14,9% e 27,1% para ANG II; 0,8 pg/mL, 7,7% e 11,9% para AVP; e 0,9 pg/mL, 7,0% e 12,6% para OT.

3.4.6 Aferição da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial [média (PAM), sistólica (PAS) e diastólica (PAF), em mmHg], assim como a frequência cardíaca (FC, em batimentos por minuto, bpm) foram obtidos 24 horas após a canulação, com os animais recuperados, acordados e livres para se movimentar. Para tanto, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0380/D, AD Instruments, EUA) e este a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC System, EUA); logo após a conexão, os animais permaneceram por um período de adaptação de 30 minutos para, logo em seguida, realizarmos os registros da PAM, PAS, PAD e frequência cardíaca ao longo dos próximos 30 minutos.

3.5 Protocolos Experimentais

3.5.1 Modulação do estrógeno sobre o balanço hidroeletrolítico e parâmetros cardiovasculares em ratas OVX em condição basal

Ratas Wistar foram ovariectomizadas e, 24 horas após, tiveram início as administrações diárias de veículo (OVX) ou benzoato de estradiol (EB-OVX). No oitavo dia pós-cirúrgico, os animais foram colocados em gaiolas metabólicas individuais, com acesso ad libitum à ração, para adaptação. Neste momento, os animais foram distribuídos em 4 grupos:

- G1: acesso livre apenas à água;
- G2: acesso livre à água e salina hipotônica (0,45 %);
- G3: acesso livre à água e salina isotônica (0,9 %);
- G4: acesso livre à água e salina hipertônica (1,8 %).

No décimo quarto dia de administrações de veículo ou benzoato de estradiol, os animais dos grupos G1, G2, G3 e G4 foram submetidos à avaliação de sua ingestão basal de água e solução salina ao final de um período de 24 horas. Para a avaliação da osmolalidade plasmática, concentrações plasmáticas de sódio, potássio e proteínas plasmáticas totais, assim como de parâmetros cardiovasculares, os animais tiveram acesso apenas à agua (G1) (Figura 1A).

3.5.2 Influência do estradiol no balanço hidroeletrolítico, parâmetros cardiovasculares e hormonais em fêmeas OVX submetidas à sobrecarga salina.

Uma semana após o início das injeções com veículo ou estradiol, solução de salina hipertônica (1,8 %) foi oferecida à ambos os grupos como único fluido, durante 3 ou 15 dias consecutivos (G5). Durante este período, o volume de solução salina ingerido foi mensurado a cada dois dias, e as administrações com veículo ou estradiol continuaram sendo diariamente realizadas. Ao final do período de 3 ou 15 dias, parâmetros cardiovasculares foram aferidos, e a urina e o sangue foram coletados para as quantificações de Na^+ e K^+ e, das concentrações plasmáticas de vasopressina, ocitocina, angiotensina II e peptídeo natriurético atrial (Figura 1B).

3.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados através de teste “t” de Student ou por ANOVA uma ou duas vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os dados estão expressos como média ± erro padrão da media (EPM); em todas as comparações, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada pelo software Statistica (versão 9.0, Statsoft, EUA).

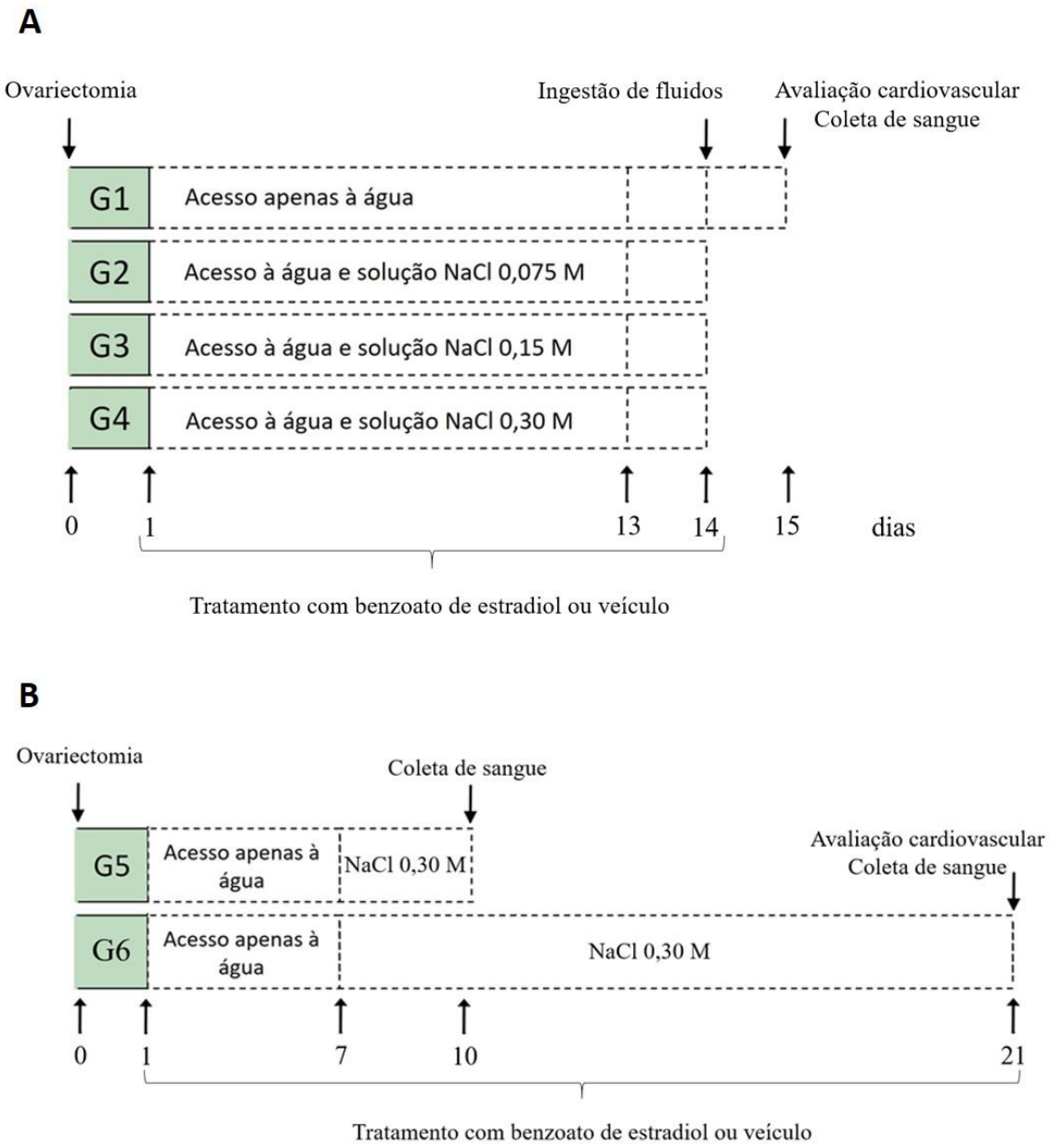


Figura 1: Representação esquemática dos procedimentos experimentais. *Ratas Wistar foram ovariectomizadas e, 24 horas após, submetidas ao início do tratamento com benzoato de estradiol ou veículo. Os grupos foram subdivididos para: terem água como único fluido disponível (G1) ou, terem acesso à água e salina hipotônica (G2), isotônica (G3) ou hipertônica (G4). Após o período de adaptação, a ingestão de fluido (s) foi avaliada no grupo G1, G2, G3 e G4 no 14 dia de tratamento. Por sua vez, o grupo G5 foi submetido ao protocolo de sobrecarga salina (salina hipertônica como único fluido) a partir do sétimo dia de tratamento com veículo ou estradiol: a cada dois dias a ingestão de fluidos foi avaliada e, 3 ou 15 dias após o início da sobrecarga salina, os animais do grupo G5 (bem como o seu respectivo controle, G1) foram submetidos à canulação da artéria femoral (para mensuração de parâmetros cardiovasculares) e à decapitação (para coleta de amostras de sangue para quantificação de sódio e potássio, proteínas plasmáticas totais, vasopressina, ocitocina, peptídeo natriurético atrial e angiotensina II).*

4 RESULTADOS

4.1 Ingestão de Água e Solução Salina em Ratas OVX e EB-OVX, em Condição Basal ou de Sobrecarga Salina

A figura 2 mostra o perfil da ingestão de fluidos em ratas OVX e EB-OVX em condições basais e o perfil de preferência por sódio. O tratamento com estrógeno não alterou a ingestão de água quando esta era o único fluido oferecido (Figura 2A).

Adicionalmente, no paradigma de livre escolha (Figura 2B) não observamos modulações estrogênicas na ingestão de fluidos quando os animais tinham livre escolha entre água e solução salina hipotônica (0,45 %), água e solução salina isotônica (0,9 %) ou água e solução salina hipertônica (1,8 %).

Observamos que quando o paradigma de livre escolha foi realizado com água e salina hipertônica *ad libitum*, a ingestão de água aumentou tanto no grupo OVX (12,57 ± 0,87 vs. 3,22 ± 0,91 e 5,17 ± 1,17 mL/100 g/24 h, $p < 0,05$ vs. NaCl 0,45 % e 0,9 % respectivamente) quanto no grupo EB-OVX (10,05 ± 0,65 vs. 4,00 ± 1,25 e 3,93 ± 1,25 mL/100 g/24 h, $p < 0,05$ vs. NaCl 0,45 % e 0,9 % respectivamente), não havendo modulação estrogênica neste parâmetro.

Ainda na Figura 2B, observamos que os animais OVX apresentaram uma redução progressiva na ingestão de solução salina à medida em que a concentração desta aumenta (NaCl 0,9 %: 13,71 ± 1,51 vs. NaCl 0,45 % 20,65 ± 2,25 mL/100 g/24 h, $p < 0,05$; NaCl 1,8 %: 3,91 ± 0,57 vs. NaCl 0,9 %: 13,71 ± 1,51 mL/100 g/24 h, $p < 0,05$; NaCl 1,8 %: 3,91 ± 0,57 vs. NaCl 0,45 %: 20,65 ± 2,25 mL/100 g/24 h, $p < 0,05$). No entanto, a preferência por sódio (Figura 2C) no grupo OVX reduz de forma significativa apenas quando a solução de salina hipertônica é oferecida (27,90 ± 3,90 vs. 80,6 ± 6,40 e 70,20 ± 9,30 %, $p < 0,05$ vs. NaCl 0,45 % e 0,9 % respectivamente).

No que tange ao grupo EB-OVX, observamos o mesmo perfil verificado no grupo OVX em relação à ingestão de solução salina, ou seja, à medida que a concentração da solução aumenta, a ingestão deste fluido em 24 horas reduz: (NaCl 0,9 %: 9,60 ± 1,00 vs. NaCl 0,45 %: 18,00 ± 1,95 mL/100 g/24 h, $p < 0,05$; NaCl 1,8 %: 2,45 ± 0,40 vs. NaCl 0,9 %: 9,60 ± 1,00 mL/100 g/24 h, $p < 0,05$; NaCl 1,8 %: 2,45 ± 0,40 vs. NaCl 0,45 %: 18,00 ± 1,95 mL/100 g/24 h, $p < 0,05$).

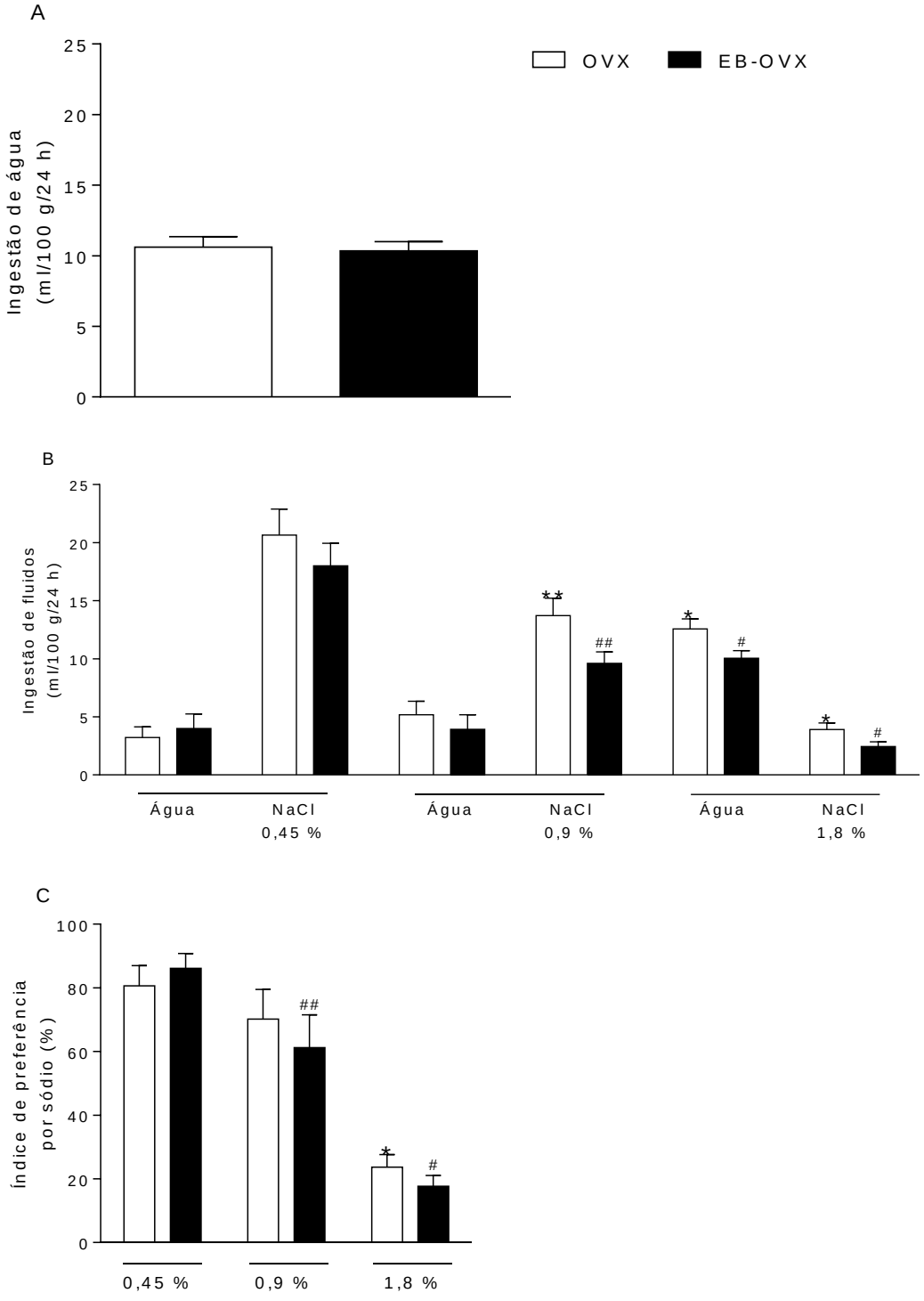


Figura 2: Ingestão basal de água (A), ingestão basal de fluidos (paradigma de livre escolha) (B) e preferência por sódio (C) em animais OVX e EB-OVX. *Paradigma de livre escolha, onde é oferecido ao animal dois bebedouros, um com água e outro com solução salina hipotônica (0,45 %), isotônica (0,9 %) ou hipertônica (1,8 %) foi oferecida aos animais dos grupos OVX e EB-OVX. Os resultados estão expressos como média ± EPM. * p < 0.05 vs. respectivo grupo OVX com salina 0,075 e 0,9 %; ** p < 0.05 vs. respectivo grupo OVX com salina 0,45 %; # p < 0,05 vs. respectivo grupo EB-OVX com salina 0,075 e 0,9 %; ## p < 0,05 vs. respectivo grupo EB-OVX com salina 0,45 %.*

Neste contexto, apesar de o estrógeno não ter modulado a preferência por sódio quando comparado aos respectivos grupos OVX, observamos que a preferência por sódio reduziu de forma significativa no grupo EB-OVX à medida que a concentração de solução de NaCl aumentou: NaCl 0,9 %: 61,20 ± 10,30 vs. NaCl 0,45 % 86,10 ± 4,70 %, $p < 0,05$; NaCl 1,8 %: 17,70 ± 3,40 vs. NaCl 0,9 %: 61,20 ± 10,30 %, $p < 0,05$; NaCl 1,8 %: 17,70 ± 3,40 vs. NaCl 0,45 %: 86,10 ± 4,70 %, $p < 0,05$.

Por fim, no protocolo de sobrecarga salina (quando salina hipertônica é oferecida como único fluido disponível, durante 3 ou 15 dias consecutivos) não observamos diferenças significativas na ingestão de NaCl 1,8 % entre os grupos OVX e EB-OVX, apesar de ambos os grupos exibirem um progressivo aumento na ingestão de solução salina ao longo do protocolo experimental (Figura 3).

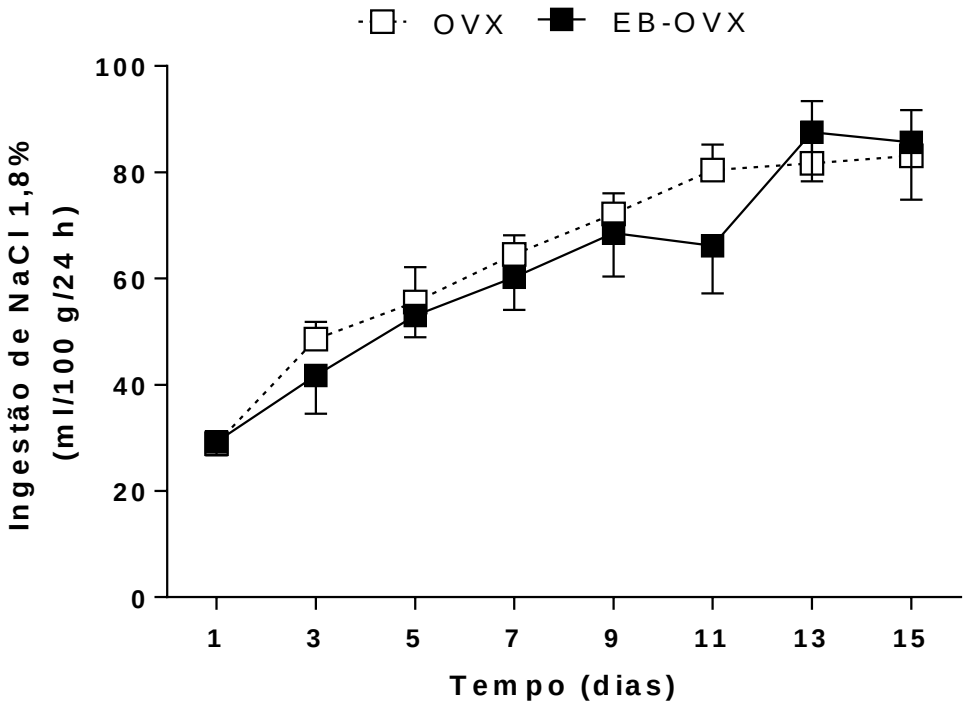


Figura 3: Ingestão de salina hipertônica (como único fluido disponível) no modelo de sobrecarga salina em animais OVX e EB-OVX. *Solução de salina hipertônica (1,8 %) foi utilizada para induzir sobrecarga salina nos animais dos grupos OVX e EB-OVX, sendo o único fluido disponível. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. respectivo grupo OVX no dia 1; # p < 0,05 vs. respectivo grupo EB-OVX no dia 1.*

4.2 Avaliação das Concentrações Plasmáticas e Urinárias de Proteína, Na^+ e K^+ em Ratas OVX e EB-OVX em Condição Basal ou de Sobrecarga Salina

A tabela 1 mostras a influência da sobrecarga salina em parâmetros urinários e plasmáticos em animais OVX e EB-OVX. De princípio, já podemos observar que o tratamento com benzoato de estradiol reduziu a excreção de sódio no grupo controle, quando comparado ao grupo OVX (88.14 ± 12.4 vs. 121.5 ± 7.7 mmol/L, $p < 0,05$, respectivamente). Os demais parâmetros não foram alterados pelo tratamento com benzoato de estradiol em condição controle (acesso apenas à água, como único fluido).

Tabela 1: Concentrações plasmáticas e urinárias de Na^+ e K^+ e proteínas plasmáticas totais em fêmeas OVX e EB-OVX em condições basal e de sobrecarga salina

	Controle		Sobrecarga Salina			
			3 dias		15 dias	
	OVX	EB-OVX	OVX	EB-OVX	OVX	EB-OVX
Na^+ plasmático (mmol/L)	140.1 ± 2.4	142.6 ± 3.4	149.9 ± 1.3*	147.2 ± 2.4	146.9 ± 2.0*	143.0 ± 2.8
K^+ plasmática (mmol/L)	7.27 ± 0.4	7.34 ± 0.3	7.74 ± 0.4	7.00 ± 0.3	6.48 ± 0.3	6.44 ± 0.6
Proteínas plasmáticas totais (g/dL)	5.35 ± 0.19	5.25 ± 0.23	4.72 ± 0.08*	5.50 ± 1.3	4.49 ± 0.42*	4.97 ± 0.13
Na^+ urinário (mmol/L)	121.5 ± 7.7	88.14 ± 12.4+	496.0 ± 16.0*	476.0 ± 28.5*	423.3 ± 20.9*	396.7 ± 52.0*
K^+ urinário (mmol/L)	280.8 ± 17.2	253.4 ± 14.7	41.7 ± 10.2*	127.1 ± 27.3*+	62.0 ± 12.7*	108.8 ± 10.8*+
Proteina urinária (mg/dL)	59,2 ± 3,7	66,4 ± 4,7	29,5 ± 5,0*	60,6 ± 8,5+	39,5 ± 10,5*	64,9 ± 10,8

*As mensurações do grupo controle foram obtidas a partir das fêmeas que possuíam apenas água como fluido oferecido. Os dados estão expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ vs. respectivos grupos controle. + $p < 0,05$ vs. respectivo grupo OVX.*

Aos 3 e 15 dias após o início do protocolo de sobrecarga salina, observamos um aumento nas concentrações plasmáticas de Na^+ no grupo OVX (149,9 ± 1,3 e 146,9 ± 2,0 vs. 140,1 ± 2,4, $p < 0,01$) quando comparado ao grupo controle e, de forma interessante, o estrógeno inibiu a hipernatremia induzida por esse protocolo, em ambos os tempos estudados.

A sobrecarga salina aumentou a concentração de Na^+ na urina (496,0 ± 16,0 e 423,3 ± 20,9 vs. 121,5 ± 7,7, $p < 0,001$) e reduziu a excreção urinária de K^+ (41,7 ± 10,2 e 62,0 ± 12,7 vs. 280,8 ± 17,2, $p < 0,01$) 3 e 15 dias após o início do protocolo no grupo OVX, respectivamente. Da mesma forma, os animais EB-OVX com sobrecarga salina por 3 ou 15 dias apresentaram uma maior excreção urinária tanto de Na^+ (476,0 ± 28,5 e 396,7 ± 52,0 vs. 88,14 ± 12,4, $p < 0,001$) quanto de K^+ (127,1 ± 27,3 e 108,8 ± 10,8 vs. 253,4 ± 14,7, $p < 0,01$), respectivamente, quando comparado ao grupo controle. Neste quesito, o estrógeno modulou a excreção de potássio após 3 (127,1 ± 27,3 vs. 41,7 ± 10,2, $p < 0,05$) e 15 (108,8 ± 10,8 vs. 62,0 ± 12,7, $p < 0,05$) dias de ingestão de salina hipertônica quando comparado ao respectivo grupo OVX, não influenciando o perfil natriurético.

No que tange ao conteúdo proteico, não observamos diferenças entre os grupos OVX e EB-OVX em condição controle. Entretanto, a sobrecarga salina induziu uma redução na concentração proteica plasmática (4,72 ± 0,08 e 4,49 ± 0,42 vs. 5,35 ± 0,19, $p < 0,05$) e urinária (29,5 ± 5,0 e 39,5 ± 10,5 vs. 59,2 ± 3,7, $p < 0,05$, em ratas OVX tanto no dia 3 quanto no dia 15 de sobrecarga salina, respectivamente, sendo tais mudanças inibidas pela reposição estrogênica.

4.3 Parâmetros Cardiovasculares em Condição Basal ou de Sobrecarga Salina sob Influência Estrogênica

A tabela 2 apresenta os parâmetros cardiovasculares aferidos nos grupos Controle (G1) e de sobrecarga salina (G5), com acesso apenas à água ou NaCl 0,30M durante 15 dias, respectivamente. Os animais do grupo controle e tratados diariamente com estradiol apresentaram uma redução na frequência cardíaca (336,9 ± 9,63 vs. 382,0 ± 13,40 bpm, $p < 0,05$) e na pressão arterial sistólica (127,3 ± 2,02 vs. 134,5 ± 2,89 mmHg, $p < 0,05$) quando comparado ao grupo OVX. Além disso, o consumo diário de salina hipertônica não alterou a pressão arterial sistólica quando comparado ao grupo controle, além de não ter influenciado a redução da mesma induzida pelo estradiol. Porém, o tratamento com estradiol atenuou a redução na frequência cardíaca induzida pela sobrecarga salina, quando comparado ao grupo EB-OVX com acesso apenas à água (368,9 ± 6,0 vs. 336,9 ± 9,6, $p < 0,05$ respectivamente).

Tabela 2: Parâmetros cardiovasculares em ratas OVX e EB-OVX controle e com sobrecarga salina

	Controle		Sobrecarga salina	
	OVX	EB-OVX	OVX	EB-OVX
Pressão arterial sistólica (mmHg)	134,5 ± 2,9	127,3 ± 2,1*	135,2 ± 2,2	128,1 ± 2,0*
Pressão arterial diastólica (mmHg)	100,5 ± 1,7	99,3 ± 2,6	110,6 ± 1,7	107,7 ± 1,3
Pressão arterial média (mmHg)	110,6 ± 1,7	107,1 ± 1,5	115,2 ± 4,0	114,8 ± 4,1
Frequência cardíaca (bpm)	382,0 ± 13,4	336,9 ± 9,6*	409,2 ± 14,0	368,9 ± 6,0*+

*Os dados foram obtidos a partir de ratas OVX e EB-OVX com acesso apenas à água ou apenas NaCl 1,8 % ao final do período de 15 dias. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p< 0,05 vs. respectivo grupo OVX. + p < 0.05 vs. EB-OVX.*

4.4 Influência da sobrecarga salina nas concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANG II e ANP em ratas OVX e EB-OVX

A Figura 4 mostra as concentrações hormonais de animais OVX e EB-OVX em condição basal e, com e 3 15 dias de sobrecarga salina. O estrógeno não afetou as concentrações basais de AVP, OT, ANG II e ANP. No que tange aos animais submetidos à sobrecarga salina, o grupo OVX apresentou aumento nas concentrações plasmáticas de AVP (Dia 3: 15,81 ± 1,52 e Dia 15: 13,64 ± 1,10 vs. 3,51 ± 0,54 pg/mL, $p < 0,05$) e OT (Dia 3: 2,64 ± 0,31 e Dia 15: 2,11 ± 0,35 vs. 1,26 ± 0,15 pg/mL, $p < 0,05$) quando comparado aos animais OVX em condição basal, não havendo ainda influências do tratamento com estrógeno sobre essas respostas (Figura 5A e B).

Por outro lado, as concentrações plasmáticas de angiotensina II reduziram significativamente após a sobrecarga salina no grupo OVX (Dia 3: 7,96 ± 1,88 e Dia 15: 5,15

± 0,24 vs. 18,9 ± 2,97 pg/mL, p < 0,05, quando comparado ao respectivo controle) e o estrógeno atenuou levemente tal resposta apenas no grupo submetido a 15 dias de sobrecarga salina (7,82 ± 1,10 vs. 5,15 ± 0,24 pg/mL, p < 0,05 quando comparado ao respectivo grupo OVX).

Por fim, apenas no grupo OVX submetido à sobrecarga salina por 15 dias foi verificado uma redução significativa nas concentrações plasmáticas de ANP, quando comparado ao seu respectivo grupo controle (20,92 ± 3,57 vs. 41,30 ± 5,70 pg/mL, p < 0,05), e o tratamento com estradiol reverteu por completo a redução nas concentrações plasmáticas de ANP induzida pela ovariectomia (41,33 ± 7,95 vs. 20,92 ± 3,57 pg/mL, p < 0,05) quando comparado ao respectivo grupo OVX.

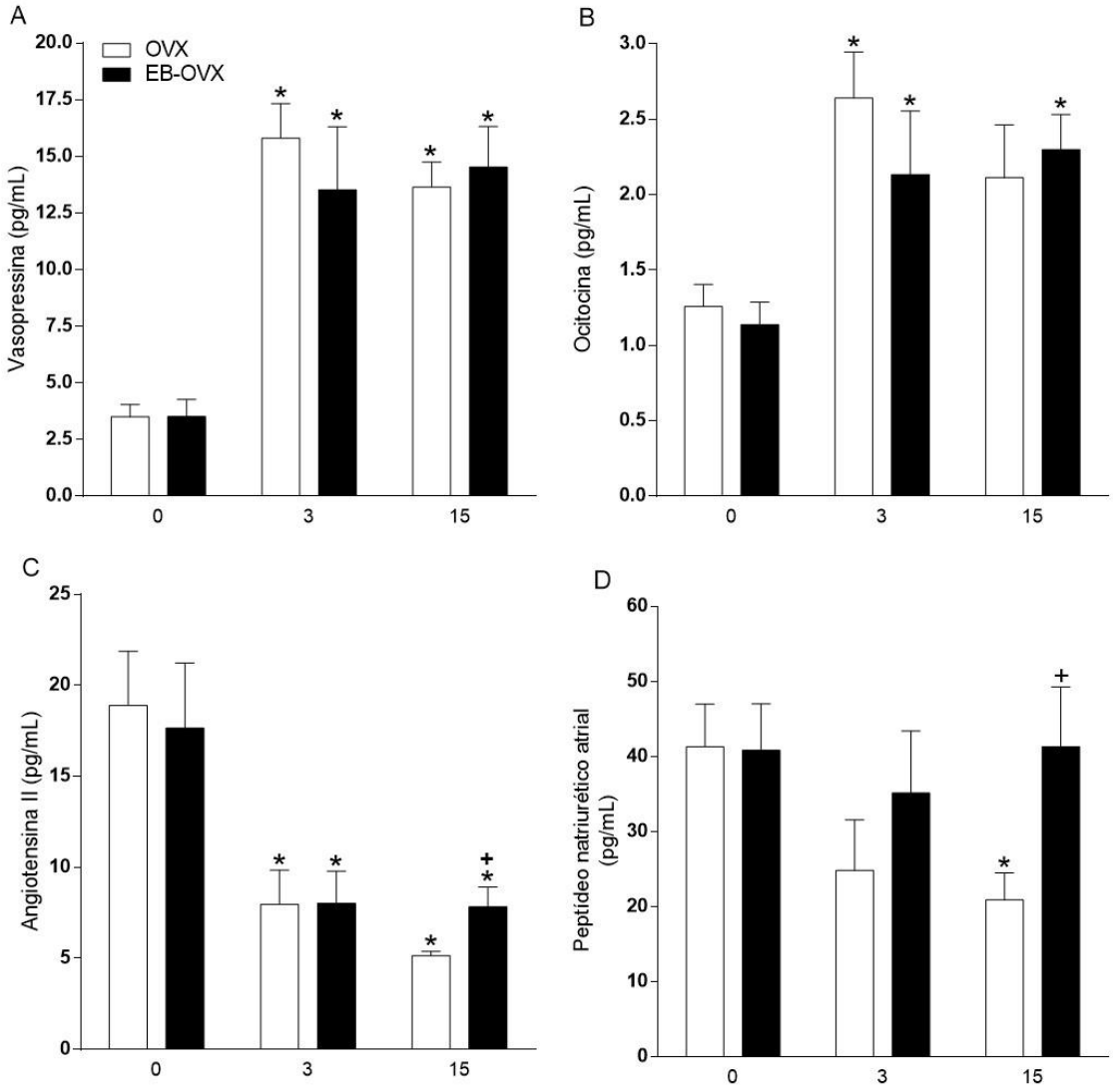


Figura 4: Influência da sobrecarga salina nas concentrações plasmáticas de AVP, OT, ANG II e ANP em ratas OVX e sobre influência estrogênica. *As mensurações basais foram feitas nos animais cujo único fluido recebido foi a água. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. respectivo grupo controle; + p < 0,05 vs. respectivo grupo OVX.*

5 DISCUSSÃO

Com o passar dos anos, a adição de sódio à dieta tornou-se cada vez mais comum, seja para conservação do alimento e/ou para acentuação do paladar. Por outro lado, o consumo excessivo de sódio é um dos principais problemas da sociedade moderna, por estar associado com diversas doenças, sejam elas hepáticas, renais ou cardiovasculares (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). Sabendo que o envelhecimento está relacionado com alterações neuroendócrinas e comportamentais na regulação hidroeletrolítica (BEGG, 2017) e dos crescentes trabalhos que mostram o quanto o estradiol (e a sua ausência) influenciam esta homeostase, buscamos no presente trabalho avaliar (do ponto de vista comportamental, cardiovascular e neuroendócrino) se o estradiol modula as respostas à sobrecarga salina em ratas Wistar.

Os grupos OVX e EB-OVX exibiram uma progressiva redução na ingestão de salina de acordo com o aumento nas concentrações da solução disponível. Intrigantemente, o estrógeno não modulou a ingestão basal dos fluidos, com acesso apenas à água ou no paradigma de livre escolha, entre água e solução salina em diferentes concentrações. Em condições de depleção de sódio, o limiar de sensibilidade a este íon reduz (e por isso a ingestão de salina hipotônica aumenta) enquanto que a aversão a soluções de salina hipertônica reduz (e por este motivo, a ingestão de soluções com elevado teor de sódio também aumenta), sugerindo uma alteração na percepção qualitativa ou hedônica, mas não na percepção quantitativa do sódio (ST JOHN, 2016). No entanto, nosso estudo foi realizado em animais em condições basais, ou seja, sódio-repletos. Assim, o apetite por sódio neste caso é inato, estando meramente relacionado às questões palatáveis do sódio.

Vários estudos descreveram diferenças sexuais no que tange ao apetite por sódio: quando submetidas ao protocolo de livre escolha, fêmeas de várias espécies apresentam uma preferência por sódio superior quando comparadas aos machos (FRANKMAN *et al.,* 1991; KENSICKI *et al.,* 2002) podendo tais respostas serem consequências da modulação dos estrógenos ou da testosterona (KRECEK, 1973; CHOW *et al.,* 1992; CURTIS *et al.,* 2004). Porém, não há consenso na literatura sobre os efeitos modulatórios exercidos pelo estrógeno no apetite por sódio em fêmeas, havendo desde trabalhos que mostram sua ação estimulatória (WOLF, 1982; CHOW *et al.,* 1992; KENSICKI *et al.,* 2002) aos seus efeitos inibitórios (SCHEIDLER *et al.,* 1994; MECAWI *et al.,,* 2007; 2008) no consumo de sal, que logicamente podem estar diretamente relacionados com as condições onde os dados foram coletados, ou seja, condição basal, desafios natriorexigênicos ou até mesmo o tempo e a dose de estradiol administrado (CURTIS, 2009).

Assim, com a utilização do paradigma de livre escolha em condição basal, observamos em nosso protocolo que apesar da elevada preferência por salina hipotônica (~80%), não observamos diferenças neste parâmetro entre as ratas OVX tratadas com óleo ou estrógeno por 14 dias. A ausência de modulação estrogênica sobre a ingestão de solução salina hipotônica mostrada em nosso trabalho não está de acordo com o trabalho previamente descrito por KENSICKI *et al.,* (2002), que descreveu uma correlação positiva entre as concentrações plasmáticas de estradiol e a ingestão de salina 0,5% em um protocolo de livre escolha. Por outro lado, CURTIS & CONTRERAS (2006) reportaram uma elevada preferência de ratas OVX por salina hipotônica quando comparado aos machos, mas sem modulação estrogênica, indicando que o estrógeno não altera o limiar o limiar de detecção de NaCl.

No presente trabalho, observamos ainda uma redução significativa na ingestão de salina hipertônica tanto no grupo EB-OVX quanto no OVX, assim como nos respectivos índices de preferência por sódio. No entanto, o tratamento com estrógeno não influenciou a

respectiva ingestão tão pouco a preferência por sódio. Quando o paradigma de livre escolha ocorre entre água e solução de salina hipertônica, CURTIS & CONTRERAS (2006) observaram uma redução na preferência por sódio em ratas OVX tratadas com estradiol em comparação com tratadas com óleo, que foi correlacionada com a redução na atividade do nervo Corda do Tímpano (nervo gustatório que inerva primariamente as papilas gustativas na porção anterior da língua, transmitindo as informações para áreas sensoriais específicas do cérebro), que ocorre de forma dependente ao aumento da concentração de solução salina. Embora não haja evidências de que as respostas do nervo Corda do Tímpano ao NaCl diferem entre ratos machos e fêmeas intactas, as respostas do nervo glossofaríngeo são menores em fêmeas intactas para NaCl, quando comparado aos machos. O apetite por sódio também é modulado pelos canais de sódio epitelial (ENaC, do inglês *epithelial sodium channel*) presente nas células gustativas, sendo mais uma das múltiplas vias de transdução para o reconhecimento de sais de sódio (KOPKA *et al.*, 2000) e, esta via para detecção de sódio também parece ser modulada pelo estradiol. Tais achados sugerem que, além da modulação central diferenciada do *input* gustatório, a informação gustativa a partir da periferia é influenciada pelo estradiol, pelo menos no que tange ao sódio (MARTIN & SOLLARS, 2017). No entanto, podemos não ter evidenciado modulação estrogênica por que os efeitos do estradiol podem ser aparentes quando os receptores tornam-se saturados, já que a resposta do nervo Corda do Tímpano à concentrações de NaCl inferiores à 0,6 M não são diferentes entre os grupos (CURTIS & CONTRERAS, 2006).

No que tange às concentrações plasmáticas e urinárias de sódio em condição basal, nós observamos que o tratamento com estrógeno reduziu a natriurese sem alterar a natremia nos animais OVX (Tabela 1). Ratos Wistar machos recebendo administrações de 17-β-estradiol exibiram uma redução na excreção urinária de sódio quando comparado ao grupo tratado com óleo (THORNBOROUGH & PASSO, 1975). Neste contexto, vários estudos demonstraram alterações no metabolismo de sódio durante o ciclo menstrual/estral e gestação, assim como entre fêmeas e machos, além de demonstrarem uma redução na excreção de sódio induzida pelo estrógeno em mulheres e ratas (THORNBOROUGH & PASSO, 1975; STACHENFELD *et al.*, 2003; STANHEWICZ & KENNEY, 2015). Por não termos observado modulação do estradiol nas concentrações plasmáticas dos hormônios sabidamente natriuréticos (ocitocina e peptídeo natriurético atrial) ou anti-natriuréticos (angiotensina II), podemos excluir o componente hormonal da redução da natriurese induzida pelo estradiol.

Estudos *in vitro* de CHANG *et al.*, (2007) com culturas das células tubulares do néfron, demonstraram uma modulação positiva exercida pelo estrógeno e/ou progesterona sobre a expressão de RNAm, conteúdo proteico e atividade do canal de sódio epitelial (ENaC, do inglês *epithelial sodium channel*, que consiste na primeira rota de reabsorção de sódio no néfron distal dos mamíferos), que foi abolida pela elevação das concentrações estrogênicas (de 25 para 50 nM) na solução de infusão. Além disso, GAMBLING *et al.*, (2004) descreveram uma maior expressão da subunidade α do ENaC (ENaC- α) no rim de fêmeas intactas e OVX tratadas com estrógeno, quando comparado aos machos e ao grupo OVX, respectivamente. Em conjunto, tais resultados complementam o nosso já que o ENaC- α é um importante constituinte deste canal condutor de Na+ (CANESSA *et al.*, 1994) e, assim, o aumento em sua expressão mediada pelo estrógeno pode estar relacionado com o aumento na reabsorção de sódio, reduzindo assim a natriurese.

Nos animais que foram submetidos à sobrecarga salina, apesar do progressivo aumento na ingestão de salina hipertônica no grupo OVX ao longo do protocolo experimental, não observamos modulação estrogênica. No entanto, o tratamento com estradiol atenuou o aumento na natremia dos animais com sobrecarga salina, tanto 3 quanto 15 dias após o início do protocolo de ingestão de salina hipertônica, com uma aparente ausência de modulações estrogênicas no aumento da natriurese induzida pela ingestão de salina hipertônica, como

único fluido. Considerando que: i) a natriurese no grupo EB-OVX em condição basal foi ~27% menor quando comparado ao grupo OVX, como descrito anteriormente, ii) não observamos diferenças no volume de salina hipertônica ingerida pelos grupos OVX e EB-OVX, e iii) a ausência de diferenças na natriurese entre os grupos OVX e EB-OVX após a sobrecarga salina, é plausível sugerirmos a maior amplitude na excreção de sódio no grupo EB-OVX como uma explicação para a manutenção da natremia nestes animais.

Estudos prévios demonstraram que o sódio pode se ligar a sítios polianiônicos de proteoglicanos e glicosaminoglicanos, de forma que a pele pode ser considerada um estoque de íons sódio osmoticamente inativo, quando ligado aos sítios aniônicos dos dissacarídeos formadores dos glicosaminoglicanos (RABELINK & ROTMANS, 2009). A mobilização do estoque de íon sódio osmoticamente inativo na pele foi demonstrada por SCHAFFLHUBER *et al.,* (2007), onde a dieta pobre em sódio foi associada com a redução do conteúdo de glicosaminoglicanos (e, consequentemente, de sítios polianiônicos), reduzindo assim os sítios para ligação do íon sódio e, favorecendo a sua mobilização à partir da pele. Desta forma, os glicosaminoglicanos podem participar da homeostase dos fluidos corporais (RABELINK & ROTMANS, 2009). Neste contexto, estudos prévios demonstraram que o estradiol regula a expressão de glicosaminoglicanos no fluido intersticial da pele, através de ER α e ER β (MARKIEWICZ *et al.,* 2002; RABELINK & ROTMANS, 2009), levando-nos a hipotetizar se o estradiol modularia a captação de sódio pela pele. Em verdade, dados não publicados de MENEZES *et al.,* demonstraram que ratas ovariectomizadas tratadas com estradiol apresentam um maior conteúdo de sódio na pele, tanto em condição basal quanto após protocolo de depleção de sódio. Nossos resultados corroboram os dados previamente alcançados por MENEZES *et al.,* (não publicados) tendo em vista que os animais EB-OVX submetidos à sobrecarga salina apresentaram uma atenuação da hipernatremia causada no grupo OVX por este modelo, muito provavelmente, pela modulação positiva do estradiol sobre a expressão de glicosaminoglicanos, aumentando assim a capacidade "tamponante" da pele pelo sódio. Tal resposta é de elevado interesse do ponto de vista fisiológico quanto clínico, tendo em vista que mulheres após a menopausa são mais sensíveis às alterações cardiovasculares, renais e hepáticas mediadas pelo sódio, evidenciando a importância deste esteroide na capacidade "tamponante" que a pele exerceria sobre o sódio.

No que tange aos parâmetros cardiovasculares mensurados, observamos que o estrógeno reduziu a pressão arterial sistólica no grupo EB-OVX em condição basal, não havendo influência da sobrecarga salina neste parâmetro. No entanto, apesar de o estrógeno induzir uma redução da frequência cardíaca tanto em condição basal quanto com acesso à salina hipertônica, o protocolo de sobrecarga salina atenuou de forma significativa a bradicardia mediada pelo estrógeno.

Estudos prévios demonstraram que o tratamento com estradiol induz bradicardia em ratas OVX (JANKOWSKI *et al.*, 2001; EL-MAS & ABDEL-RAHMAN, 2009; MECAWI *et al.*, 2011). Por sua vez, JANKOWSKI *et al.*, (2001) sugeriu que a bradicardia mediada pelo estrógeno poderia estar correlacionada com as concentrações plasmáticas de ANP, já que o tratamento com estrógeno restaura as concentrações plasmáticas deste hormônio, assim como a expressão de seu RNAm e de seu conteúdo proteico no átrio, que poderia ser mediado pelo ER α. Entretanto, a ausência de diferenças nas concentrações plasmáticas de ANP entre os grupos OVX e EB-OVX no presente trabalho, apesar de estar de acordo com trabalhos previamente descritos (MECAWI *et al.,* 2011; VILHENA-FRANCO *et al.,* 2011) sugere que, pelo menos em parte, o ANP pode não estar implicado na resposta bradicárdica induzida pelo estrógeno que observamos neste estudo. Tal discrepância dos resultados, pode estar relacionada com as diferentes doses utilizadas nos estudos, já que JANKOWSKI e colaboradores (2001) utilizaram uma dose cerca de 2,5 vezes superior à que utilizamos no presente trabalho.

Por outro lado, EL-MAS & ABDEL-RAHMAN (2009) observaram redução na pressão arterial mediada pelo tratamento com estrógeno por duas semanas. Neste contexto, vários trabalhos sugeriram um papel hipotensor do estrógeno em mulheres e ratos (TOSTES *et al.,* 2003; DA COSTA *et al.,* 2004; GUO *et al.,* 2005; EL-MAS & ABDEL-RAHMAN, 2009; SHIH, 2009) com uma modulação negativa adicional importante na atividade do sistema nervoso simpático (MEDENLSOHN & KARAS, 1999). EL-MAS & ABDEL-RAHMAN (2009) também demonstraram uma redução no tônus vasomotor simpático mediado pelo estrógeno assim como um aumento na contratilidade miocárdica. Assim, podemos sugerir que tal redução na pressão arterial sistólica observada no presente trabalho possa ser mediada pela redução na atividade vascular simpática e, consequentemente, na resistência vascular periférica. Ainda, não observamos diferenças nas concentrações plasmáticas de angiotensina II e vasopressina (vasoconstritores) e ANP e ocitocina (vasodilatadores) entre os grupos OVX e EB-OVX em condições basais, como previamente descrito por MECAWI *et al.,* (2011) e VILHENA-FRANCO *et al.,* (2011), reforçando o possível papel do estradiol sobre o sistema nervoso simpático como causa da redução da pressão arterial sistólica e frequência cardíaca. Neste contexto, o NTS e o bulbo ventrolateral rostral, importantes áreas pontinas para o controle barorreflexo e das descargas simpáticas, estão implicados com o efeito inibitório que o estrógeno exerce no sistema nervoso simpático (SALEH *et al.,* 2000).

Ainda a respeito da ausência de alterações cardiovasculares induzidas pela sobrecarga salina do presente estudo, nós sugerimos que possa ser consequência do protocolo utilizado. Estudos prévios demonstraram que a ingestão de salina hipertônica como único fluido disponível poderia aumentar (CRUZ *et al.,* 2011) ou não (BEILIN *et al.,* 1970; KATOVICH *et al.,* 1984; SIMON, 2003; ADAMS *et al.,* 2008) a pressão arterial e frequência cardíaca em ratos. Entretanto a grande discrepância entre esses estudos está relacionada à concentração de solução salina utilizada assim como o período de tratamento. Entretanto, o nosso objetivo no presente estudo foi avaliar o impacto do tratamento com estradiol em ratos submetidos à desafios osmóticos crônicos, em um protocolo previamente estabelecido (VENTURA *et al.,* 2002; 2005). E, como observado, verificamos que o estrógeno atenuou o aumento da natremia induzida pelo protocolo de sobrecarga salina, tanto 3 quanto 15 dias de ingestão de NaCl 0,3 M como único fluido disponível.

No que tange às respostas hormonais à sobrecarga salina, verificamos que a elevada ingestão de sódio aumentou as concentrações plasmáticas de vasopressina e ocitocina, em ambos os períodos analisados. Estudos prévios demonstraram respostas vasopressinérgicas e ocitocinérgicas em resposta ao aumento na osmolalidade plasmática (BRIMBLE *et al.,* 1978; WADE *et al.,* 1983; VAN TOL *et al.,* 1987; ANTUNES-RODRIGUES *et al.,* 2004; VENTURA *et al.,* 2005). Entretanto, nós demonstramos que o estradiol não modula tais respostas induzidas pelo paradigma de sobrecarga salina. Apesar de por vezes controverso, existem vários estudos na literatura sobre as influências do estradiol na síntese e secreção de AVP e OT em resposta à vários estímulos (SKOWSKY *et al.,* 1979; AMICO *et al.,* 1981; BARRON *et al.,* 1986; MECAWI *et al.,* 2011; VILHENA-FRANCO *et al.,* 2011). A respeito da hiperosmolalidade induzida pelo protocolo de sobrecarga salina, também há discrepâncias a respeito dos efeitos do estrógeno: apesar de trabalhos descreverem uma redução no conteúdo hipofisário de AVP e OT tanto em ratas gonadectomizadas quanto intactas, os animais OVX exibem uma redução na expressão de RNAm para OT e AVP hipotalâmico em resposta à dieta hipersódica quando comparados às ratas intactas, fato este que foi restabelecido pelo tratamento com estradiol (CROWLEY & AMICO, 1993).

Entretanto, no presente estudo, apesar de observarmos um aumento nas concentrações plasmáticas de AVP e OT nos grupos submetidos à sobrecarga salina quando comparado aos seus respectivos controles, tais respostas não foram moduladas pelo estradiol, apesar de este

esteroide ter inibido o aumento na natremia induzida pela ingestão de salina hipertônica. VILHENA-FRANCO *et al.,* (2011) descreveram um importante incremento nas concentrações plasmáticas de AVP e OT mediadas pelo estradiol em resposta à expansão de volume extracelular (EVEC) quando comparado ao grupo OVX, sem diferenças na osmolalidade plasmática entre os grupos OVX e EB-OVX. A sobrecarga salina durante 5 dias induziu um estado hipernatrêmico similar em ratas intactas e OVX (CROWLEY & AMICO, 1993). Portanto, nossos resultados levantam a questão: por que as concentrações plasmáticas de AVP e OT estão aumentadas no grupo EB-OVX sendo que o tratamento com estradiol foi capaz de inibir a hipernatremia induzida pela sobrecarga salina?

Apesar da manutenção hidroeletrolítica estar principalmente relacionada ao sistema nervoso central, osmorreceptores periféricos podem sinalizar alterações em áreas cerebrais envolvidas com o balanço osmótico (OSBORN *et al.,* 2000). CARLSON *et al.,* (1997) demonstraram que a infusão intragástrica de salina hipertônica aumenta a secreção de vasopressina, sem alterações na osmolalidade plasmática. Ainda, a infusão hipertônica induziu um aumento na imunorreatividade para Fos (ir-Fos) no PVN, SON, NTS, LPBN e AP. Por sua vez, lesões na AP inibem o aumento da ir-Fos nos neurônios do PVN e, estudos eletrofisiológicos demonstraram que a área postrema é responsável pela estimulação dos osmorreceptores hepato-portais (KAHRILAS & ROGERS, 1984; CARLSON *et al.,* 1998). Já que ambos os receptores para estradiol são expressos na área postrema (LAFLAMME *et al.,* 1998; PAMIDIMUKKALA & HAY, 2003), podemos especular que este núcleo é um importante sítio para modular o aumento nas concentrações plasmáticas de AVP no grupo EB-OVX normonatrêmico, mesmo quando submetido à sobrecarga salina.

Estudos prévios demonstraram que a hipernatremia induzida por ingestão de solução salina 2 %, como único fluido disponível por 72 horas, induziu uma depleção no conteúdo proteico de ERβ em neurônios magnocelulares ir-Fos do PVN e SON de ratos machos, que poderia ser correlacionado com um possível aumento na secreção de AVP e OT já que a sinalização estrogênica mediada por ER β parece ser inibitória sobre a secreção vasopressinérgica e ocitocinérgica (SOMPONPUN & SLADEK, 2003). Entretanto, como não observamos diferenças nas concentrações plasmáticas de AVP e OT entre os grupos OVX e EB-OVX, podemos sugerir que a sinalização estrogênica mediada pelo ER β possa não participar da secreção desses hormônios neurohipofisários, apesar de PATISAUL *et al.,* (1999) ter demonstrado uma redução na expressão de ER β no PVN após tratamento com estradiol.

No mesmo contexto, apesar das controvérsias a respeito das modulações, vários estudos demonstram a importância do sistema nitrérgico no balanço hidroeletrolítico, sendo relatado que a estimulação osmótica aumenta a expressão de RNAm para a enzima óxido nítrico (NO) sintase (NOS), assim como para vasopressina e ocitocina (DA SILVA *et al.,* 2014). Trabalhos anteriores de nosso grupo demonstraram que o óxido nítrico inibe a secreção de AVP, OT e ANP em condições basais (REIS *et al.,* 2007; 2010). Adicionalmente, ratos machos com sobrecarga salina apresentaram um aumento na atividade da (NOS) nos núcleos PVN e SON e, pelo menos neste protocolo, o NO modulou a secreção de AVP e OT de forma distinta (VILLAR *et al.,*1994; KADEKARO *et al.,* 1997; VENTURA *et al.,* 2002, 2005).

NOS pode estar co-localizada com AVP e OT em neurônios do PVN e SON (SÁNCHEZ *et al.,* 1994; VILLAR *et al.,* 1994; YAMADA *et al.,* 1996) e, na fase final da gestação, BRUNTON *et al.,* (2008) observaram uma redução na atividade da NOS em neurônios do SON. Por outro lado, foi demonstrado previamente que, na fase final da gestação, a atividade da NOS estaria aumentada nos neurônios do PVN e SON e, apenas o tratamento com estrógeno não modulou a atividade da NOS em ambos os núcleos (POPESKI *et al.,* 1999). Assim, de acordo com os poucos (e controversos) dados, não podemos descartar uma possível participação nitrérgica no aumento das concentrações de AVP e OT em ratos

EB-OVX normonatrêmicos mesmo após protocolo de sobrecarga salina. Desta forma, mais estudos são necessários para elucidar essa hipótese.

Apesar de não observarmos diferenças na secreção de AVP e OT mediada pelo estrógeno nos animais submetidos à sobrecarga salina, este esteroide reduziu as concentrações plasmáticas de ANP 15 dias após o início do desafio osmótico. O potente papel natriurético do ANP assim como a sua modulação sobre a secreção de OT já é bem estabelecido (ANTUNES-RODRIGUES *et al.,* 1994). Adicionalmente, o estrógeno parece participar da secreção atrial do ANP em certas condições (BACK *et al.,* 1989; DENG & KAUFMAN, 1993). Por exemplo, apesar de o estradiol não modular a secreção de ANP induzida por hemorragia hipovolêmica (MECAWI *et al.,* 2011), ratas EB-OVX submetidas ao protocolo de EVEC hipertônica apresentaram uma potencialização da secreção de ANP, como resposta ao aumento no volume sanguíneo e na osmolalidade (VILHENA-FRANCO *et al.,* 2011). Em nosso protocolo experimental, como o grupo EB-OVX não apresentou alterações na natremia relacionada ao protocolo de sobrecarga salina, a ausência de alterações nas concentrações plasmáticas de ANP parece plausível. Entretanto, como a secreção de ANP reduziu na fase tardia do protocolo de sobrecarga salina (15 dias), provavelmente relacionado à redução do volume sanguíneo em resposta à este protocolo experimental (DE BOLD *et al.,* 1981; ANTUNES-RODRIGUES *et al.,* 2004), as respostas natriuréticas observadas em ratas OVX podem estar principalmente relacionadas ao aumento nas concentrações plasmáticas de ocitocina.

6. CONCLUSÕES

Com base em nossos dados, demonstramos que a preferência por sódio no paradigma de livre escolha utilizado, parece não ser modulada pelo estradiol apesar de ratas EB-OVX serem mais sensíveis à salina isotônica, reduzindo assim a sua preferência. Observamos também uma atenuação na hipernatremia induzida pela sobrecarga salina em ratas OVX submetidas ao tratamento com estradiol. Ainda, apesar de o estradiol não modular o aumento nas concentrações plasmáticas de vasopressina e ocitocina, verificamos que o esteroide atenua e inibe a redução nas concentrações plasmáticas de angiotensina II e peptídeo natriurético atrial. Essas evidências sustentam o conceito do estradiol como um importante fator contra os efeitos deletérios de uma dieta com elevado conteúdo de sódio. Estudos futuros são necessários para elucidar as vias centrais e periféricas através das quais o estradiol exerce esse papel.

CAPÍTULO II

INFLUÊNCIA DA DIETA HIPOSSÓDICA NAS RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS, NEUROENDÓCRINAS E CARDIOVASCULARES EM RATOS SUBMETIDOS AOS PROTOCOLOS FUROCAP E ISOPROTERENOL

RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi estudar a influência de dieta hipossódica por 4 dias consecutivos em ratos submetidos à dois paradigmas: depleção aguda de sódio [através do modelo de associação de administrações simultâneas de Furosemida e Captopril (FuroCap)] ou estimulação β-adrenérgica (através da administração de Isoproterenol). Para tanto, ratos Wistar machos com aproximadamente 75 dias de idade foram acondicionados em gaiolas metabólicas para adaptação por 3 dias consecutivos, com ração normossódica, água e solução de salina hipertônica *ad libitum*. Ao final do período de adaptação, os animais foram randomicamente divididos para receberem dieta hipossódica (NaCl < 0,1%) ou dieta normossódica (NaCl 0,1%) durante 4 dias consecutivos, com acesso *ad libitum* à água. Ao final deste período, os animais foram submetidos a: i) FuroCap [administração subcutânea de furosemida (10 mg/Kg) associada à administração de captopril (5 mg/Kg) ou NaCl 0,9 % como veículo (Controle; 0,1mL/100g de peso)] ou, ii) administração subcutânea de Isoproterenol (100 μg/kg) ou solução salina 0,9 % como veículo (Controle, 0,1mL/100g de peso)]. A dieta hipossódica *per se* aumentou a ingestão de água e salina hipertônica quando comparado ao grupo com acesso à dieta normossódica. Adicionalmente, o aumento na ingestão de fluidos induzido pela associação entre Furosemida e Captopril foi exacerbado pela dieta hipossódica, quando comparado ao grupo submetido ao FuroCap com dieta normossódica. Sobre os parâmetros cardiovasculares, observamos que a dieta hipossódica potencializou a diminuição na pressão arterial e o aumento na frequência cardíaca induzidos pela depleção aguda de sódio. Ainda, apesar de a dieta hipossódica e/ou o FuroCap não influenciarem o a secreção de vasopressina, a dieta hipossódica inibiu o aumento nas concentrações plasmáticas de ocitocina e atenuou o aumento nas concentrações plasmáticas de angiotensina II, enquanto que exacerbou a redução nas concentrações plasmáticas de peptídeo natriurético atrial, quando comparado ao respectivo grupo submetido ao FuroCap mas com dieta normossódica. No que tange à estimulação β-adrenérgica, o Isoproterenol aumentou a ingestão de água e, posteriormente, de salina quando comparado ao respectivo grupo controle. Por sua vez, a dieta hipossódica exacerbou o aumento na ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzidos pelo Isoproterenol quando comparado ao respectivo grupo submetido à administração de Isoproterenol mas com acesso à dieta normossódica. Ao contrário do que ocorreu no protocolo de depleção aguda de sódio, apesar de o Isoproterenol induzir redução na pressão arterial e taquicardia reflexa, a dieta hipossódica não modulou tais respostas induzidas pela estimulação β-adrenérgica. Ainda, apesar de a administração de Isoproterenol não influenciar significativamente as concentrações plasmáticas de vasopressina, a estimulação β-adrenérgica aumentou as concentrações de ocitocina, mas, tal resposta não foi modulada pela dieta hipossódica. Por outro lado, a dieta hipossódica por 4 dias consecutivos atenuou o aumento nas concentrações plasmáticas de angiotensina II e peptídeo natriurético atrial induzidos pelo Isoproterenol, quando comparado ao respectivo grupo com dieta normossódica. Em conjunto, a dieta hipossódica potencializa os comportamentos ingestivos induzidos pela depleção aguda de sódio (FuroCap) e pela estimulação β-adrenérgica (Isoproterenol) mas atenua fatores neuroendócrinos influenciados por esses protocolos.

ABSTRACT

The objective of the present study was to evaluate the influences of a hypossodic diet during four consecutive days in Wistar rats submitted to two paradigms: acute sodium depletion through a model of simultaneous administrations of Furosemide and Captopril (FuroCap) or β-adrenergic stimulation (through Isoproterenol administration). For this, rats with approximately 75 days old were conditioned in metabolic cages for adaptation during 3 consecutive days, with normal feed, water and hypertonic saline solution *ad libitum*. At the end of the adaptation period, the animals were randomly divided to receive the low sodium diet (NaCl <0.1%) or normal sodium diet (0.1% NaCl) during 4 consecutive days, with access to free water. By the end of this period, the rats were submitted to i) subcutaneous Furosemide (10 mg / kg) associated with captopril (5 mg / kg) or 0.15 M NaCl as vehicle (Control, 0.1 ml / 100 g body weight)], or ii) subcutaneous administration of Isoproterenol (100 μg / kg) or 0.15 M saline solution as vehicle (Control, 0.1mL / 100 g weight)]. The low sodium diet, *per se*, increased water and hypertonic saline intake when compared to the normoesodic diet group. In addition, the increase in fluid intake induced by the association between Furosemide and Captopril was exacerbated by the hyposodic diet, when compared to the group submitted to FuroCap with a normosodic diet. Regarding the cardiovascular parameters, we observed that low sodium diet potentiated the reduction in mean arterial pressure as well as the increase in heart rate induced by acute sodium depletion. Also, although the hyposodic diet and / or FuroCap did not influence vasopressin secretion, low sodium diet inhibited the increase in oxytocin and attenuated the increase in angiotensin II plasma concentrations, besides have exacerbated the reduction in plasma concentrations of atrial natriuretic peptide, when compared to the respective group submitted to FuroCap with normosodic diet. About the β-adrenergic estimulation, Isoproterenol increased water and, later, hypertonic saline intake when compared to the respective control group. On the other hand, the low sodium diet exacerbated the increase in water and 0.3 M NaCl intake induced by Isoproterenol when compared to the respective group submitted to the administration of Isoproterenol with normossodic diet. Although Isoproterenol has induced hypotension and reflex tachycardia, the low sodium diet did not modulate such responses induced by β-adrenergic stimulation. Furthermore, although an administration of Isoproterenol did not significantly influence vasopressin plasma concentrations, the β-adrenergic stimulation increased oxytocin plasma concentrations, with no modulation by low sodium diet. On the other hand, the hyposodic diet for 4 consecutive days attenuated the increase the angiotensin II and atrial natriuretic peptide induced by Isoproterenol, when compared to the respective group with normosodic diet. Together, a hyposodic diet potentiates ingestive behaviors induced by acute sodium depletion (FuroCap) and β-adrenergic stimulation (Isoproterenol) but attenuates neuroendocrine factors influenced by these protocols.

1 INTRODUÇÃO

A osmolalidade e o volume dos fluidos corporais são mantidos em uma estreita faixa de variação através de uma complexa rede de mecanismos que envolve o sistema neuroendócrino, autonômico, cardiovascular, comportamental e renal (FITZSIMONS, 2008). Para que esses sistemas mantenham a homeostase hidroeletrolítica, faz-se necessário o trabalho harmônico dos seguintes fatores: sensores de volume (mecanorreceptores de volume ou pressão) ou de osmolalidade [osmorreceptores ou sensores para íon sódio (Na^+)] localizados em áreas estratégicas, tanto do sistema nervoso central quanto em órgãos periféricos; núcleos específicos no sistema nervoso central responsáveis pela captação, análise e integração das informações e a consequente indução de respostas adequadas; especificidade de neurotransmissores, neuromoduladores e neuropeptídios envolvidos no controle do balanço do Na^+ (ANTUNES RODRIGUES *et al.*, 2004; NODA & SAKUTA, 2013; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2014). Neste contexto, uma das características mais notáveis dos animais é a sua capacidade de aferir as alterações no meio interno e, então, gerar respostas comportamentais específicas para restaurar a homeostase que, no que tange à regulação hidroeletrolítica, são a sede e apetite por sódio (MCKINLEY & JOHNSON, 2004; LEIB *et al.*, 2016; ALHADEFF & BETLEY, 2017).

A sede consiste em uma percepção subjetiva que induz os animais a ingerir água sendo, desta forma, um dos mecanismos que mantêm a homeostase dos fluidos corporais. Assim, a sua manifestação fisiológica é caracterizada pela combinação de sensações que aumentam com a desidratação e diminuem com a reidratação. Sendo essencial para a sobrevivência, a percepção da necessidade de ingerir água pode surgir por diversas razões, mas principalmente como uma resposta regulatória à redução no conteúdo de fluidos corporais, à hipertonicidade do fluido extracelular ou ao aumento nas concentrações plasmáticas de hormônios dipsogênicos (MCKINLEY & KIM JOHNSON, 2004; FITZSIMONS, 1998). Apesar de a perda de água do organismo geralmente ocorrer tanto a partir do compartimento intracelular quanto do extracelular, tais perdas não ocorrem necessariamente de forma igual a partir de cada um dos compartimentos. A perda de água junto com sódio (o principal soluto do fluido extracelular) reduz o fluido extracelular de forma proporcionalmente maior quando comparado à perda somente de água, que pode ocorrer, por exemplo, com a perda de fluidos a partir do trato gastrointestinal (vômitos ou diarreia). Quando esta perda de fluido ocorre sob a forma isotônica, a depleção de fluidos se dará inteiramente a partir do líquido extracelular; por outro lado, se o fluido hipertônico for adicionado ao compartimento extracelular, uma depleção osmótica irá ocorrer do compartimento intra para o extracelular, de forma que este último será expandido (FITZSIMONS, 1998; LEIB *et al.*, 2016).

Uma gama de respostas compensatórias, com o objetivo de minimizar as alterações no volume e na composição dos fluidos corporais, ocorre a partir da depleção do compartimento intra ou extracelular, como por exemplo secreção de vasopressina, estimulação do sistema renina-angiotensina, ativação do sistema nervoso simpático, redução do soluto renal e da excreção de água (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2014). Entretanto, tais mecanismos não são capazes de restaurar os fluidos corporais para o estado original, já que as perdas devem ser repostas. Assim, a motivação para beber (representada pelo estado de sede) é um componente importante da sequência coordenada de respostas fisiológicas que mantêm volume e composição dos fluidos corporais (STANHEWICZ & KENNEY, 2015; LEIB *et al.*, 2016).

Já o apetite por sódio, isto é, o comportamento para busca e ingestão de sal, é uma resposta específica estimulada pela deficiência de sódio. O apetite por sódio é muito bem

caracterizado em animais que fazem busca deste elemento após períodos de deficiência, procurando-o ativamente pelo ambiente com auxílio de órgãos sensoriais específicos para identificá-lo (KOPKA *et al.*, 2000. STANHEWICZ & KENNEY, 2015; ALHADEFF & BETLEY, 2017). A água total do organismo depende da quantidade de sódio presente no espaço extracelular, assim como do volume adequado de água para que a isotonicidade seja alcançada. Desta forma, a ingestão de sódio é necessária para a hidratação adequada assim como para o equilíbrio dos fluidos.

A ingestão de sódio em ratos pode ocorrer de forma espontânea, ou seja, quando não há necessidades fisiológicas para tal ingesta, geralmente relacionada com as ingestões diárias. Já quando o apetite por sódio é deflagrado quando há deficiência deste íon, a ingesta deste íon ocorre através de uma mudança hedônica, onde as concentrações aversivas ao paladar do animal (hipertônica) tornam-se aceitáveis (STANHEWICZ & KENNEY, 2015).

1.1 Sistemas Neuroendócrinos que Influenciam a Sede e Apetite por Sódio

É vastamente conhecida a influência do sistema renina-angiotensina (SRA) como um constituinte essencial dos mecanismos mediadores do equilíbrio hidroeletrolítico, principalmente no que diz respeito ao processamento das respostas relacionadas à sede e apetite ao sódio (JOHNSON & THUNHORST, 1997; FITSZIMONS, 1998; REIS, 2007; BEGG, 2017). Agindo sobre o sistema nervoso central (SNC) a angiotensina II (ANG II) possui uma potente ação dipsogênica e natriorexigênica (FITZSIMONS, 1998; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004; MECAWI *et al.*, 2007, 2008, 2010), além de estar envolvida no controle da excreção renal de sódio diretamente (controlando principalmente a hemodinâmica renal) e indiretamente (estimulando a secreção da aldosterona pela zona glomerulosa da glândula adrenal, que possui potente ação antinatriurética) (KASCHINA & UNGER, 2003, CANDELA & YUCHA, 2004).

Os efeitos da ANG II são mediados pelos seus receptores do tipo 1 e 2 (AT1 e AT2, respectivamente) (PREMER *et al.*, 2013). Particularmente, os receptores AT1 são responsáveis pelos principais efeitos da ANG II em adultos, tais como a secreção de aldosterona, a contração vascular, a sede e o apetite ao sódio (KASCHINA & UNGER, 2003). Neste contexto, a microinjeção de antagonista do receptor AT1 aboliu o efeito ingestivo da ANG II, o que não ocorre após a administração de antagonista dos receptores AT2 (BERESFORD & FITZSIMONS, 1992). Entretanto, apesar de ANG II periférica não atravessar livremente a barreira hematoencefálica, a ANG II é capaz de induzir a sede e o apetite ao sódio devido à presença de receptores AT1 no órgão subfornicial (SFO) e órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), que são desprovidos de barreira hematoencefálica (FRY & FERGUSON, 2007). Adicionalmente, além da ação cerebral da ANG II circulante induzindo respostas dipsogênicas e natriorexigênicas, todos os componentes do SRA são expressos no sistema nervoso central, sobretudo em importantes núcleos cerebrais relacionados ao comportamento apetitivo como SFO, OVLT, núcleo pré-óptico mediano (MnPO), núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supraóptico (SON), dentre outros (PREMER *et al.*, 2013).

A manutenção do balanço de água e eletrólitos pelo organismo também é influenciada pelo eixo hipotálamo – neurohipofisário, que tem função importante no controle do volume e osmolalidade do líquido extracelular. Esse eixo é basicamente formado por neurônios magnocelulares, cujos corpos celulares localizam – se no PVN e SON hipotalâmicos, e seus axônios seguem formando tratos que terminam na formação da neurohipófise, de onde são secretados para a corrente sanguínea (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2013; MECAWI *et al.*, 2015). Além da ação periférica dos hormônios vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) secretados pelos neurônios magnocelulares do PVN e SON, grupamentos de neurônios parvocelulares no PVN também sintetizam AVP e OT que são liberados no sistema nervoso

central (SNC) como neurotransmissores / neuromoduladores, exercendo importante papel em diversos sistemas neuroendócrinos, inclusive no balanço hidrossalino (SWANSON & SAWCHENKO, 1981; VERBALIS *et al.,* 1995; ENGELMAN *et al.,* 2004).

A síntese e secreção de AVP são estimuladas principalmente pela ação da ANG II (KHANMORADI & NASIMI, 2016): sabe-se que neurônios magnocelulares do PVN e SON co – expressam AVP e AT1 e, a administração periférica e central de angiotensina II estimula a secreção de AVP (SAAVEDRA, 1992). Entretanto, um pequeno aumento na osmolalidade plasmática (da ordem de 2%) ou uma redução do volume circulante / pressão arterial (da ordem de 10 %) são capazes de estimular a atividade dos neurônios vasopressinérgicos (ANTUNES-RODRIGES *et al.,* 2004; MECAWI *et al.,* 2011; VILHENA-FRANCO *et al.,* 2011). Além da ação vasoconstrictora, mediada pelos receptores de vasopressina do tipo 1a (V_1a) na musculatura lisa dos vasos sanguíneos (KOSHIMIZU *et al.,* 2006), o AVP tem uma intensa ação antidiurética, atuando em seus receptores do tipo V_2 localizados nos ductos coletores renais, estimulando a mobilização e inserção de vesículas de aquaporinas (tipo 2) na membrana luminal das células tubulares deste segmento, aumentando a reabsorção renal de água (YAMAMOTO *et al.,* 1995). Adicionalmente, ainda não há evidências que comprovem o envolvimento da vasopressina na sede e apetite ao sódio (FITZSIMONS, 1998).

Em relação à OT, além de sua síntese e secreção serem induzidas pela contração uterina e sucção mamilar, os mesmos fatores básicos que estimulam a secreção de AVP também induzem a síntese e secreção de OT, de forma que a OT plasmática possui uma importante função sobre o metabolismo de água e sódio corporal (ANTUNES-RODRIGUES *et al.,* 2004). No que diz respeito à secreção de OT relacionada ao equilíbrio hidrossalino, sabe – se que tal hormônio apresenta um efeito natriurético direto e indireto, ao estimular a secreção do peptídeo natriurético atrial (ANP) a partir dos cardiomiócitos atriais (JANKOWSKI *et al.,* 1998). Além disso, apesar de ainda controversos, a OT parece exercer uma ação inibitória sobre o apetite específico ao sódio, inclusive o induzido pela ANG II (STRICKER & VERBALIS, 1996; FITZSIMONS, 1998; FITTS *et al.,* 2003).

Já em relação ao peptídeo natriurético atrial, sabe – se que é sintetizado pelos cardiomiócitos atriais e secretado sob o estímulo do estiramento da parede do átrio direito, em decorrência do aumento do volume circulante e do retorno venoso (HEDNER *et al.,* 1987; DE BOLD, 1982). O ANP exerce um potente efeito natriurético, agindo sobre o túbulo contorcido distal do néfron (DE BOLD *et al.,* 1981), e pode influenciar o controle neuroendócrino do balanço hidrossalino, agindo via receptores localizados em órgãos circunventriculares (MCKINLEY *et al.,* 1998). Como também é expresso em importantes áreas do SNC relacionadas ao controle do apetite ao sódio [como PVN (PALKOVITS *et al.,* 1987), AV3V e NTS (SKOFITSCH *et al.,* 1985)] o ANP cerebral parece inibir o comportamento ingestivo (ANTUNES-RODRIGUES *et al.,* 1985a), atenuando ou inibindo a ingestão de fluidos induzida pela angiotensina II (ANTUNES-RODRIGUES *et al.,* 1985b; EHRLICH & FITTS, 1990), de forma que a inibição da ação cerebral deste peptídeo pode estar envolvida com a deflagração do apetite ao sódio.

1.2 Modelos Experimentais para o Estudo da Sede e Apetite por Sódio

A ingestão de água, assim como a sede, são continuamente estudadas através de vários protocolos experimentais, como privação de água, sede induzida por Isoproterenol, estímulos osmóticos induzidos pela injeção de salina hipertônica e depleção de fluido extracelular induzida pela administração de fluido coloidosmótico (LEHR *et al.,* 1967; RETTIG *et al.,* 1981; SALISBURY & ROWLAND, 1990; FITZSIMONS, 1998; BADAUÊ-PASSOS *et al.,* 2001; DE-LUCA *et al.,* 2000; MECAWI *et al.,* 2008). Particularmente, a utilização de agonistas β-adrenérgicos (como o Isoproterenol) é um potente modelo para avaliação da sede, tendo em vista que tal estímulo se dá tanto pela ativação do sistema renina-angiotensina

diretamente (através dos adrenorreceptores β-adrenérgicos localizados no aparelho justaglomerular), quanto indiretamente, através da redução na resistência vascular periférica da musculatura esquelética e leitos vasculares renal e mesentérico (FITZSIMONS, 1998).

Por outro lado, a ingestão de sal e o apetite por sódio podem ser induzidos através de protocolos de depleção de sódio, tais como após diálise peritoneal, depleção de sódio por 24 horas (furosemida ou dieta hipossódica) e depleção aguda de sódio induzida pelo protocolo FuroCap (FITTS & MASSON, 1989; FITZSIMONS, 1998; BADAUÊ-PASSOS *et al.*, 2001; FRANCHINI *et al.*, 2002; BADAUÊ-PASSOS *et al.*, 2003; MECAWI *et al.*, 2008; FONSECA *et al.*, 2009).

O protocolo FuroCap, em particular, induz um aumento na ingestão de sal mediado pela maior geração de angiotensina II (ANG II) central associada com uma redução na razão entre angiotensina II e angiotensina I (ANG I) ANG II/ANG I periférica e consequente redução dos níveis circulantes de ANG II (FITTS & MASSON, 1989; FITZSIMONS, 1998). O captopril é um inibidor da atividade da enzima conversora de angiotensina (ECA) que consegue atravessar a barreira hematoencefálica dependendo da dose utilizada (SCHIFFRIN & GENEST, 1982). Desta forma, a utilização de captopril em doses baixas (5 mg/Kg) no protocolo FuroCAP, não é suficiente para que a ECA no sistema nervoso central seja inibida, atuando apenas na síntese periférica de ANG II e, consequentemente, aumentando as concentrações plasmáticas/disponibilidade de ANG I. Além disso, a associação de baixas doses de captopril com furosemida potencializa o aumento na conversão cerebral de ANG II, já que aumenta a atividade da renina plasmática e, consequentemente, a síntese de ANG I (THUNHORST *et al.*, 1994).

Desta forma, tanto a estimulação β-adrenérgica (através de Isoproterenol) quanto a depleção aguda de sódio (através do FuroCap) são protocolos interessantes para os estudos da sede e apetite ao sódio mediados pela ANG II cerebral, sem a necessidade de fazer uso de protocolos mais invasivos, como por exemplo a administração intracerebroventricular de ANG II, já que a administração periférica de ANG II não é tão eficiente na indução de sede e apetite ao sódio.

No presente trabalho, nós propomos novas abordagens para o estudo da ingestão de água e sal, introduzindo a dieta hipossódica aos protocolos de estimulação beta-adrenérgica e FuroCap, e avaliando de que forma esta nova abordagem pode ajudar a elucidar os mecanismos por trás destes comportamentos motivacionais, cardiovasculares e endócrinos.

2. OBJETIVOS

Levando em consideração os mais diversos protocolos utilizados para induzir sede e apetite por sódio, o objetivo geral do presente trabalho foi avaliar de que forma a dieta hipossódica por 4 dias consecutivos influenciaria os resultados em protocolos já estabelecidos, como a depleção aguda de sódio (FuroCap) e estimulação β-adrenérgica (através de Isoproterenol).

Especificamente, tivemos como objetivos:

- Avaliar os perfis de ingestão de água e solução salina hipertônica em animais submetidos à administração de furosemida associada à captopril (FuroCap) ou à estimulação β-adrenérgica (Isoproterenol) com acesso à dieta normossódica ou hipossódica por 4 dias consecutivos
- Verificar se a dieta hipossódica durante quatro dias consecutivos influencia as alterações na pressão arterial média e na frequência cardíaca induzida pela depleção aguda de sódio e pela estimulação β-adrenérgica.
- Estudar as respostas dos hormônios vasopressina, ocitocina, angiotensina II e peptídeo natriurético atrial à administração de FuroCap ou Isoproterenol, e avaliar se a dieta hipossódica por 4 dias consecutivos influencia tais respostas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais e Manutenção

Ratos Wistar (machos), pesando 300 a 320 g (com aproximadamente 75 dias de idade), obtidos junto ao Biotério de Criação do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis – ICBS – UFRRJ), foram mantidos em caixas coletivas (contendo cinco animais cada) no Biotério de Manutenção do DCFis (ICBS – UFRRJ), em condições de fotoperíodo de 12/12 horas (luz acesa entre as 06:00 e as 18:00 horas), temperatura de 22 ± 2ºC, e com acesso *ad libitum* à água e à ração. Para minimizar o estresse inespecífico, os ratos foram manuseados diariamente durante a semana anterior aos experimentos. Por sua vez, para minimizar possíveis interferências da variação circadiana da secreção hormonal, os experimentos foram realizados no período da manhã, entre as 07:00 – 11:00 horas.

A manipulação dos animais e os procedimentos experimentais foram submetidos e avaliados junto à Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ (COMEP – UFRRJ) e realizados de acordo com o "*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals"* publicado por *US National Institutes of Health* (*NIH, Publication No. 85-23*, revisado em 1996) e com a legislação brasileira para experimentação animal (Lei nº 11794, de 8 de outubro de 2008).

3.2 Cirurgia

Para a cirurgia, os ratos foram submetidos à anestesia pela injeção intraperitoneal (*ip*) de ketamina (100 mg / kg, Agener®, Brasil) associada à xilazina (20 mg / kg, Dopaser®, Espanha). No período pós-cirúrgico, os animais permaneceram em um local aquecido até a recuperação da anestesia e receberam uma dose profilática de antibiótico veterinário (Fort Dodge, Brasil). Em seguida, os animais foram recolocados em suas caixas coletivas e reconduzidos ao Biotério de Manutenção do DCFis (ICBS – UFRRJ), onde permaneceram por um período de 3 a 7 dias, nas mesmas condições citadas anteriormente.

3.2.1 Canulação da artéria femoral

Para a mensuração dos parâmetros cardiovasculares, os animais foram previamente submetidos à canulação da artéria femoral direita, sob protocolo anéstésico mencionado anteriormente. Uma cânula de polietileno (PE-10 conectada à uma PE-50; BD Intramedic) foi inserida na artéria femoral e então, exteriorizada na região cervical dorsal. Logo em seguida, a cânula foi lavada e preenchida com solução de salina isotônica heparinizada (100 IU/ml, Liquemine, Roche) a fim de prevenir possíveis obstruções. Os animais permaneceram em recuperação durante 24 horas, para então, os procedimentos experimentais serem realizados.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Estudo em gaiola metabólica

Cerca de sete dias antes dos experimentos, os animais foram acondicionados nas gaiolas metabólicas para adaptação, com ração e água *ad libitum*. A fim de avaliarmos as respostas dipsogênicas e natriorexigênicas durante os procedimentos experimentais, água e solução salina hipertônica (0.3 M) foram oferecidos aos animais, em bebedouros volumétricos, em um paradigma de livre escolha. A ingestão de fluidos está expressa como mL/100g de peso corporal/24 horas (MECAWI *et al.*, 2007; 2008; 2010).

3.3.3 Coleta de sangue

O sangue foi coletado através de decapitação, em tubos em gelo contendo heparina (para dosagens de vasopressina e ocitocina) ou inibidores de peptidases [fluoreto de

fenilmetilsulfonil (PMSF) 1 mM, benzoato de *p*-hidroximercúrio 1 mM, 10-fenantrolina 30 mM, pepstatina A 1 mM e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 7,5%, em um volume de 50 µl/mL de sangue] para as dosagens de ANP e ANG II. O plasma foi obtido após a centrifugação por 20 minutos, 3000 rotações/min a 4 ºC e estocado a -20 ºC, até o momento das análises.

3.4 Métodos de Análises

3.4.1 Extração de hormônios do plasma

O AVP e OT foram extraídos do plasma com acetona e éter de petróleo: um mL de plasma foi transferido para um tubo contendo 2 ml de acetona gelada (MercK, Brasil), seguido por agitação de 30 segundos e centrifugação (2500 rpm, 25 min, 4 °C); a seguir, o sobrenadante foi decantado para um tubo contendo 2 mL de éter de petróleo (Reagen, Brasil), sendo submetido à agitação e reservado durante 2 minutos; o sobrenadante (éter de petróleo) foi desprezado por aspiração e o líquido restante (acetona) contendo o AVP e OT foi submetido ao processo de liofilizacão. No momento do ensaio, o produto liofilizado foi ressuspenso com 250 µL de tampão do ensaio.

Os hormônios ANG II e ANP foram extraídos a partir de 1 mL de plasma acidificado com 2 mL de ácido trifluoroacético (TFA; Sigma-Aldrich, EUA) 0,1% em colunas Bond-Elut (Peninsula Laboratories, EUA). Para tanto, as colunas foram pré-ativadas com 4 mL de uma solução de acetonitrila a 60% (Merck, EUA) diluída em TFA 0,1% seguido de 20 mL de TFA 0,1%. Em seguida, as amostras foram aplicadas individualmente nas colunas e lavadas com mais 20 mL de TFA 0,1%. Os peptídeos absorvidos foram então eluídos em 3 mL de uma solução a 60% de acetonitrila em TFA 0,1%, sendo coletados e liofilizados. No momento do ensaio, o liofilizado foi ressuspenso em 400 µL de tampão de ensaio.

Todos os procedimentos de extração foram realizados sobre gelo. Para determinar a eficiência da extração dos hormônios pelos métodos utilizados, uma quantidade de (~ 25.000 cpm) do peptídeo marcado (com ^{125}I) foi adicionada a um mL de plasma, o qual foi submetido às extrações, como descrito acima. Os sobrenadantes e os precipitados, gerados em cada uma das etapas da extração, foram analisados no contador Gama e, a partir dos valores de suas radioatividades obtidas, foi calculada a proporção do hormônio recuperado no final do processo de extração. A extração foi considerada eficiente quando a porcentagem de recuperação do hormônio marcado foi acima de 90%.

3.4.2 Dosagens hormonais

Todas as dosagens hormonais foram realizadas através de radioimunoensaios específicos usando as técnicas descritas por ELIAS *et al.,* (1998), HAANWINCKEL *et al.,* (1995), GUTKOWSKA *et al.,* (1984) e BOTELHO *et al.,* (1994) para AVP, OT, ANP e ANG II, respectivamente. Os anticorpos específicos para ANG I e II, AVP e OT foram obtidos a partir da Peninsula Inc. (ANG II: T4007; AVP: T4561; e OT: T4084), e aquele para ANP foi gentilmente cedido por Jolanta Gutkowska (Universidade de Montreal, Canadá). Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata.

Todos os ensaios/dosagens foram realizados em duplicata. A sensibilidade do ensaio e o coeficiente de variação intra- e inter-ensaio foram: 0,7 pg/mL, 4,8% e 10,0% para ANP; 0,5 pg/mL, 14,9% e 27,1% para ANG II; 0,8 pg/mL, 7,7% e 11,9% para AVP; e 0,9 pg/mL, 7,0% e 12,6% para OT.

3.4.3 Aferição da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM, em mmHg) e a frequência cardíaca (FC, em batimentos por minuto, bpm) foram obtidos 24 horas após a canulação, com os animais

recuperados, acordados e livres para se movimentar. Para tanto, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão (MLT0380/D, AD Instruments, EUA) e deste a um sistema de aquisição de dados (BIOPAC System, EUA); logo após a conexão, os animais permaneceram por um período de adaptação de 30 minutos para, logo em seguida, realizarmos os registros da PAM e FC ao longo dos próximos 35 minutos.

3.5 Protocolo Experimental

Ratos Wistar machos foram acondicionados em gaiolas metabólicas individuais 7 dias antes do experimento, com água, solução salina hipertônica (0,3 M) e ração (Rhoster, Brasil) *ad libitum*. Após 3 dias de adaptação, os animais foram subdivididos em dois grupos: i) um grupo de animais permaneceu com acesso *ad libitum* à água e ração normossódica (NaCl 1%) e, ii) o outro grupo teve acesso *ad libitum* à água e ração hipossódica (NaCl < 0,1%), ao longo de quatro dias consecutivos (Figura 5).

Ao final dos quatro dias com dieta hipo ou normossódica, ambos os grupos foram randomicamente distribuídos para serem submetidos àos seguintes protocolos experimentais:

1. Protocolo FuroCap: administração subcutânea de furosemida (Hoechst Marion Russel, Brazil; 10 mg/Kg) associada à administração de captopril (5 mg/Kg) ou administração subcutânea de solução salina isotônica, 0,9 % (Controle; 0,1mL/100g de peso)
2. Estimulação beta-adrenérgica: administração subcutânea de DL-Isoproterenol (ISO; Sigma, 100 μg/kg) ou administração subcutânea de solução salina 0,9% (Controle; 0,1mL/100g de peso).

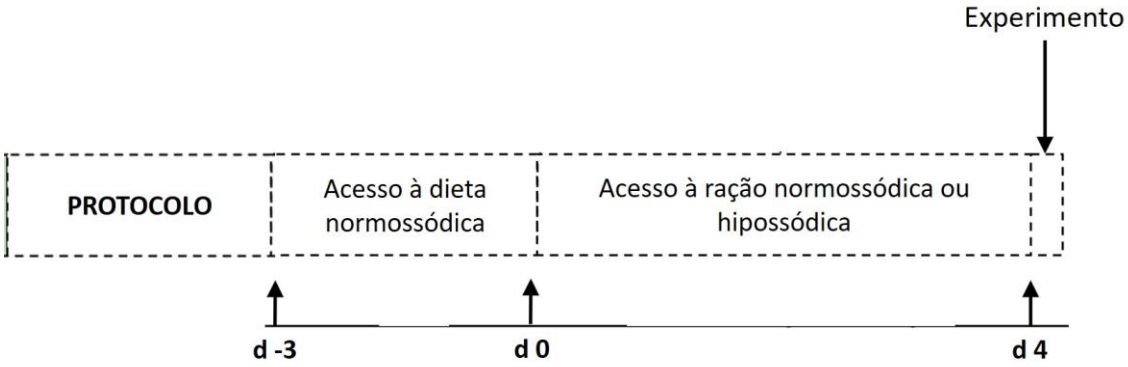


Figura 5: Representação esquemática dos procedimentos experimentais. *Ratos Wistar foram colocados em gaiolas metabólicas para adaptação por três dias. Ao final deste período (dia 0), os animais foram randomicamente distribuídos para receberem ração normossódica (NaCl 1%) ou ração hipossódica (NaCl < 0,1%) ad libitum, além de bebedouros graduados com água, por quatro dias consecutivos. Ao final deste período (dia 4) os animais foram submetidos à administração de FuroCap (Furosemida 10 mg/Kg + Captopril 5 mg/Kg) ou salina ou, à estimulação β-adrenérgica com Isoproterenol (100 μg/kg) ou veículo, para serem submetidos às seguintes avaliações comportamental, cardiovascular e neuroendócrina*

Após as administrações, os animais foram submetidos às seguintes avaliações:

- Avaliação comportamental: imediatamente após as injeções, os animais foram recolocados na gaiola metabólica, contendo dois bebedouros graduados (um com água e outro com solução de salina hipertônica (0,3 M). Os volumes ingeridos foram mensurados 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos após as injeções.
- Avaliação cardiovascular: para esta análise, os animais (submetidos à canulação da artéria femoral 24 horas antes da realização do experimento) foram conectados aos aparelhos para aferição dos dados cardiovasculares 30 minutos antes das injeções. Os

últimos 5 minutos de adaptação foram registrados (como registro basal). Logo em seguida (tempo 0) os animais foram submetidos às administrações (FuroCap ou ISO), e as mensurações foram realizadas após 1, 2, 5, 10 e 30 minutos.

- Avaliação neuroendócrina: imediatamente após as injeções, os animais foram recolocados na gaiola metabólica, sem acesso à fluidos. Após 60 minutos, os animais foram eutanasiados por decapitação, e o sangue coletado para as análises posteriores através de radioimunoensaio.

3.6 Análise Estatística

Os dados foram analisados através de teste "t" de Student ou por Análise de Variância (ANOVA) duas ou três vias, seguido pelo pós-teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Os dados estão expressos como media ± erro padrão da media (EPM); em todas as comparações, o nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada pelo software Statistica (versão 9.0, Statsoft, EUA).

4 RESULTADOS

4.1 Avaliação das Respostas Comportamentais, Cardiovasculares e Neuroendócrinas em Ratos Submetidos ao Protocolo FuroCap Modificado

Na figura 6 observamos os comportamentos de ingestão de água (Figura 6A) e de solução de salina hipertônica (Figura 6B) em animais submetidos ao protocolo FuroCap padrão (com acesso à dieta normossódica) ou modificado (com acesso à dieta hipossódica). A dieta hipossódica *per se*, aumentou a ingestão de água quando comparado ao grupo com dieta normossódica, em todos os tempos estudados (30 min: 0,52 ± 0,06 vs. 0,19 ± 0,03; 60 min: 0,73 ± 0,06 vs. 0,26 ± 0,01; 120 min: 0,99 ± 0,05 vs. 0,62 ± 0,01; 180 min: 1,29 ± 0,09 vs. 0,69 ± 0,05; 240 min: 1,60 ± 0,06 vs. 0,98 ± 0,09; 300 mim: 1,66 ± 0,06 vs. 1,03 ± 0,06 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente). A depleção aguda de sódio (FuroCap) também aumentou a ingestão de água, a partir de 60 minutos após as administrações, quando comparado ao respectivo grupo administrado com salina isotônica (60 min: 0,82 ± 0,05 vs. 0,26 ± 0,01; 120 min: 1,28 ± 0,08 vs. 0,62 ± 0,01; 180 min: 1,74 ± 0,05 vs. 0,69 ± 0,05; 240 min: 1,89 ± 0,06 vs. 0,98 ± 0,09; 300 mim: 1,95 ± 0,08 vs. 1,03 ± 0,06 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente). Adicionalmente, a dieta hipossódica por 4 dias potencializou o aumento na ingestão de água induzido pelo FuroCap, quando comparado ao grupo FuroCap + dieta normossódica, em todos os tempos estudados (30 mim: 0,85 ± 0,11 vs. 0,41 ± 0,06; 60 min: 1,37 ± 0,13 vs. 0,82 ± 0,05; 120 min: 1,63 ± 0,09 vs. 1,28 ± 0,08; 180 min: 2,20 ± 0,09 vs. 1,74 ± 0,05; 240 min: 2,68 ± 0,09 vs. 1,89 ± 0,06; 300 min: 2,78 ± 0,088 vs. 1,95 ± 0,08 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente).

No que tange à ingestão de salina, observamos o mesmo perfil de resposta quando comparado à ingestão de água. A dieta hipossódica *per se*, aumentou a ingestão de salina hipertônica quando comparado ao grupo com dieta normossódica, em todos os tempos estudados (30 min: 0,55 ± 0,05 vs. 0,15 ± 0,03; 60 min: 0,64 ± 0,05 vs. 0,24 ± 0,02; 120 min: 0,83 ± 0,06 vs. 0,29 ± 0,01; 180 min: 1,09 ± 0,06 vs. 0,54 ± 0,03; 240 min: 1,19 ± 0,05 vs. 0,67 ± 0,05; 300 mim: 1,26 ± 0,01 vs. 0,77 ± 0,06 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente). A depleção aguda de sódio (FuroCap) também aumentou a ingestão de solução salina 0,3 M, em todos os tempos estudados após as administrações, quando comparado ao respectivo grupo administrado com salina isotônica (30 min: 0,56 ± 0,03 vs. 0,14 ± 0,03; 60 min: 0,59 ± 0,02 vs. 0,24 ± 0,02; 120 min: 0,92 ± 0,07 vs. 0,29 ± 0,01; 180 min: 1,68 ± 0,06 vs. 0,54 ± 0,03; 240 min: 2,04 ± 0,09 vs. 0,67 ± 0,05; 300 mim: 2,15 ± 0,09 vs. 0,77 ± 0,06 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente). Por fim, a dieta hipossódica por 4 dias potencializou o aumento na ingestão de salina hipertônica induzido pelo FuroCap, quando comparado ao grupo FuroCap + dieta normossódica, a partir de 60 minutos após as administrações (60 min: 1,21 ± 0,09 vs. 0,59 ± 0,02; 120 min: 2,05 ± 0,11 vs. 0,92 ± 0,07; 180 min: 2,52 ± 0,05 vs. 1,69 ± 0,06; 240 min: 2,84 ± 0,14 vs. 2,04 ± 0,08 vs. 0,67; 300 min: 2,84 ± 0,14 vs. 2,15 ± 0,09 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente).

Na Figura 7 observamos a influência da dieta hipossódica na pressão arterial média (Figura 7A) e na frequência cardíaca (Figura 7B) em condições basais. Animais submetidos à dieta hipossódica por quatro dias consecutivos apresentaram uma redução significativa na pressão arterial média (100,3 ± 1,87 vs. 106,5 ± 1,48 mmHg, $p < 0,05$) sem alterações na frequência cardíaca, quando comparado àqueles com dieta normossódica, respectivamente.

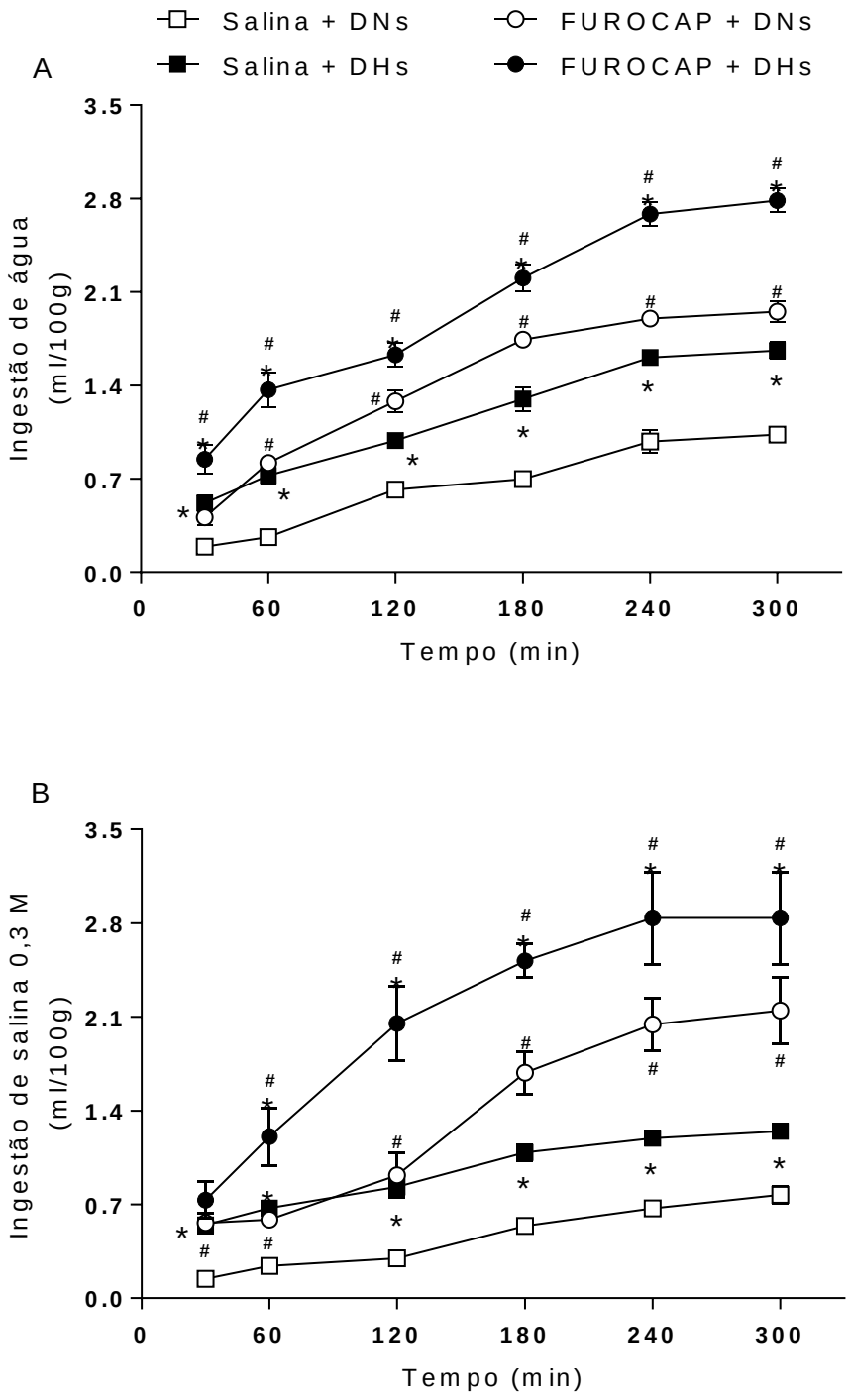


Figura 6: Influência da administração de FuroCap na ingestão de água (A) e NaCl 1,8 % (B) em animais previamente submetidos à dieta normossódica (DNs) ou hipossódica (DHs) por 4 dias consecutivos. *Imediatamente após as injeções de FuroCap ou veículo, os animais retornaram às suas gaiolas metabólicas onde foram oferecidos dois bebedouros volumétricos, um com água e outro com salina hipertônica. Os dados foram obtidos a partir de 30 minutos após as injeções. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. respectivo grupo com dieta normossódica; # p < 0,05 vs. respectivo grupo administrado com salina (veículo).*

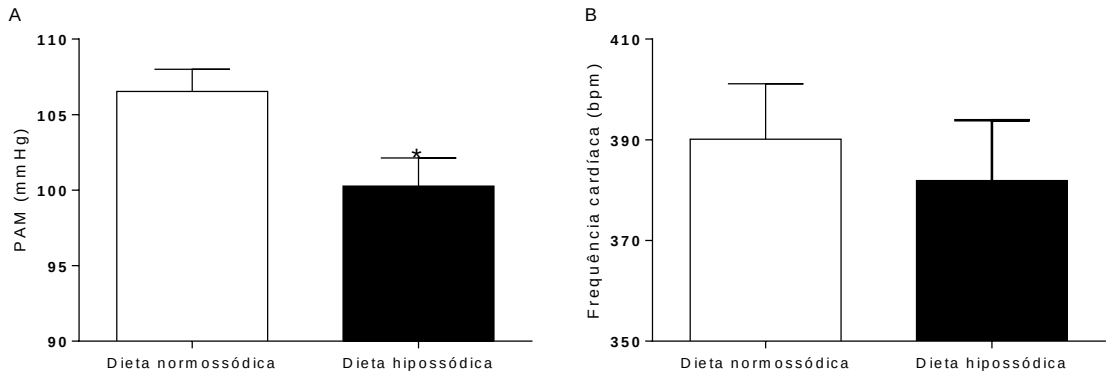


Figura 7: Influência da dieta hipossódica (DHs) por 4 dias consecutivos na pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) de ratos Wistar. *Os dados estão expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. respectivo grupo com dieta normossódica.*

As variações (Δ) na pressão arterial média e na frequência cardíaca induzidas pela administração de FuroCap em animais com dieta normossódica ou hipossódica estão representadas na Figura 8. Observamos que a administração de FuroCap induziu hipotensão sustentada a partir de 2 minutos pós-administração, tanto no grupo com dieta normossódica (Δ 2 min: -15,0 ± 4,0; Δ 5 min: - 16,72 ± 4,47; Δ 10 min: - 17,74 ± 1,90; Δ 30 min: - 21,28 ± 3,02 vs Δ 0: - 1,20 ± 1,93 mmHg, $p < 0,05$) quanto no grupo com dieta hipossódica (Δ 2 min: - 16,09 ± 3,56; Δ 5 min: - 23,46 ± 4,36; Δ 10 min: - 30,42 ± 3,60; Δ 30: - 33,67 ± 4,15 vs. Δ 0: - 0,30 ± 1,32 mmHg, $p < 0,05$) em comparação com Δ 0 minuto, imediatamente antes da administração (Figura 8A). Adicionalmente, a dieta hipossódica potencializou a hipotensão induzida pelo FuroCap aos 10 e 30 minutos após as administrações (Δ 10: - 30,42 ± 3,60 vs. – 17,74 ± 1,90; Δ 30: - 33,67 ± 4,15 vs. – 21,28 ± 3,02, $p < 0,05$ quando comparado à dieta normossódica nos respectivos tempos).

Em relação à frequência cardíaca, observamos na Figura 8B que a administração de FuroCap induziu um aumento significativo na frequência cardíaca a partir do primeiro minuto pós injeção, tanto no grupo tratado com dieta normossódica (Δ 1 min: 87,00 ± 24,53; Δ 2 min: 114,00 ± 23,00; Δ 5 min: 145,8 ± 29,46; Δ 10 min: 106,7 ± 11,46 vs. Δ 0 min: 0,00 ± 7,00 bpm, $p < 0,05$) quanto com dieta hipossódica (Δ 1 min: 88,00 ± 23,00; Δ 2 min: 124,00 ± 23,37; Δ 5 min: 151,40 ± 22,40; Δ 10 min: 161,00 ± 13,00; Δ 30 min: 156,40 ± 12,20 vs. 4,00 ± 7,27 bpm, $p < 0,05$) em comparação com Δ 0 minuto. Adicionalmente, a dieta hipossódica sustentou a resposta taquicárdica em resposta à administração de FuroCap quando comparado ao grupo tratado com dieta normossódica (Δ 30 min: 156,40 ± 12,20 vs. 78,75 ± 21,07 bpm, $p < 0,05$, respectivamente).

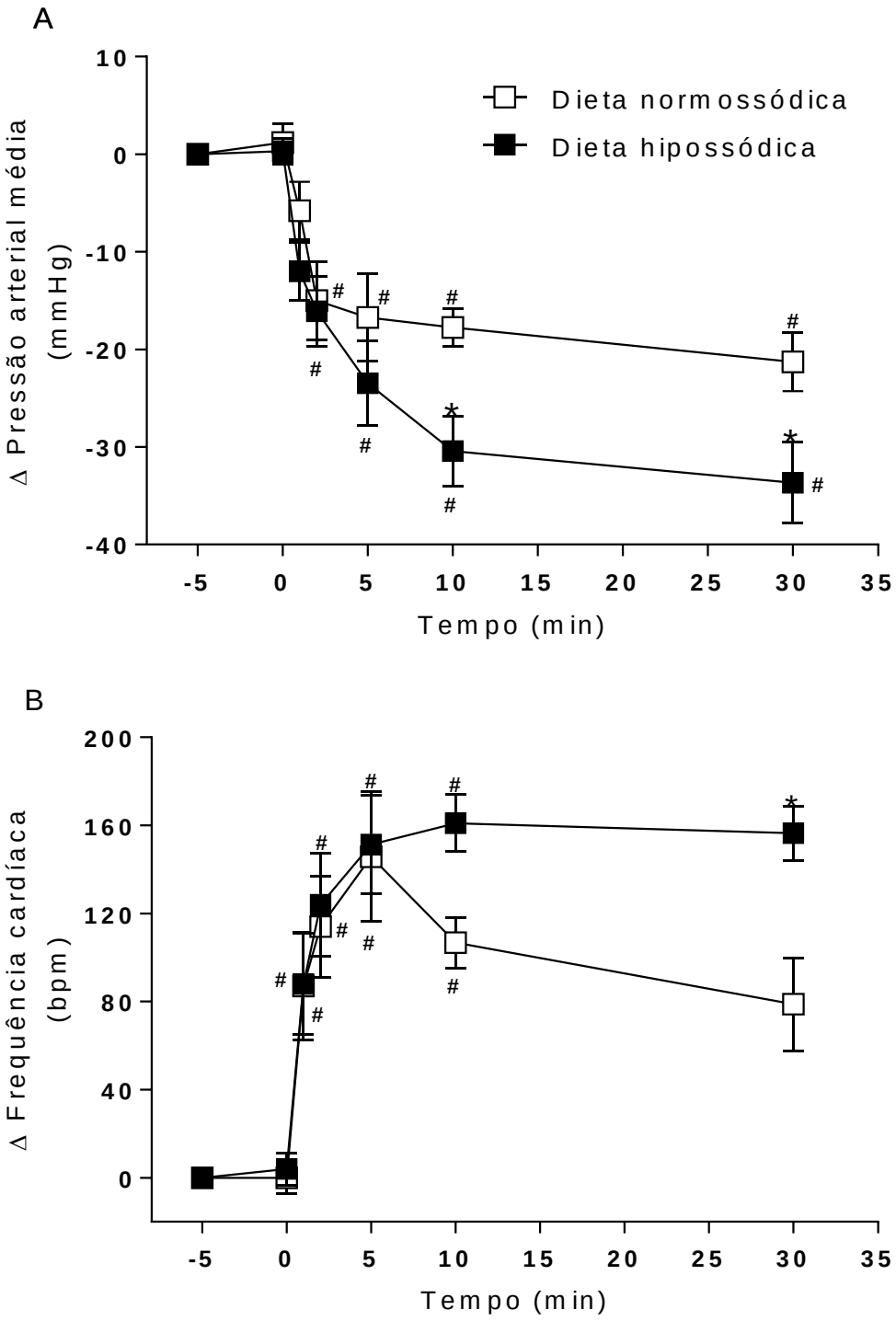


Figura 8: Influência da dieta hipossódica ou normossódica por 4 dias consecutivos na variação (Δ) da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) induzida pelo FuroCap. *Os animais foram conectados aos aparelhos de transdução e aquisição de dados para adaptação por 30 minutos. Nos últimos 5 minutos de adaptação (tempo – 5) os dados foram aferidos. A injeção de FuroCap foi realizada (tempo 0) e 1, 2, 5, 10e 30 minutos após a PAM e FC foram aferidas. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. grupo com dieta normossódica; # p < 0,05 vs. Δ no tempo 0 do mesmo grupo.*

Ainda, avaliamos os perfis de secreção hormonal em animais submetidos ao protocolo FuroCap e FuroCap modificado (Figura 9). A dieta hipossódica não alterou as concentrações plasmáticas de vasopressina (Figura 9A), ocitocina (Figura 9B), angiotensina II (Figura 9C) e peptídeo natriurético atrial (Figura 9D). Apesar de a administração simultânea de Furosemida e Captopril não alterarem a secreção de vasopressina, o protocolo FuroCap aumentou as concentrações plasmáticas de ocitocina (3,05 ± 0,76 vs. 0,99 ± 0,12 pmol/mL, $p < 0,05$) e angiotensina II (212,40 ± 19,20 vs. 39,32 ± 10,77 pmol/mL, $p < 0,05$) e reduziu as concentrações plasmáticas de ANP (19,42 ± 1,96 vs. 34,56 ± 3,80 pmol/mL, $p < 0,05$) quando comparado à administração de salina isotônica, respectivamente. Ainda, o protocolo FuroCap modificado (FuroCap associado com dieta hipossódica por 4 dias) inibiu o aumento nas concentrações plasmáticas de ocitocina (0,91 ± 0,09 vs. 3,05 ± 0,76 pmpl/mL, $p < 0,05$), atenuou o aumento nas concentrações plasmáticas de angiotensina II (143,10 ± 13,57 vs. 212,40 ± 19,20 pmol/mL, $p < 0,05$) e, potencializou a redução nas concentrações plasmáticas de ANP (13,07 ± 1,82 vs. 19,42 ± 1,96 pmol/mL, $p < 0,05$) 60 minutos após as injeções, quando comparado ao grupo submetido ao protocolo FuroCap padrão.

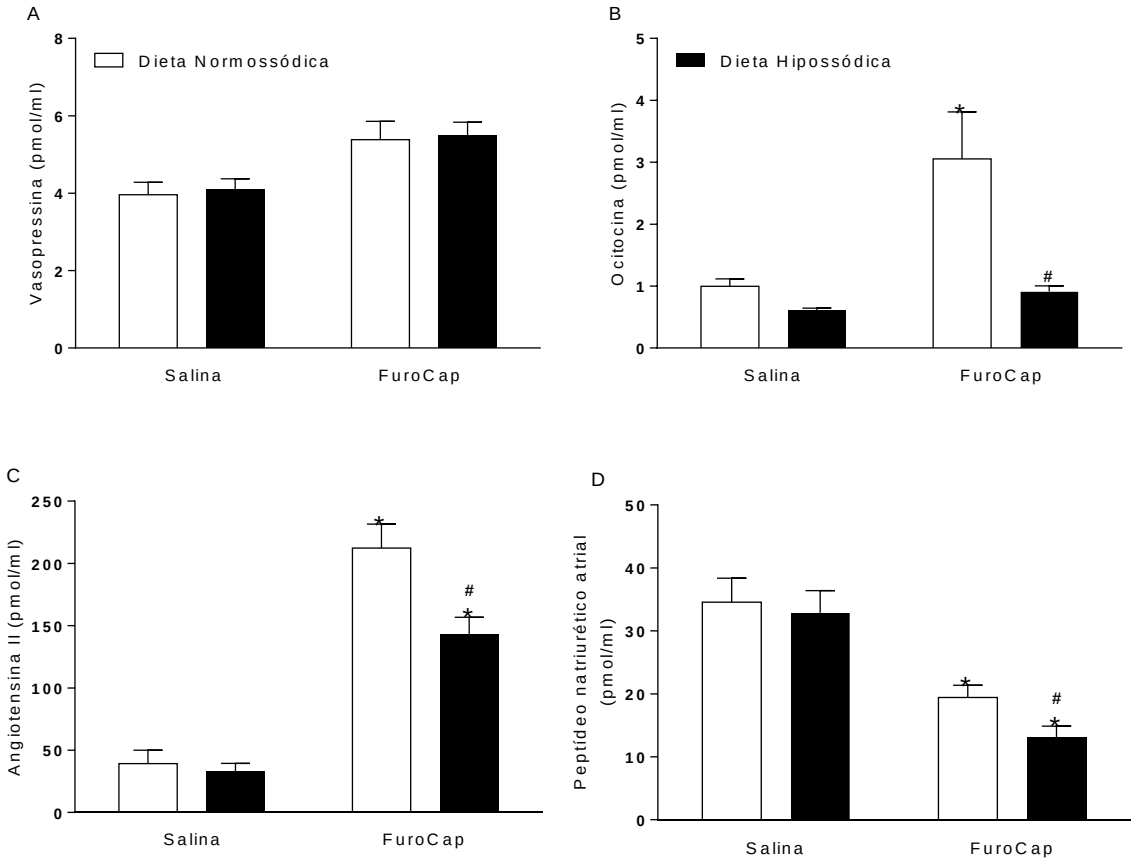


Figura 9: Influência da dieta hipossódica ou normossódica por 4 dias consecutivos nas concentrações hormonais de vasopressina (A), ocitocina (B), angiotensina II (C) e peptídeo natriurético atrial (D) em resposta à administração de FuroCap. *60 minutos após a administração de FuroCap ou veículo, os animais foram decapitados para a coleta de sangue necessária para as dosagens hormonais através de radioimunoensaio. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. respectivo grupo controle; # p < 0,05 vs. respectivo grupo com dieta normossódica.*

4.2 Influência da Dieta Hipossódica sobre as Respostas Comportamentais, Cardiovasculares e Neuroendócrinas em Ratos Submetidos à Administração de Isoproterenol.

A influência da dieta hipossódica na ingestão de água e salina hipertônica induzida pelo Isoproterenol é demonstrada na figura 10. Da mesma forma como no protocolo anterior, a dieta hipossódica aumentou a ingestão de água (Figura 10A) quando comparado ao grupo com dieta normossódica, em todos os tempos estudados (30 min: 0,88 ± 0,09 vs. 0,20 ± 0,03; 60 min: 1,14 ± 0,07 vs. 0,26 ± 0,01; 120 min: 1,39 ± 0,07 vs. 0,49 ± 0,06; 180 min: 1,66 ± 0,07 vs. 0,83 ± 0,06; 240 min: 1,86 ± 0,08 vs. 0,98 ± 0,05; 300 mim: 2.02 ± 0,07 vs. 1,04 ± 0,06 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente). Por sua vez, a estimulação β-adrenérgica com o Isoproterenol aumentou a ingestão de água, a partir de 60 minutos após as administrações, quando comparado ao respectivo grupo administrado com salina isotônica (60 min: 0,64 ± 0,06 vs. 0,26 ± 0,01; 120 min: 1,99 ± 0,06 vs. 0,49 ± 0,06; 180 min: 2,31 ± 0,13 vs. 0,83 ± 0,06; 240 min: 2,41 ± 0,06 vs. 0,98 ± 0,05; 300 mim: 2,46 ± 0,08 vs. 1,04 ± 0,06 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente). Adicionalmente, a dieta hipossódica por 4 dias potencializou o aumento na ingestão de água induzido pelo Isoproterenol, quando comparado ao grupo Isoproterenol + dieta normossódica, em todos os tempos estudados (30 mim: 1,47 ± 0,10 vs. 0,27 ± 0,02; 60 min: 2,15 ± 0,09 vs. 0,64 ± 0,05; 120 min: 2,46 ± 0,07 vs. 1,99 ± 0,06; 180 min: 3,58 ± 0,20 vs. 2,30 ± 0,13; 240 min: 3,89 ± 0,10 vs. 2,41 ± 0,06; 300 min: 3,89 ± 0,10 vs. 2,46 ± 0,08 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente).
Em relação à ingestão de NaCl 0,3 M, observamos que a dieta hipossódica durante 4 dias aumentou a ingestão de salina hipertônica quando comparado ao grupo com dieta normossódica, em todos os tempos estudados (30 min: 0,55 ± 0,09 vs. 0,07 ± 0,03; 60 min: 0,74 ± 0,07 vs. 0,21 ± 0,03; 120 min: 0,84 ± 0,07 vs. 0,34 ± 0,03; 180 min: 1,05 ± 0,07 vs. 0,62 ± 0,01; 240 min: 1,16 ± 0,07 vs. 0,67 ± 0,05; 300 mim: 1,21 ± 0,06 vs. 0,67 ± 0,05 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente). A estimulação β-adrenérgica também aumentou a ingestão de solução salina 0,3 M, em todos os tempos estudados após as administrações, quando comparado ao respectivo grupo administrado com salina isotônica (30 min: 0,38 ± 0,03 vs. 0,07 ± 0,03; 60 min: 0,59 ± 0,02 vs. 0,21 ± 0,03; 120 min: 0,66 ± 0,04 vs. 0,34 ± 0,03; 180 min: 1,08 ± 0,07 vs. 0,62 ± 0,01; 240 min: 1,38 ± 0,07 vs. 0,67 ± 0,05; 300 mim: 1,43 ± 0,06 vs. 0,67 ± 0,05 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$, respectivamente). Por fim, a dieta hipossódica por 4 dias potencializou o aumento na ingestão de salina hipertônica induzido pelo Isoproterenol, quando comparado ao grupo Isoproterenol + dieta normossódica, porém, apenas a partir de 120 minutos após as administrações (120 min: 1,69 ± 0,11 vs. 0,66 ± 0,04; 180 min: 1,95 ± 0,10 vs. 1,08 ± 0,07; 240 min: 2,16 ± 0,11 vs. 1,38 ± 0,07; 300 min: 2,16 ± 0,11 vs. 1,43 ± 0,06 mL/100 g de peso corporal, $p < 0,05$,

As variações (Δ) na pressão arterial média e na frequência cardíaca induzidas pela administração de Isoproterenol em animais com dieta normossódica ou hipossódica estão representadas na Figura 11. Observamos que a administração de Isoproterenol induziu hipotensão sustentada 1 minuto pós-administração (Figura 11A), tanto no grupo com dieta normossódica (Δ 1 min: - 20,23 ± 4,45; Δ 2 min: - 30,40 ± 4,50; Δ 5 min: - 25,13 ± 2,85; Δ 10 min: - 23,46 ± 2,38; Δ 30 min: - 21,30 ± 2,50 vs Δ 0: - 0,50 ± 0,94 mmHg, $p < 0,05$) quanto no grupo com dieta hipossódica (Δ 1 min: - 32,10 ± 2,10; Δ 2 min: - 31,58 ± 2,54; Δ 5 min: - 25,18 ± 2,31; Δ 10 min: - 20,10 ± 1,04; Δ 30: - 18,50 ± 2,36 vs. Δ 0: - 1,84 ± 1,19 mmHg, $p < 0,05$) em comparação com Δ 0 minuto, mensurado imediatamente antes da injeção. Adicionalmente, verificamos que a dieta hipossódica não influenciou a resposta hipotensora induzida pelo agonista β-adrenérgico.

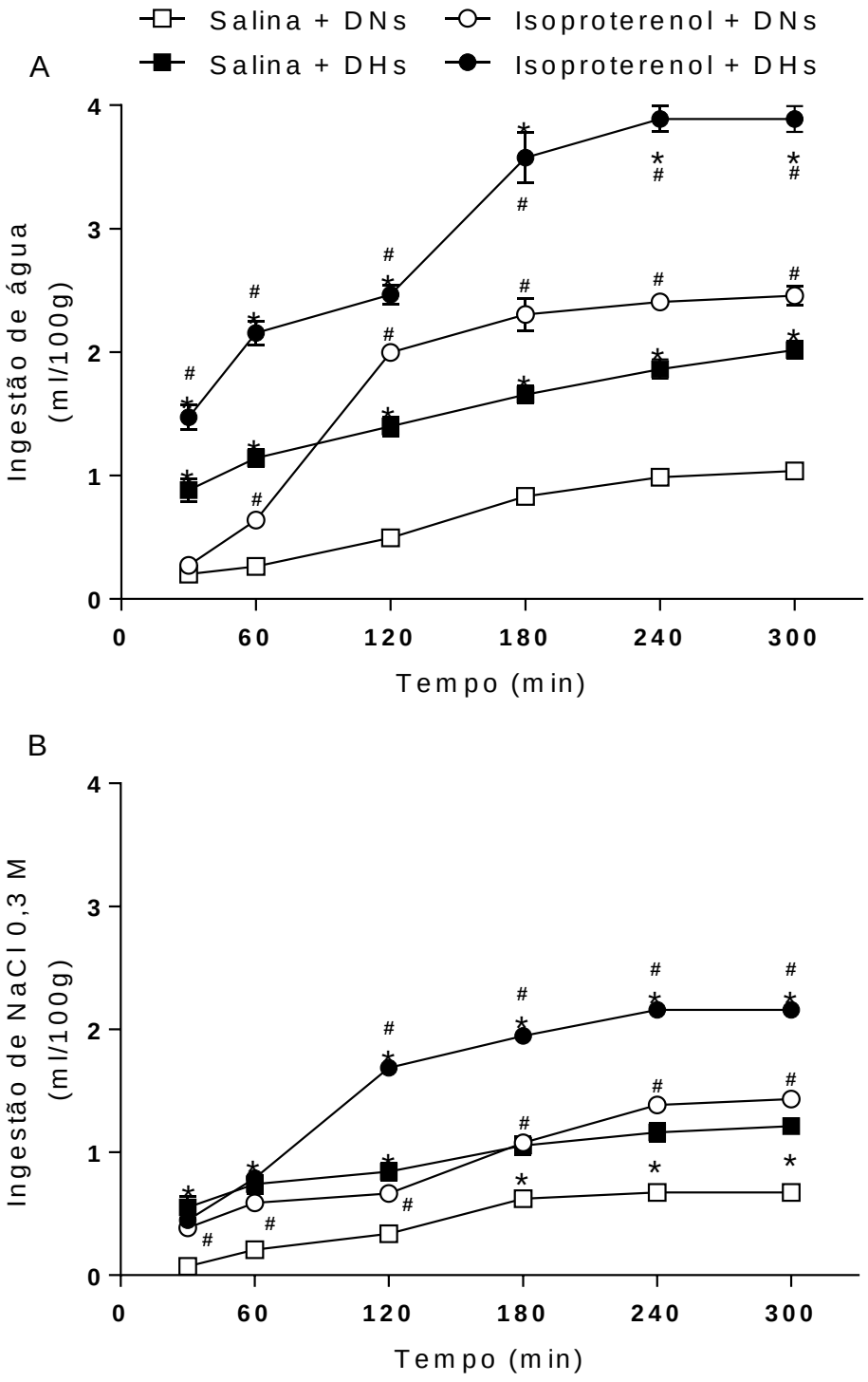


Figura 10: Influência da administração de Isoproterenol na ingestão de água (A) e NaCl 1,8 % (B) em animais previamente submetidos à dieta normossódica (DNs) ou hipossódica (DHs) por 4 dias consecutivos. *Imediatamente após as injeções de* Isoproterenol *ou veículo, os animais retornaram às suas gaiolas metabólicas onde foram oferecidos dois bebedouros volumétricos, um com água e outro com salina hipertônica. Os dados foram obtidos a partir de 30 minutos após as injeções. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. respectivo grupo com dieta normossódica; # p < 0,05 vs. respectivo grupo administrado com salina (veículo).*

Em relação à frequência cardíaca, observamos na Figura 11 B que o Isoproterenol induziu um aumento significativo na frequência cardíaca a partir do primeiro minuto pós injeção, tanto no grupo tratado com dieta normossódica (Δ 1 min: 204,3 ± 3,79; Δ 2 min: 174,00 ± 7,00; Δ 5 min: 157,90 ± 10,92; Δ 10 min: 153,70 ± 14,50; Δ 30 min: 125,00 ± 6,00 vs. Δ 0 min: - 0,05 ± 9,62 bpm, $p < 0,05$) quanto com dieta hipossódica (Δ 1 min: 202,00 ± 8,00; Δ 2 min: 195,10 ± 9,89; Δ 5 min: 189,30 ± 8,36; Δ 10 min: 171,00 ± 10,00; Δ 30 min: 146,80 ± 8,59 bpm, $p < 0,05$) em comparação com Δ 0 minuto, mensurado imediatamente antes da injeção. A dieta hipossódica também não modulou a taquicardia reflexa induzida pela administração de Isoproterenol.

Por fim, avaliamos os perfis de secreção hormonal em animais submetidos à administração de Isoproterenol associado ou não à dieta hipossódica (Figura 12). A dieta hipossódica não alterou as concentrações plasmáticas de vasopressina (Figura 12A), ocitocina (Figura 12B), angiotensina II (Figura 12C) e peptídeo natriurético atrial (Figura 12D). Apesar de a administração de Isoproterenol não alterar a secreção de vasopressina, o protocolo o agonista β-adrenérgico aumentou as concentrações plasmáticas de ocitocina (9,14 ± 2,59 vs. 0,99 ± 0,12 pmol/mL, $p < 0,05$), angiotensina II (3251,2 ± 321,00 vs. 39,32 ± 10,77 pmol/mL, $p < 0,05$) e ANP (87,21 ± 8,56 vs. 34,56 ± 3,80 pmol/mL, $p < 0,05$) quando comparado à administração de salina isotônica, respectivamente. Ainda, apesar de a associação entre dieta hipossódica por quatro dias e administração aguda de Isoproterenol ter aumentado as concentrações plasmáticas de vasopressina quando comparado ao respectivo grupo controle (9,36 ± 1,47 vs. 4,09 ± 0,27 pmol/mL, $p < 0,05$) e não modulado as concentrações plasmáticas de ocitocina, a dieta hipossódica atenuou o aumento nas concentrações plasmáticas de angiotensina II (2017,00 ± 198,00 vs. 3251,2 ± 321,00 pmol/mL, $p < 0,05$) e inibiu o aumento nas concentrações plasmáticas de peptídeo natriurético atrial (38,09 ± 5,80 vs. 87,21 ± 8,56 pmol/mL, $p < 0,05$).

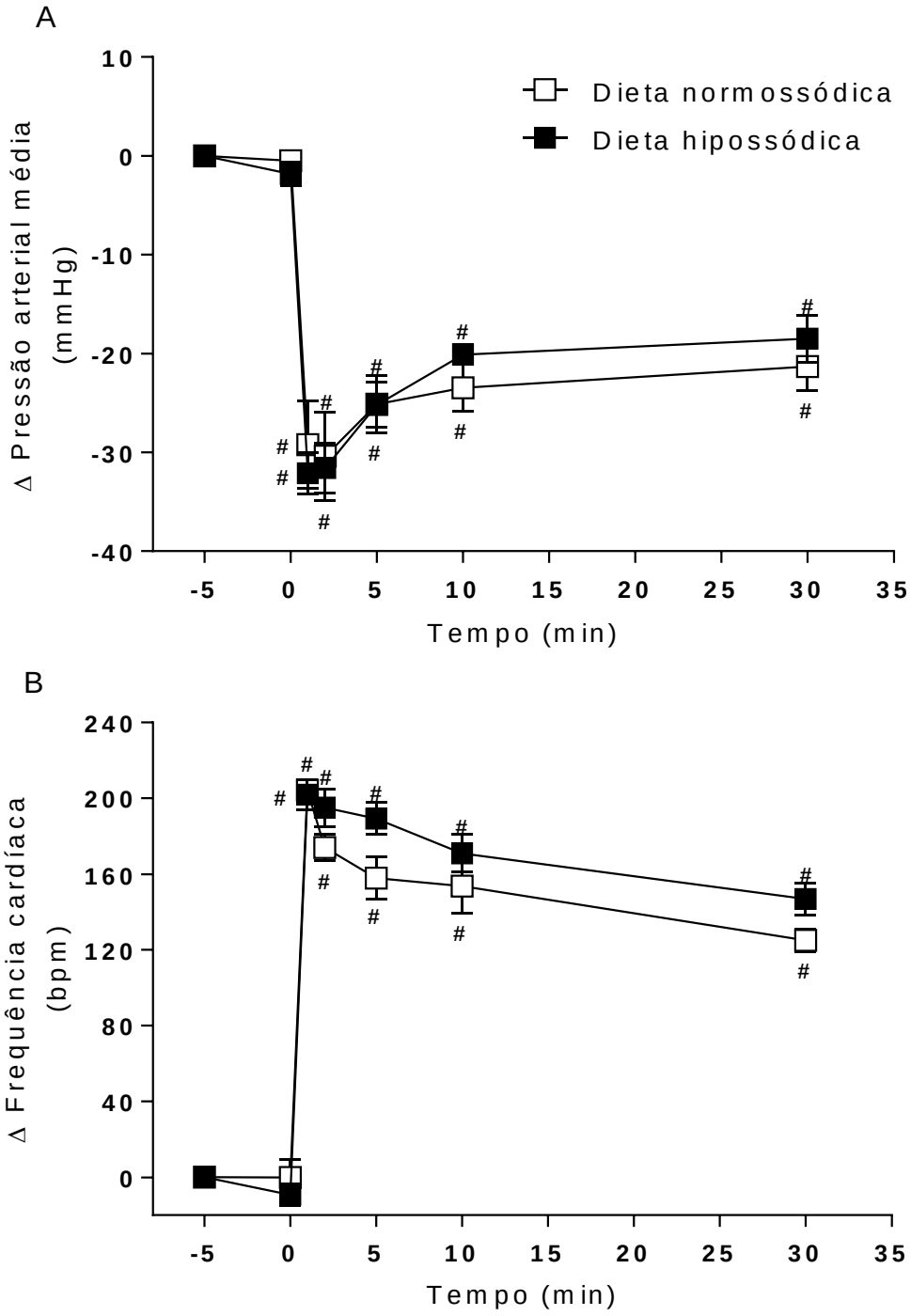


Figura 11: Influência da dieta hipossódica ou normossódica por 4 dias consecutivos na variação (Δ) da pressão arterial média (PAM; A) e frequência cardíaca (FC; B) induzida pelo Isoproterenol. *Os animais foram conectados aos aparelhos de transdução e aquisição de dados para adaptação por 30 minutos. Nos últimos 5 minutos de adaptação (tempo – 5) os dados foram aferidos. A injeção de* Isoproterenol *foi realizada (tempo 0) e 1, 2, 5, 10e 30 minutos após a PAM e FC foram aferidas. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. grupo com dieta normossódica; # p < 0,05 vs. Δ no tempo 0 do mesmo grupo.*

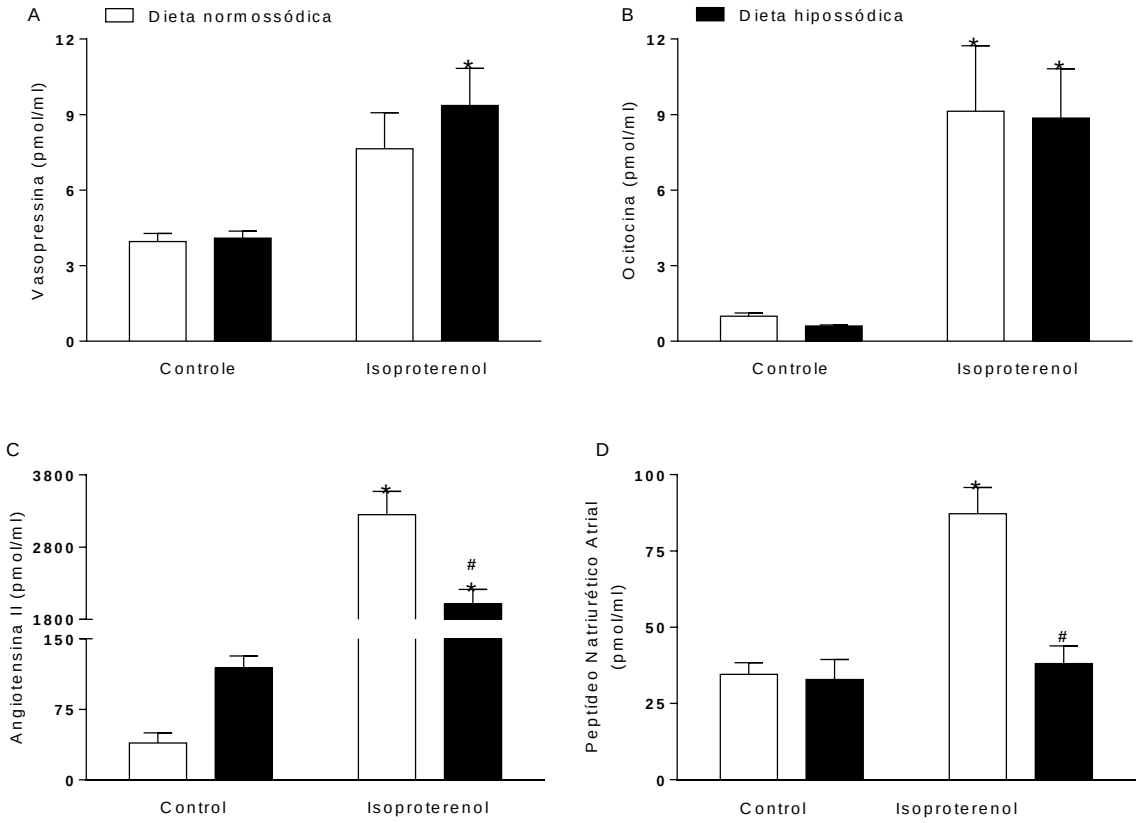


Figura 12: Influência da dieta hipossódica ou normossódica por 4 dias consecutivos nas concentrações hormonais de vasopressina (A), ocitocina (B), angiotensina II (C) e peptídeo natriurético atrial (D) em resposta à administração de Isoproterenol. *60 minutos após a administração de* Isoproterenol *ou veículo, os animais foram decapitados para a coleta de sangue necessária para as dosagens hormonais através de radioimunoensaio. Os dados estão expressos como média ± EPM. * p < 0,05 vs. respectivo grupo controle; # p < 0,05 vs. respectivo grupo com dieta normossódica.*

5 DISCUSSÃO

O sódio, principal componente iônico do líquido extracelular, é um fator crucial para a manutenção da tonicidade e volume do fluido extracelular (ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004). A sede e o apetite ao sódio consistem em respostas comportamentais relacionadas com a regulação do volume do fluido extracelular, da osmolalidade plasmática e da pressão arterial (FITZSIMONS, 1998; REIS, 2007). No presente estudo utilizamos um modelo de acesso à dieta hipossódica por quatro dias consecutivos (descrito previamente por MECAWI *et al.*, 2013) para avaliar a influência no comportamento ingestivo, parâmetros cardiovasculares e neuroendócrinos de animais submetidos à protocolos agudos de indução de sede (estimulação β-adrenérgica) ou do apetite ao sódio (depleção aguda de sódio).

A privação de sódio na dieta consiste em um modelo que induz respostas hormonais para a conservação de sódio e respostas comportamentais, para a aquisição deste íon. A restrição de sódio na dieta consiste em um modelo não invasivo que poderia reproduzir as condições fisiológicas que estimulam o apetite ao sódio na natureza (PRAKASH & NORGREN, 1991). Estudos prévios demonstraram que dieta hipossódica por 8 ou 14 dias é eficiente na indução de apetite por sódio (STRICKER *et al.*, 1991; LU *et al.*, 2009). Recentemente, MECAWI *et al.*, (2013) demonstraram que mesmo em um curto espaço de tempo (quatro dias consecutivos) a dieta hipossódica é capaz de deflagrar o apetite por sódio e, tão importante quanto, não representa um modelo de estresse que poderia alterar respostas comportamentais e fisiológicas, tendo em vista que este protocolo de dieta hipossódica não alterou a expressão de RNAm para o hormônio estimulador de corticotrofina (CRH) no PVN tampouco alterou as concentrações plasmáticas de corticosterona, quando comparado ao grupo submetido à dieta normossódica. Por esse motivo, escolhemos o modelo de dieta pobre em sódio por quatro dias consecutivos para avaliar de que forma a dieta hipossódica influencia as respostas aos protocolos dipsogênico (estimulação β-adrenérgica) ou natriorexigênico (FuroCap) em ratos Wistar.

No presente trabalho, observamos que o acesso à dieta hipossódica induziu aumento na ingestão de salina hipertônica e de água quando comparado ao grupo com acesso à dieta normossódica, como previamente descrito por MECAWI *et al.*, (2013). CURTIS *et al*., (2001) demonstraram que a dieta hipossódica por 2, 5 e 10 dias consecutivos aumenta a ingestão de NaCl, que foi acompanhado por alterações gustativas ao NaCl. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que dois dias de dieta hipossódica são necessários para alterar padrões de ingestão de soluções de NaCl concentradas e reduzir as respostas gustatórias ao NaCl, já que as respostas do nervo Corda Tímpano são atenuadas à todas as concentrações de NaCl estudadas (GARCIA *et al*., 2008).

Os animais submetidos à dieta hipossódica não apresentaram alteração na natremia quando comparado aos animais com acesso à dieta hipossódica, que foi correlacionado pelos autores com a redução no volume urinário bem como na natriurese (MECAWI *et al.*, 2013). A manutenção da natremia em animais com acesso à dieta hipossódica pode também ser explicada pela capacidade de íons sódio se ligar à sítios polianiônicos dos glicosaminoglicanos, de forma que a pele pode ser considerada um estoque de íons sódio osmoticamente inativo, quando ligado aos sítios aniônicos dos dissacarídeos formadores dos glicosaminoglicanos (RABELINK & ROTMANS, 2009). Neste contexto, a mobilização do estoque de íon sódio osmoticamente inativo na pele foi demonstrada por SCHAFFLHUBER *et al.*, (2007), onde a dieta pobre em sódio foi associada com a redução do conteúdo de glicosaminoglicanos (e, consequentemente, de sítios polianiônicos), reduzindo assim os sítios para ligação do íon sódio e, favorecendo a sua mobilização a partir da pele, mantendo assim o

animal em condição normonatrêmica, como observado no modelo utilizado no presente trabalho.

Ao final dos 4 dias de dieta hipossódica, os animais foram submetidos ao protocolo de estimulação β-adrenérgica (através da administração subcutânea de Isoproterenol) ou à depleção aguda de sódio (através da administração simultânea de furosemida e baixas doses de captopril). Em ambos os protocolos, observamos as respostas esperadas de aumento na ingestão de água e salina hipertônica quando comparado aos respectivos grupos controle. No entanto, as respostas comportamentais tanto ao Isoproterenol quanto ao FuroCap são exacerbadas em animais submetidos à dieta hipossódica por 4 dias consecutivos: a dieta hipossódica potencializou a resposta ao FuroCap à partir de 30 (sede) e 60 (apetite por sódio) minutos após as administrações, enquanto que a dieta hipossódica potencializou a resposta dipsogênica e natriorexigênica induzida pelo Isoproterenol, 30 e 120 minutos após as administrações (respectivamente), quando comparados aos respectivos grupos controle (com acesso à salina normossódica). E ainda, a dieta hipossódica reduz a latência para as respostas dipsogênicas enquanto aumenta para as respostas natriorexigênicas induzidas por ambos os protocolos, quando comparado aos respectivos controles (com acesso à dieta normossódica).

Trabalhos prévios demonstraram que animais normovolêmicos submetidos à administrações intracerebroventriculares diárias de ANG II, apresentam uma potencialização nas respostas dipsogênicas com o passar dos dias e de forma dose-dependente, sugerindo que o aumento crônico na disponibilidade de ANG II no sistema nervoso central reforçaria a habilidade deste peptídeo em induzir sede (BRYANT *et al.,* 1990). Além disso, a administração intracerebroventricular de aldosterona exacerba o apetite por sódio deflagrado pela ANG II em condições basais (FLUHART & EPSTEIN, 1983). Apesar de a ANG II induzir apetite ao sódio mesmo em animais adrenalectomizados (SCHOORLEMMER *et al.,* 2001), a aldosterona periférica parece atuar sinergicamente à ANG II, exacerbando as respostas natriorexigênicas (SAKAI *et al.,* 1987; EPSTEIN, 1991; GALAVERNA *et al.,* 1995). Mais que isso, repetidas condições de depleção de sódio parecem produzir alterações cerebrais duradouras (através de infra/supra-regulação de receptores) a fim de preparar o animal para responder de forma mais rápida e/ou mais rigorosa a um novo episódio de deficiência de sódio (SAKAI, 1987). Desta forma, os hormônios relacionados à conservação de sódio corporal (ANG II e aldosterona) atuariam também para a defesa comportamental contra a deficiência de sódio.

Ainda neste contexto, resultados previamente demonstrados sugerem que baixos níveis de sódio no SFO reduz a aversão por sal através de um mecanismo independente da ativação angiotensinérgica (NODA *et al.,* 2007). No entanto, vale ressaltar que nessa aparente sensibilidade do sistema à novas condições dipsogênicas e/ou natriorexigênicas parece ter importante papel dos receptores AT1 para ANG II: PEREIRA *et al.,* (2010) demonstraram que repetidos protocolos de depleção aguda de sódio realizados em um mesmo grupo de animais, induziu exacerbação tanto da ingestão basal quanto evocada de NaCl 0,3 M, e que tais respostas foram inibidas pela administração de losartan, um potente antagonista de receptores AT1. De fato, em um protocolo semelhante ao que utilizamos no presente trabalho, MECAWI *et al.,* (2013) observaram que, apesar de o conteúdo de angiotensina I e II no hipotálamo, tronco e mesencéfalo não ser alterado, a dieta hipossódica aumentou a expressão de RNAm para receptores AT1 tanto no SFO quando no núcleo dorsal da rafe (DRN). Já é bem estabelecido que o SFO, como um órgão circunventricular, possui papel fundamental na estimulação da sede e apetite por sódio mediado tanto pela ANG II (via receptores AT1) quanto por alterações na osmolalidade e conteúdo de sódio (FRY & FERGUSON, 2007). Desta forma, o aumento na expressão de RNAm para os receptores AT1 no SFO pode estar envolvido com a potencialização da ação da ANG II para novos desafios dispsogênicos e natriorexigênicos após 4 dias de dieta hipossódica. Por outro lado, o NDR consiste no

principal núcleo serotoninérgico do tronco encefálico e que recebe aferências angiotensinérgicas do SFO, dentre outros núcleos cerebrais. Ainda, sabe-se que o NDR está envolvido com a saciedade ao sódio já que a sua ativação induz a inibição ao apetite por sódio (REIS, 2007). Desta forma, podemos sugerir que os animais com acesso à restrição ao sódio por quatro dias consecutivos (como no presente modelo experimental) apresentam uma maior sensibilidade à ANG II devido à uma possível supra-regulação de seus receptores no SFO, e assim, potencializando as respostas dipsogênicas e natriorexigênicas induzidas por estímulos de sede (Isoproterenol) ou de apetite ao sódio (FuroCap) ao final do período de acesso à dieta pobre em sal.

Em relação aos parâmetros cardiovasculares, observamos que a dieta hipossódica *per se* induziu uma leve, porém significativa hipotensão sem alterar a frequência cardíaca. Devido ao fato de mesmo com a oferta de dieta pobre em sódio por quatro dias consecutivos termos observado uma redução na pressão arterial média, ela manteve-se dentro dos valores fisiológicos. Nesse modelo de acesso à dieta pobre em sódio por 4 dias consecutivos, foi observado que a dieta hipossódica aumenta significativamente o hematócrito e as proteínas plasmáticas totais denotando uma possível redução no volume circulante (MECAWI *et al*., 2013), o que pode devidamente estar correlacionado com a pequena hipotensão observada.

O protocolo de depleção aguda de sódio ou estimulação β-adrenérgica em animais submetidos à dieta normossódica induziu uma hipotensão severa acompanhada de taquicardia reflexa, já bem estabelecidos nestes protocolos (FITZSIMONS, 1998). Ambos os protocolos são hipotensores, seja pela redução na resistência vascular periférica (induzida pelo Isoproterenol), seja pela redução de Angiotensina II periférica associada à hipovolemia (pelo protocolo Furocap) (FITZSIMONS, 1998). Por este motivo, não devemos excluir a hipótese levantada por THORNTON (1995) que considera um componente de natureza barossensitiva e independente das concentrações plasmáticas de ANG II como sendo participante do drive dipsogênico e natriorexigênico em resposta à hipotensão/hipovolemia. MECAWI *et al*. (2013) não observou diferenças na expressão de RNAm para receptores AT1 no PVN e NTS, núcleos diretamente relacionados com o tônus simpatovagal para o sistema cardiovascular e aparato renal. Por outro lado, a dieta hipossódica potencializou a hipotensão e, por consequência, a taquicardia reflexa apenas na depleção aguda de sódio induzida pelo FuroCap, sem diferença significativa quando associada ao Isoproterenol, quando comparado aos respectivos grupos com dieta normossódica. Nossos dados vão de encontro aos encontrados por HAMMING *et al*. (2008), que demonstrou que a dieta hipossódica potencializa os efeitos da inibição da ECA via captopril.

Os resultados obtidos através de radioimunoensaio mostraram que a dieta hipossódica não alterou significativamente as concentrações plasmáticas de vasopressina, ocitocina, peptídeo natriurético atrial e, intrigantemente de angiotensina II. Sabemos que um dos principais estímulos para a síntese de angiotensina II é a redução na carga de sódio ao nível do aparelho justaglomerular, estimulando assim a síntese de renina (FITZSIMONS, 1998). De fato, MECAWI *et al*. (2013) utilizando o mesmo modelo do presente trabalho, mostrou que a dieta hipossódica por quatro dias consecutivos aumentou a expressão de RNAm para renina (nos rins) e para angiotensinogênio (no fígado) quando comparado ao grupo com acesso à dieta normossódica, mas sem diferenças na expressão de RNAm para ECA, fato este que poderia explicar a ausência de diferenças nas concentrações plasmáticas de ANG II entre os grupos. Entretanto, a expressão de RNAm não traduz o verdadeiro conteúdo proteico tampouco a atividade enzimática da ECA (que poderia estar aumentada tendo em vista um possível aumento nas concentrações de angiotensina I, o substrato da ECA). Neste contexto, estudos demonstram discrepâncias entre o RNAm renal e a atividade enzimática da ECA, sugerindo uma possível regulação pós-transcricional ou desacoplamento entre a expressão gênica e proteica (WYSOCK *et al*., 2006). Assim, estudos posteriores são necessários para

investigar os motivos por não termos verificado aumento nas concentrações plasmáticas de ANG II. Ainda, foi demonstrado que a dieta hipossódica por 4 dias consecutivos não altera o conteúdo neurohipofisário de vasopressina e ocitocina, o que corrobora os nossos resultados, onde não observamos diferenças entre o grupo com dieta pobre em sódio e aquele com dieta normossódica (MECAWI *et al*., 2013).

No que tange aos protocolos de depleção aguda de sódio, o Furocap induziu aumento nas concentrações plasmáticas de ocitocina e angiotensina II enquanto reduziu as concentrações plasmáticas de peptídeo natriurético atrial. Por outro lado, a dieta hipossódica por 4 dias atenuou as respostas da ocitocina e angiotensina II, enquanto que potencializou a resposta do ANP ao FuroCap, quando comparado ao respectivo grupo submetido à dieta normossódica. Já a estimulação β-adrenérgica aumentou as concentrações plasmáticas de ocitocina, angiotensina II e peptídeo natriurético atrial, e a dieta hipossódica por 4 dias consecutivos aumentou a secreção de vasopressina enquanto que atenuou as respostas da angiotensina II e do peptídeo natriurético atrial ao Isoproterenol.

Como esperado, o protocolo FuroCap e a estimulação β-adrenérgica associado com a dieta normossódica aumentou significativamente as concentrações plasmáticas de ANG II enquanto que, ao serem associados com a dieta hipossódica, tal resposta foi significativamente atenuada. Apesar de contraditório com a exacerbação das respostas comportamentais (dipsogênicas e natriorexigênicas) induzidas pela dieta hipossódica, a atenuação nas concentrações plasmáticas de ANG II mediada por esta dieta reforça a hipótese de uma maior sensibilidade do sistema nervoso central à angiotensina II, confirmado pela supra-regulação de receptores AT1 no órgão subfornicial mediada pela dieta hipossódica, como descrito anteriormente (MECAWI *et al*., 2013).

A administração de Furosemida associada ao Captopril ou a administração de Isoproterenol induziu o aumento significativo nas concentrações plasmáticas de ocitocina em animais com acesso à dieta hipossódica, quando comparado aos respectivos controles. Esse resultado não está de acordo com as observações de MOOS & RICHARD (1980), que demonstraram que agonistas β-adrenérgicos inibem a secreção de ocitocina durante a ejeção de leite, também confirmado posteriormente por SONG *et al.*, (1988). No entanto, HALEY *et al.*, (2007) atribuiu tal aumento das concentrações plasmáticas de ocitocina à predominância da resposta hipotensora, que ocorreu de forma intensa em resposta a ambos os protocolos.

Vários trabalhos sugerem o ANP como sinalizador inibitório da ingestão de sódio (BLACKBURN *et al.*, 1993; STRICKER & VERBALIS, 1996; GODINO *et al.*, 2007). No presente trabalho, as concentrações plasmáticas de ANP reduziram significativamente após a associação da dieta hipossódica com o protocolo FuroCap ou Isoproterenol, o que indicaria uma supressão da sinalização inibitória que, consequentemente, exacerbaria a resposta natriorexigênica. Em relação ao ANP, os resultados mostram que o protocolo FuroCap associado com dieta normo ou hipossódica reduzem as concentrações plasmáticas deste hormônio de forma significativa, estando de acordo com dados da literatura considerados para condições hipotensoras produzidas pelo presente protocolo experimental. Uma redução mais acentuada foi obtida quando a depleção aguda de sódio foi associada com dieta hipossódica, que pode ser correlacionado com um mecanismo já bem estabelecido, onde a ocitocina inibe a síntese e secreção de ANP (FAVARETTO *et al.*, 1997; ANTUNES-RODRIGUES *et al.*, 2004, 2013; GUTKOWSKA *et al.*, 2014). Assim, nós supomos que as concentrações plasmáticas de ocitocina atenuadas no grupo submetido ao FuroCap após dieta hipossódica poderiam também explicar as menores concentrações plasmáticas de ANP neste mesmo protocolo.

O Isoproterenol possui ações contraditórias sobre a síntese e secreção do peptídeo natriurético atrial. A administração de Isoproterenol tem sido descrita como um mecanismo inibitório sobre a secreção de ANP a partir do átrio de ratos hipertensos ou de câmaras atriais

perfundidas (YUAN *et al.*, 2008; QUAN *et al.*, 2010), enquanto que mecanismos ativadores de sua secreção foram descritos anteriormente, tanto em animais inteiros quanto em câmaras cardíacas perfundidas (SCHIEBINGER *et al.*, 1987; WONG *et al.*, 1988; AGNOLETTI *et al.*, 1992; AZIZI *et al.*, 1993). Apesar da hipotensão induzida pelo agonista β-adrenérgico, observamos que a administração sistêmica de Isoproterenol aumentou as concentrações plasmáticas de ANP em animais com dieta normossódica, enquanto que tal resposta foi totalmente inibida pela associação com dieta hipossódica. É possível que o estado hipovolêmico nesta condição possa ter prevalecido sobre a ação estimulatória β-adrenérgica no coração.

Em relação às concentrações plasmáticas de AVP, não foram observadas diferenças entre os grupos experimentais. Em uma análise profunda sobre o estímulo secretório em potencial para a vasopressina, podemos sugerir que em nosso trabalho não houve alterações na osmolalidade dos fluidos corporais induzidas através dos diferentes protocolos experimentais. Similarmente, a associação entre a dieta hipossódica e a administração de FuroCap ou Isoproterenol, em teoria, não alteraria a osmolalidade plasmática. Entretanto, a resposta hipotensora em ambos os protocolos, e em particular quando combinados com a dieta hipossódica, também não induziu alterações significativas nas concentrações plasmáticas de AVP, apenas no grupo com dieta hipossódica e submetido à administração de Isoproterenol, que induziu uma resposta hipotensora mais acentuada do que a observada no grupo submetido ao FuroCap, na mesma condição de dieta.

6. CONCLUSÕES

Nossos resultados demonstram claramente a exacerbação das respostas dipsogênicas e natriorexigênicas à depleção aguda de sódio (FuroCap) e à estimulação β-adrenérgica induzida pela dieta hipossódica por quatro dias. Apesar de concluirmos que a deficiência de sódio por dias pode aumentar a sensibilidade dos receptores AT1 cerebrais à angiotensina II, tais respostas comportamentais podem estar diretamente correlacionadas com a hipotensão gerada em ambos os protocolos. Ainda, verificamos que as respostas endócrinas ao FuroCap e ao Isoproterenol foram atenuadas quando associadas com a dieta hipossódica. Desta forma, novos estudos serão necessários para esclarecer os mecanismos através dos quais a dieta hipossódica influencia de forma tão intensa as respostas comportamentais, neuroendócrinas e cardiovasculares mediadas tanto pela depleção aguda de sódio quando pela estimulação β-adrenérgica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Em conjunto, podemos concluir que: i) o estradiol parece exercer um efeito atenuante sobre as consequências deletérias de uma dieta com elevado teor de sódio; e, ii) a dieta hipossódica potencializa os comportamentos ingestivos induzidos pela depleção aguda de sódio (FuroCap) e pela estimulação β-adrenérgica (Isoproterenol) mas atenua fatores neuroendócrinos influenciados por esses protocolos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS JM, MCCARTHY JJ, STOCKER SD Excess Dietary Salt Alters Angiotensinergic Regulation of Neurons in the Rostral Ventrolateral Medulla. *Hypertension,* v. 52, p. 932-937, 2008.

AGNOLETTI G, RODELLA A, CORNACCHIARI A, PANZALI AF, HARRIS P, FERRARI R Isoproterenol induces release of atrial natriuretic peptide from rat atrium in vitro. *Am J Physiol*, v. 262, p. H285-292, 1992.

ALDEHNI F, TANG T, MADSEN K, PLATTNER M, SCHREIBER A, FRIIS UG, HAMMOND HK, HAN PL, SCHWEDA F Stimulation of renin secretion by catecholamines is dependent on adenylyl cyclases 5 and 6. *Hypertension,* v. 57, p. 460-468, 2011.

ALHADEFF AL, BETLEY JN Pass the salt: the central control of sodium intake. *Nat Neurosci*, v. 20(2), p. 130-131, 2017.

ALMEIDA-PEREIRA G, COLETTI R, MECAWI AS, REIS LC, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J Estradiol and angiotensin II crosstalk in hydromineral balance: Role of the ERK1/2 and JNK signaling pathways. *Neuroscience,* v. 322; p. 525-538, 2016.

AMICO JA, SEIF SM, ROBINSON AG Oxytocin in Human Plasma: Correlation with Neurophysin and Stimulation with Estrogen. *J Clin Endocrinol Metab*, v. 52, p. 988-999, 1981.

ANDERSSON B Regulation of water intake. *Physiol Rev,* v. 58(3), p. 582, 1978.

ANDRADE-FRANZÉ GM, ANDRADE CA, DE LUCA LA JR DE PAULA PM & MENANI JV. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. *Neuroscience*165(3):633 – 641, 2010.

ANDRADE-FRANZÉ GM, ANDRADE CA, GASPARINI S, DE LUCA LA JR, DE PAULA PM, COLOMBARI DS, COLOMBARI E, MENANI JV Importance of the central nucleus of the amygdala on sodium intake caused by deactivation of lateral parabrachial nucleus. *Brain Res*, v. 1625, p. 238-245, 2015.

ANTUNES-RODRIGUES, J, MCCANN SM, ROGERS LC & SAMSON WK. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits saline preference in the rat. *Endocrinology* 118: 1726–1728, 1985a.

ANTUNES-RODRIGUES, J, MCCANN SM, ROGERS LC & SAMSON WK. Atrial natriuretic factor inhibits dehydration- and angiotensin-induced water intake in the conscious unrestrained rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 8720–8723, 1985b.

ANTUNES-RODRIGUES J, DE CASTRO M, ELIAS LL, VALENÇA MM, MCCANN SM Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev,* v. 84(1), p. 169-220, 2004.

ANTUNES-RODRIGUES J, RUGINSK SG, MECAWI AS, MARGATHO LO, CRUZ JC, VILHENA-FRANCO T, REIS WL, VENTURA RR, REIS LC, VIVAS LM, ELIAS LL Mapping and signaling of neural pathways involved in the regulation of hydromineral homeostasis. *Braz J Med Biol Res*, v. 46, p. 327-338, 2013.

ARAUJO IG, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J, REIS LC, MECAWI AS Effects of acute and subchronic AT1 receptor blockade on cardiovascular, hydromineral and neuroendocrine responses in female rats. *Physiol Behav*, v. 122, p. 104-112, 2013.

AZIZI C, CARAYON A, MASSON F, NOÉ E, BARTHELEMY C, EURIN J, MAISTRE G, LEGRAND JC Mechanisms of isoproterenol-induced atrial natriuretic peptide release from superfused rabbit atria. *Am J Physiol*, v. 265, p. H1283-H1288, 1993.

BACK H, FORSSMANN WG & STUMPF WE. Atrial myoendocrine cells (cardiodilatin/atrial natriuretic polypeptide-containing myocardiocytes) are target cells for estradiol. *Cell Tissue Res* 255: 673 – 674, 1989.

BADAUÊ-PASSOS D JR, VENTURA RR, SILVA LF, OLIVARES EL, RAMALHO MJ, ANTUNES RODRIGUES J, REIS LC 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, p. 621-8, 2001.

BADAUÊ-PASSOS D JR, VENTURA RR, SILVA LF, OLIVARES EL, REIS LC Effect of brain serotoninergic stimulation on sodium appetite of euthyroid and hypothyroid rats. *Exp Physiol*, v. 88, p. 251-260, 2003.

BARRON WM, SCHREIBER J, LINDHEIMER MD Effect of ovarian sex steroids on osmoregulation and vasopressin secretion in the rat. *Am J Physiol*, v. 250(4 Pt 1), p. E352-E361, 1986.

BEGG DP Disturbances of thirst and fluid balance associated with aging. *Physiol Behav*, in press, 2017.

BEILIN LJ, WADE DN, HONOUR AJ, COLE TJ Vascular hyper-reactivity with sodium loading and with desoxycorticosterone induced hypertension in the rat. *Clin Sci* v. 39(6), 793-810, 1970.

BELO NO, SILVA-BARRA J, CARNIO EC, ANTUNES-RODRIGUES J, GUTKOWSKA J, DOS REIS AM Involvement of atrial natriuretic peptide in blood pressure reduction induced by estradiol in spontaneously hypertensive rats. *Regul Pept* v. 117(1), p. 53-60, 2004.

BERESFORD MJ, FITZSIMONS JT Intracerebroventricular angiotensin II-induced thirst and sodium appetite in rat are blocked by the AT1 receptor antagonist, Losartan (DuP 753), but not by the AT2 antagonist, CGP 42112B. *Exp Physiol*, v. 77(5), p. 761-764, 1992.

BISLEY JW, REES SM, MCKINLEY MJ, HARDS DK & OLDFIELD BJ. Identification of osmoresponsive neurons in the forebrain of the rat: a Fos study at the ultrastructural level. *Brain Res* 720(1-2): 25 – 34, 1996.

BLACKBURN RE, SAMSON WK, FULTON RJ, STRICKER EM, VERBALIS JG Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 90, p. 10380-10384, 1993.

BONONI PL, JANOSKY JE, AMICO JA. The oxytocin secretory response during suckling in the hypoosmolar lactating rat. *Brain Res*, v. 617, p. 50-54, 1993.

BOTELHO LM, BLOCK CH, KHOSLA MC & SANTOS RA. Plasma angiotensin (1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. *Peptides* 15(4): 723 – 729, 1994.

BRIMBLE MJ, DYBALL RE, FORSLING ML Oxytocin release following osmotic activation of oxytocin neurons in the paraventricular and supraoptic nuclei. *J Physiol* v. 278, p. 69-78, 1978.

BRUNTON PJ, ARUNACHALAM S, RUSSEL JA Controlo f neurohypophyseal hormone secretion, blood osmolality and volume in pregnancy. *J Physiol Pharmacol*, v. 59(8), p. 27-45, 2008.

BRYANT RW, EPSTEIN AN, FITZSIMONS JT, FLUHARTY SJ Arousal of a specific and persistent sodium appetite in the rat with continuous intracerebroventricular infusion of angiotensin II. *J Physiol*, v. 301, p. 365-382, 1980

CALIGIONI CS & FRANCI CR. Oxytocin secretion induced by osmotic stimulation in rats during the estrous cycle and after ovariectomy and hormone replacement therapy. *Life Sci* 71(24): 2821 – 2831, 2002.

CANDELA L & YUCHA C. Renal regulation of extracellular fluid volume and osmolality. *Nephrol Nurs J* 31(4): 397 – 404, 2004.

CANESSA CM, SCHILD L, BUELL G, THORENS B, GAUTSCHI I, HORISBERGER JD, ROSSIER BC Amiloride-sensitive epithelial Na+ channel is made of three homologous subunits. *Nature*, v. 367(6462), p. 463-467, 1994.

CARLSON SH, BEITZ A, OSBORN JW Intragastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *Am J Physiol*, v. 272(3 Pt 2), R750-R758, 1997.

CARLSON SH, COLLISTER JP, OSBORN JW. The area postrema modulates hypothalamic fos responses to intragastric hypertonic saline in conscious rats. *Am J Physiol*, v. 275(6 Pt 2), p. R1921-R1927, 1998.

CARVALHO EG, FRANCI CR, ANTUNES-RODRIGUES J, GUTKOWSKA J, FAVARETTO AL. Salt overload does not modify plasma atrial natriuretic peptide or vasopressin during pregnancy in rats. *Exp Physiol*, v. 83(4), p. 503-511, 1998.

CECCATELLI S, GRANDISON L, SCOTT RE, PFAFF DW, KOW LM Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNAs in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology*, v. 64(5), p. 357-63, 1996.

CHANG CT, SUN CY, PONG CY, CHEN YC, LIN GP, CHANG TC, WU MS Interaction of estrogen and progesterone in the regulation of sodium channels in collecting tubular cells. *Chang Gung Med J*, v. 30(4), p. 305-312, 2007.

CHOW SY, SAKAI RR, WITCHER JA, ADLER NT, EPSTEIN AN Sex and sodium intake in the rat. *Behav Neurosci*, v. 106(1), p. 172-180, 1992.

CLARK JT, CHAKRABORTY-CHATTERJEE M, HAMBLIN M, WYSS JM, FENTIE IH. Estrogen depletion differentially affects blood pressure depending on age in Long-Evans rats. *Endocrine*, v. 25(2), p. 173-186, 2004.

CROFTON JT, BAER PG, SHARE L & BROOKS DP. Vasopressin release in male and female rats: effects of gonadectomy and treatment with gonadal steroid hormones. *Endocrinology* 117: 1195 – 1200, 1985.

CROWLEY RS, AMICO JA Gonadal steroid modulation of oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamus of the osmotically stimulated rat. *Endocrinology*, v. 133, p. 2711-2718, 1993.

CRUZ A, RODRÍGUEZ-GÓMEZ I, PÉREZ-ABUD R, VARGAS MÁ, WANGENSTEEN R, QUESADA A, OSUNA A, MORENO JM Effects of clofibrate on salt loading-induced hypertension in rats. *J Biomed Biotechnol*, v. 2011, p. 469481, 2011.

CURTIS KS Estrogen and the central control of body fluid balance. *Physiol Behav*, v. 97(2), p. 180-192, 2009.

CURTIS KS, KRAUSE EG, CONTRERAS RJ Altered NaCl taste responses precede increased NaCl ingestion during Na(+) deprivation. *Physiol Behav*, v. 72(5), p. 743-749, 2001.

CURTIS KS, DAVIS LM, JOHNSON AL, THERRIEN KL, CONTRERAS RJ Sex differences in behavioral taste responses to and ingestion of sucrose and NaCl solutions by rats. *Physiol Behav*, v. 80(5), p. 657-64, 2004.

CURTIS KS, CONTRERAS RJ Sex differences in electrophysiological and behavioral responses to NaCl taste. *Behav Neurosci*, v. 120(4), p. 917-924, 2006.

DA COSTA LS, DE OLIVEIRA MA, RUBIM VS, WAJNGARTEN M, ALDRIGHI JM, ROSANO GM, NETO CD, GEBARA OC. Effects of hormone replacement therapy or raloxifene on ambulatory blood pressure and arterial stiffness in treated hypertensive postmenopausal women. *Am J Cardiol*, v. 94(11), p. 1453-1456, 2004.

DA SILVA MP, CEDRAZ-MERCEZ PL, VARANDA WA Effects of nitric oxide on magnocellular neurons of the supraoptic nucleus involve multiple mechanisms. *Braz J Med Biol Res*, v. 47(2), p. 90-100, 2014.

DE-ANGELIS PR, ANTUNES VR, CAMARGO GM, SAAD WA, RENZI A & CAMARGO LA. Central interaction between atrial natriuretic peptide and angiotensin II in the control of sodium intake and excretion in female rats. *Braz J Med Biol Res* 29:1671 – 1674, 1996.

DE BOLD AJ, BORENSTEIN HB, VERESS AT & SONNENBERG H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. *Life Sci* 28(1):89 – 94, 1981.

DE BOLD AJ. Tissue fractionation studies on the relationship between an atrial natriuretic factor and specific atrial granules. *Can J Physiol Pharmacol* 60(3): 324 – 330, 1982.

DE LUCA LA JR, SUGAWARA AM, MENANI JV Brain versus peripheral angiotensin II receptors in hypovolaemia: behavioural and cardiovascular implications. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 27, p. 437-442, 2000.

DENG Y & KAUFMAN S. The influence of reproductive hormones on ANF release by rat atria. *Life Sci* 53:689-696, 1993.

DIBONA GF, KOPP UC Neural control of renal function. *Physiol Rev*, v. 77(1), p. 75-197, 1997

DICKINSON KM, KEOGH JB, CLIFTON PM Effects of a low-salt diet on flow-mediated dilatation in humans. *Am J Clin Nutr*, v. 89, p. 485-490, 2009.

DO-VALE CF, SAAD WA, RENZI A, CAMARGO GM, QUEIROZ RC, SILVEIRA JE, *et al*. Progesterone administration to ovariectomized rats reduces water and salt intake induced by central administration of angiotensin II. *Braz J Med Biol Res* 28: 999 – 1002, 1995.

EHRLICH, K. J., AND D & A. FITTS. Atrial natriuretic peptide in the subfornical organ reduces drinking induced by angiotensin or in response to water deprivation. *Behav Neurosci* 104: 365–372, 1990.

EHRLICH KJ, FITTS DA. Atrial natriuretic peptide in the subfornical organ reduces drinking induced by angiotensin or in response to water deprivation. *Behav Neurosci*, v. 104(2), p. 365-372, 1990.

EL-MAS MM, ABDEL-RAHMAN AA Longitudinal assessment of the effects of oestrpgen on blood pressure and cardiovascularautonomic activity in female rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 36(10), p. 1002-1009, 2009.

ELIAS PCL, ELIAS LLK & MOREIRA AC. Padronização do teste de infusão de salina hipertônica para o diagnóstico de diabetes insípido com dosagem da vasopressina plasmática. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 42:198 – 204, 1998.

ELIAS LL, DORIVAL CAMPOS A, MOREIRA AC. The opposite effects of short- and long-term salt loading on pituitary adrenal axis activity in rats. *Horm Metab Res*, v. 34(4), 207-211, 2002.

ENGELMANN M, LANDGRAF R & WOTJAK CT. The hypothalamic-neurohypophysial system regulates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis under stress: an old concept revisited. *Front Neuroendocrinol*25(3-4): 132 – 149, 2004.

EPSTEIN AN Neurohormonal control of salt intake in the rat. *Brain Res Bull*, v. 27(3-4), p. 315-320, 1991.

FAVARETTO AL, BALLEJO GO, ALBUQUERQUE-ARAÚJO WI, GUTKOWSKA J, ANTUNES-RODRIGUES J, MCCANN SM Oxytocin releases atrial natriuretic peptide from rat atria in vitro that exerts negative inotropic and chronotropic action. *Peptides*, v. 18, p. 1377-1381, 1997.

FINDLAY AL, FITZSIMONS JT & KUCHARCZYK J. Dependence of spontaneous and angiotensin-induced drinking in the rat upon the oestrous cycle and ovarian hormones. *J Endocrinol* 82(2):215 – 25, 1979.

FITTS DA Angiotensin II receptors in SFO but not in OVLT mediate isoproterenol-induced thirst. *Am J Physiol*, v. 267, p. R7–R15, 1994.

FITTS DA & MASSON DB Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. *Behav Neurosci*, v. 103, p. 865–872, 1989.

FITTS DA, THORNTON SN, RUHF AA, ZIERATH DK, JOHNSON AK, THUNHORST RL Effects of central oxytocin receptor blockade on water and saline intake, mean arterial pressure, and c-Fos expression in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 285(6), R1331-R1339, 2003.

FITZSIMONS JT Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev*, v. 78, p. 583–686, 1998.

FITTS DA, MASSON DB Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. *Behav Neurosci*, v. 103(4), p. 873-880, 1989.

FLUHARTY SJ, EPSTEIN AN Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. *Behav Neurosci*, v. 97(5), p. 746-758, 1983.

FONSECA FV, MECAWI AS, ARAUJO IG, ALMEIDA-PEREIRA G, MAGALHÃES-NUNES AP, BADAUÊ-PASSOS D JR, REIS LC Role of the 5-HT(1A) somatodendritic autoreceptor in the dorsal raphe nucleus on salt satiety signaling in rats. *Exp Neurol*, v. 217, p. 353-360, 2009.

FORSLING ML, STROMBERG P & AKERLUND M. Effect of ovarian steroids on vasopressin secretion. *J Endocrinol* 95: 147 – 151, 1982

FRANCHINI LF, JOHNSON AK, DE OLMOS J, VIVAS L Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. *Am J Physiol*, v. 282: p. R235-243, 2002.

FRY M & FERGUSON AV The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. *Physiol Behav*, v. 91(4), p. 413 – 423, 2007.

FRANKMANN SP, ULRICH P, EPSTEIN AN Transient and lasting effects of reproductive episodes on NaCl intake of the female rat. *Appetite*, v. 16(3), p. 193-204, 1991.

FREGLY MJ & THRASHER TN. Attenuation of angiotensin-induced water intake in estrogen-treated rats. *Pharmacol Biochem Behav* 9(4): 509 – 14, 1978.

FUJISAWA S, TANAKA J & NOMURA M. Estrogen attenuates the drinking response induced by activation of angiotensinergic pathways from the lateral hypothalamic area to the subfornical organ in female rats. *Behav Brain Res* 122:33 – 41, 2001.

GALLAGHER PE, LI P, LENHART JR, CHAPPELL MC & BROSNIHAN KB. Estrogen regulation of angiotensin-converting enzymemRNA. *Hypertension*33:323– 8, 1999.

GALAVERNA O, NICOLAÏDIS S, YAO SZ, SAKAI RR, EPSTEIN AN Endocrine consequence of prenatal sodium_depletion prepare rats for high need-free NaCl_intake in adulthood. *Am J Physiol*, v. 269(3 Pt 2), p. R578-R583, 1995.

GAMBLING L, DUNFORD S, WILSON CA, MCARDLE HJ, BAINES DL Estrogen and progesterone regulate alpha, beta, and gamma ENaC subunit mRNA levels in female rat kidney. *Kidney Int*, v. 65(5), p. 1774-1781, 2004.

GARCIA JM, CURTIS KS, CONTRERAS RJ Behavioral and electrophysiological taste responses change after brief and prolonged dietary sodium deprivation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 295(6), p. R1754-R1761, 2008.

GODINO A, DE LUCA LA JR, ANTUNES-RODRIGUES J, VIVAS L Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers? *Am J Physiol*, v. 293, p. R1027-R1036, 2007.

GODINO A, PITRA S, CARRER HF, VIVAS L Body sodium overload modulates the firing rate and fos immunoreactivity of serotonergic cells of dorsal raphe nucleus. *PLoS One*, v, 8(9), p. e74689, 2013.

GRAVES NS, HAYES H, FAN L & CURTIS KS. Time course of behavioral, physiological, and morphological changes after estradiol treatment of ovariectomized rats. *Physiol Behav, v. 103*(3-4), p. 261-267, 2011.

GREENWOOD MP, MECAWI AS, HOE SZ, MUSTAFA MR, JOHNSON KR, AL-MAHMOUD GA, ELIAS LL, PATON JF, ANTUNES-RODRIGUES J, GAINER H, MURPHY D, HINDMARCH CC A comparison of physiological and transcriptome responses to water deprivation and salt loading in the rat supraoptic nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 308(7), p. R559-R568, 2015.

GUO X, RAZANDI M, PEDRAM A, KASSAB G, LEVIN ER Estrogen induces vascular wall dilation: mediation through kinase signaling to nitric oxide and estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* v. 280(20), p. 19704-10, 2005.

GUTKOWSKA J, THIBAULT G, JANUSZEWICZ P, CANTIN M & GENEST J. Direct radioimmunoassay of atrial natriuretic factor. *Biochem Biophys Res Commun*, 122(2): 593 – 601, 1984.

GUTKOWSKA J, JANKOWSKI M, ANTUNES-RODRIGUES J The role of oxytocin in cardiovascular regulation. *Braz J Med Biol Res*, v. 47, p. 206-214, 2014.

HAANWINCKEL MA, ELIAS LK, FAVARETTO AL, GUTKOWSKA J, MCCANN SM & ANTUNES-RODRIGUES J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 92(17): 7902 – 7906, 1995.

HALEY GE, FLYNN FH Tachykinin NK3 receptor contribution to systemic release of vasopressin and oxytocin in response to osmotic and hypotensive challenge. *Am J Physiol*, v. 293, p. R931-R937, 2007.

HAMMING I, VAN GOOR H, TURNER AJ, RUSHWORTH CA, MICHAUD AA, CORVOL P, NAVIS G Differential regulation of renal angiotensin-converting enzyme (ACE) and ACE2 during ACE inhibition and dietary sodium restriction in healthy rats. *Exp Physiol*, v. 93(5), p. 631-638, 2008.

HARRISON-BERNARD LM, SCHULMAN IH & RAIJ L. Postovariectomy hypertension is linked to increased renal AT1 receptor and salt sensitivity. *Hypertension*, v. 42(6), p. 1157 – 1163, 2003.

HAY M, XUE B, JOHNSON AK Yes! Sex matters: sex, the brain and blood pressure. *Curr Hypertens Rep, v.* 16(8), p. 458, 2014.

HEDNER T, HEDNER J, ANDERSSON O, PERSSON B & PETTERSSON A. ANP – a cardiac hormone and a putative central neurotransmitter. *Eur Heart J* 8(Suppl B): 87 – 98, 1987.

HINOJOSA-LABORDE C, LANGE DL, HAYWOOD JR Role of female sex hormones in the development and reversal of dahl hypertension. *Hypertension*, v. 35(1 Pt 2), p. 484-489, 2000.

HINOJOSA-LABORDE C, CRAIG T, ZHENG W, JI H, HAYWOOD JR & SANDBERG K. Ovariectomy augments hypertension in aging female Dahl salt-sensitive rats. *Hypertension* 44(4):405 – 9, 2004.

IVÁNYI T, DOHANICS J, VERBALIS JG Effect of chronic hyponatremia on central and peripheral oxytocin and vasopressin secretion in rats. *Neuroendocrinology*, v. 61, p. 412-420, 1995.

JANKOWSKI M, HAJJAR F, KAWAS SA, MUKADDAM-DAHER S, HOFFMAN G, MCCANN SM & GUTKOWSKA J. Rat heart: a site of oxytocin production and action. *Proc Natl Acad Sci U S A*95(24): 14558-1 – 4563, 1998.

JANKOWSKI M, RACHELSKA G, DONGHAO W, MCCANN SM, GUTKOWSKA J Estrogen receptors activate atrial natriuretic peptide in the rat heart. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 98(20), v. 11765-11770, 2001.

JOHNSON AK, THUNHORST RL The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol*, v. 18(3), p. 292-353, 1997.

JONES AB, CURTIS KS Differential effects of estradiol on drinking by ovariectomized rats in response to hypertonic NaCl or isoproterenol: Implications for hyper- vs. hypo-osmotic stimuli for water intake. *Physiol Behav*, v. 98(4), p. 421-6, 2009.

JONKLAAS J &BUGGY J. Angiotensin-estrogen interaction in female brain reduces drinking and pressor responses. *Am J Physiol* 247(1 Pt 2): R167 – R172, 1984.

JONKLAAS J & BUGGY J. Angiotensin-estrogen central interaction: localization and mechanism, *Brain Res* 326(2):239 – 49, 1985.

KADEKARO M, LIU H, TERRELL ML, GESTL S, BUI V, SUMMY-LONG JY Role of NO on vasopressin and oxytocin release and blood pressure responses during osmotic stimulation in rats. *Am J Physiol*, v. 273(3 Pt 2), p. R1024-R1030, 1997.

KAHRILAS PJ, ROGERS RC Rat brainstem neurons responsive to changes in portal blood sodium concentration. *Am J Physiol*, v. 247(5 Pt 2), p. R792-R279, 1984.

KARPPANEN H & MERVAALA E. Sodium intake and hypertension. *Prog Cardiovasc Dis* 49(2):59 – 75, 2006.

KASCHINA E & UNGER T. Angiotensin AT1/AT2 receptors: regulation, signalling and function. Blood Press 12(2): 70 – 88, 2003.

KATOVICH MJ, SOLTIS EE, FIELD FP Effects of NaCl on vascular responsiveness in male rats. *Comp Biochem Physiol C*, v. 78(2), p. 369-372, 1984

KENSICKI E, DUNPHY G, ELY D Estradiol increases salt intake in female normotensive and hypertensive rats. *J Appl Physiol*, v. 93(2), p. 479-83, 2002.

KHANMORADI M, NASIMI A Angiotensin II in the paraventricular nucleus stimulates sympathetic outflow to the cardiovascular system and make vasopressin release in rat. *Neurosci Lett*, v. 632, p. 98-103, 2016.

KIRBY RF, NOVAK CM, THUNHORST RL, JOHNSON AK The role of beta1 and beta2 adrenoceptors in isoproterenol-induced drinking. *Brain Res*, v. 656, p. 79-84, 1994.

KISLEY LR, SAKAI RR, MA LY & FLUHARTY SJ. Estrogen decreases hypothalamic angiotensin II AT1 receptor binding and mRNA in the female rats. *Brain Res, v.* 844, p. 34 – 42, 1999a.

KISLEY LR, SAKAI RR, MA LY & FLUHARTY SJ. Ovarian steroid regulation of angiotensin II-induced water intake in rats. *Am J Physiol*, v. 276, p. R90 – R96, 1999b.

KISLEY LR, SAKAI RR, FLANAGAN-CATO LM & FLUHARTY SJ. Estrogen increases angiotensin II-induced c-Fos expression in the vasopressinergic neurons of the paraventricular nucleus in the female rat. *Neuroendocrinology*72: 306 – 317, 2000.

KOPKA SL, GERAN LC, SPECTOR AC Functional status of the regenerated chorda tympani nerve as assessed in a salt taste discrimination task. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 278(3), p. R720-R731, 2000.

KOSHIMIZU TA, NASA Y, TANOUE A, OIKAWA R, KAWAHARA Y, KIYONO Y *et al*. V1avasopressinreceptors maintain normal blood pressure by regulating circulating blood volume and baroreflex sensitivity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, v. 103(20), p. 7807-7812, 2006.

KRAUSE EG, CURTIS KS, DAVIS LM, STOWE JR & CONTRERAS RJ. Estrogen influences stimulated water intake by ovariectomized female rats. *Physiol Behav*, v. 79(2), p. 267-274, 2003.

KRAUSE EG, SAKAI RR. Richter and sodium appetite: from adrenalectomy to molecular biology. *Appetite*, v. 49, p. 353–367, 2007.

KRECEK J Sex differences in salt taste: the effect of testosterone. *Physiol Behav*, v. 10(4), p. 683-8, 1973.

LAFLAMME N, NAPPI RE, DROLET G, LABRIE C, RIVEST S Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ER_alpha and ER_beta) throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *J Neurobiol*, v. 36(3), p. 357-378, 1998.

LEHR D, MALLOW J, KRUKOWSKI M Copious drinking and simultaneous inhibition of urine flow elicited by beta-adrenergic stimulation and contrary effect of alpha-adrenergic stimulation. *J Pharmacol Exp Ther*, v. 158, p. 150-163, 1967.

LEIB DE, ZIMMERMAN CA, KNIGHT ZA Thirst. *Curr Biol*, v. 26(24), p. R1260-R1265, 2016.

LU B, YANG XJ, CHEN K, YANG DJ & YAN Q Dietary sodium deprivation evokes activation of brain regional neurons and down-regulation of angiotensin II type 1 receptor and angiotensin-convertion enzyme mRNA expression. *Neuroscience*, v. 164, p. 1303–1311, 2009.

LUCIO-OLIVEIRA F, FRANCI CR Effect of the interaction between food state and the action of estrogen on oxytocinergic system activity. *J Endocrinol*, v. 212(2), p. 129-138, 2012.

MARGATHO LO, ELIAS CF, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J Oxytocin in the central amygdaloid nucleus modulates the neuroendocrine responses induced by hypertonic volum e expansion in the rat. *J Neuroendocrinol*, v. 25(5), p. 466-477, 2013.

MARKIEWICZ M, ZNOYKO S, STAWSKI L, GHATNEKAR A, GILKESON G, TROJANOWSKA M A role for estrogen receptor-α and estrogen receptor-β in collagen biosynthesis in mouse skin. *J Invest Dermatol*, v. 133(1), p. 120-127, 2007.

MARTIN LJ, SOLLARS SI Contributory role of sex differences in the variations of gustatory function. *J Neurosci Res*, v. 95(1-2), p. 594-603, 2017.

MATSUDA T, HIYAMA TY, NIIMURA F, MATSUSAKA T, FUKAMIZU A, KOBAYASHI K, KOBAYASHI K, NODA M Distinct neural mechanisms for the control of thirst and salt appetite in the subfornical organ. *Nat Neurosci*, v. 20(2), p. 230-241, 2017

MCKINLEY MJ, ALLEN AM, BURNS P, COLVILL LM & OLDFIELD BJ. Interaction of circulating hormones with the brain: the roles of the subfornical organ and the organum vasculosum of the lamina terminalis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. Suppl. 25, p. S61-S67, 1998.

MCKINLEY MJ, JOHNSON AK The physiological regulation of thirst and fluid intake. *News Physiol Sci*, v. 19, p. 1-6, 2004.

MCKINLEY MJ, YAO ST, USCHAKOV A, MCALLEN RM, RUNDGREN M, MARTELLI D. The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)*, v. 214(1), p. 8-32, 2015.

MECAWI AS, LEPLETIER A, ARAUJO IG, OLIVARES EL, REIS LC Assessment of brain AT1-receptor on the nocturnal basal and angiotensin-induced thirst and sodium appetite in ovariectomised rats. *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst*, v. 8, p. 169-175, 2007.

MECAWI AS, LEPLETIER A, ARAUJO IG, FONSECA FV, REIS LC Oestrogenic influence on brain AT1 receptor signalling on the thirst and sodium appetite in osmotically stimulated and sodium-depleted female rats. *Exp Physiol*, v. 93, p. 1002-1010, 2008.

MECAWI AS, ARAUJO IG, ROCHA FF, COIMBRA TM, ANTUNES-RODRIGUES J, REIS LC Ontogenetic role of angiontensin-converting enzyme in rats: thirst and sodium appetite evaluation. *Physiol Behav*, v. 99, p. 118-24, 2010.

MECAWI AS, VILHENA-FRANCO T, ARAUJO IG, REIS LC, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J Estradiol potentiates hypothalamic vasopressin and oxytocin neuron activation and hormonal secretion induced by hypovolemic shock. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 301(4), p. R905-R915, 2011.

MECAWI AS, RUGINSK SG, ELIAS LL, VARANDA WA, ANTUNES-RODRIGUES J Neuroendocrine regulation of hydromineral homeostasis. *Compr Physiol*, v. 5, p. 1465-1516, 2015.

MENANI JV, DE LUCA LA JR, JOHNSON AK Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol, v.* 306(4), p. R201-R210, 2014.

MENDELSOHN ME, KARAS RH The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med*, v. 340(23), p. 1801-1811, 1999.

MENETON P, JEUNEMAITRE X, DE WARDENER HE, MACGREGOR GA Links between dietary salt intake, renal salt handling, blood pressure, and cardiovascular diseases. *Physiol Rev*, v. 85(2), p. 679-715, 2005.

MOGA MM, SAPER CB & GRAY TS. Bed nucleus of the stria terminalis: Cytoarchitecture, immunohistochemistry and projection to the parabrachial nucleus in the rat. *J Comp Neurol*, v. 283, p. 315–332, 1989.

MOOS F, RICHARD P Dual noradrenergic control of oxytocin release during the milk ejection reflex in the rat. *C R Seances Acad Sci D*, v. 290, p. 1261-1264, 1980.

MOREIRA MC, DA SILVA EF, SILVEIRA LL, DE PAIVA YB, DE CASTRO CH, FREIRIA-OLIVEIRA AH, ROSA DA, FERREIRA PM, XAVIER CH, COLOMBARI E, PEDRINO GR High sodium intake during postnatal phases induces an increase in arterial blood pressure in adult rats. *Br J Nutr*, v. 112(12), p. 1923-32, 2014.

NODA M. The subfornical organ, a specialized sodium channel, and the sensing of sodium levels in the brain. *Neuroscientist* 12(1): 80 – 91, 2006.

NODA M Hydromineral neuroendocrinology: mechanism of sensing sodium levels in the mammalian brain. *Exp Physiol*, v. 92, p. 513-522, 2007.

NODA M, SAKUTA H Central regulation of body-fluid homeostasis. *Trends Neurosci*, v. 11, p. 661-673, 2013.

OSBORN JW, COLLISTER JP, CARLSON SH Angiotensin and osmoreceptor inputs to the area postrema: role in long-term control of fluidhomeostasis and arterial pressure. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, v. 27(5-6), p. 443-449, 2000.

PRAKASH MR, NORGREN R Comparing salt appetites: induction with intracranial hormones or dietary sodium restriction. *Brain Res Bull*, v. 27(3-4), p. 397-401, 1991.

PALKOVITS M, ESKAY RL & ANTONI FA Atrial natriuretic peptide in the median eminence is of paraventricular nucleus origin. *Neuroendocrinology*, v. 46, p. 542–544, 1987.

PAMIDIMUKKALA J, HAY M 17 beta-Estradiol inhibits angiotensin II activation of area postrema neurons. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, v. 285(4), p. H1515-H1520, 2003.

PATISAUL HB, WHITTEN PL, YOUNG LJ Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17beta-estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. *Brain Res Mol Brain Res*, v. 67(1), p. 165-171, 1999.

PEYSNER K & FORSLING ML. Effect of ovariectomy and treatment with ovarian steroids on vasopressin release and fluid balance in the rat. *J Endocrinol*, v. 124 (2), p. 277–284, 1990.

PEREIRA DTB, MENANI JV, DE LUCA LA JR Furo/Cap: A protocol for sodium intake sensitization. *Physiol Behav*, v. 99, p. 472–481, 2010.

PHILLIPS MI, HEININGER F, TOFFOLO S The role of brain angiotensin in thirst and AVP release induced by hemorrhage. *Regul Pept,* v. 66, p. 3-11, 1996.

PIMENTA E, GADDAM KK, OPARIL S, ABAN I, HUSAIN S, DELL'ITALIA LJ, CALHOUN DA Effects of dietary sodium reduction on blood pressure in subjects with resistant. *Hypertension*, v. 54, p. 475-81, 2009.

POPESKI N, AMIR S, WOODSIDE B Changes in NADPH-d staining in the paraventricular and supraoptic nuclei during pregnancy and lactation in rats: role of ovarian steroids and oxytocin. *J Neuroendocrinol*, v. 11(1), p. 53-61, 1999.

PREMER C, LAMONDIN C, MITZEY A, SPETH RC, BROWNFIELD MS immunohistochemical localization of AT1a, AT1b, and AT2 angiotensin II receptor subtypes in the rat adrenal, pituitary, and brain with a perspective commentary. *Int J Hypertens*, v. 2013, p. 175428, 2013.

QUAN HX, JIN JY, WEN JF, CHO KW Beta1-adrenergic receptor activation decreases ANP release via cAMP-Ca2+ signaling in perfused beating rabbit atria. *Life Sci*, v. 87, p. 246-53, 2010.

RABELINK TJ, ROTMANS JI Salt is getting under our skin. *Nephrol Dial Transplant*, v. 24(11), p. 3282-3283, 2009.

RECKELHOFF JF, FORTEPIANI LA. Novel mechanisms responsible for postmenopausal hypertension. *Hypertension*, v. 43(5), p. 918-23, 2004.

REIS LC. Role of the serotoninergic system in the sodium appetite control. *An Acad Bras Cienc*, v. 79, p. 261-283, 2007.

REIS WL, GIUSTI-PAIVA A, VENTURA RR, MARGATHO LO, GOMES DA, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J Central nitric oxide blocks vasopressina, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats. *Exp Physiol v.* 92(5), p. 903-11, 2007.

REIS WL, SAAD WA, CAMARGO LA, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J Central nitrergic system regulation of neuroendocrine secretion, fluid intake and blood pressureinduce d by angiotensin-II. *Behav Brain Funct,* v. 6, p. 64, 2010.

RETTIG R, GANTEN D, JOHNSON AK Isoproterenol-induced thirst: renal and extrarenal mechanisms. *Am J Physiol*, v. 241, p. R152-R157, 1981.

ROBINSON MM, EVERED MD Effects of systemic and intracranial inhibition of angiotensin-converting enzyme on isoproterenol-induced drinking in the rat. *Eur J Pharmacol*, v. 90, p. 343-348, 1983.

ROSEN SG, LINARES OA, SMITH MJ, HALTER JB Down regulation of beta-adrenergic receptor-mediated function during sodium restriction in humans. *Am J Physiol*, v. 257, p. E499-E504, 1989.

RUGINSK SG, LOPES DA SILVA A, VENTURA RR, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J Central actions of glucocorticoids in the control of body fluid homeostasis: review. *Braz J Med Biol Res*, v. 42(1), p. 61-67, 2009.

RUGINSK SG, VECHIATO FM, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J The endocannabinoid system and the neuroendocrine control of hydromineral balance. *J Neuroendocrinol*, v. 26(6), p. 370-376, 2014.

SAAVEDRA, J. M. Brain and pituitary angiotensin. *Endocr* Rev, v. 13(2), p. 329–380, 1992.

SAKAI RR, FINE WB, EPSTEIN AN, FRANKMANN SP Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. *Behav Neurosci*, v. 101(5), p. 724-731, 1997.

SAKAI K, AGASSANDIAN K, MORIMOTO S, SINNAYAH P, CASSELL MD, DAVISSON RL, SIGMUND CD Local production of angiotensin II in the subfornical organ causes elevated drinking. *J Clin Invest*, v. 117, p. 1088-1095, 2007.

SALEH MC, CONNELL BJ, SALEH TM Medullary and intrathecal injections of 17beta-estradiol in male rats. *Brain Res*, v. 867(1-2), p. 200-209, 2000.

SALISBURY JJ, ROWLAND NE Sham drinking in rats: osmotic and volumetric manipulations. *Physiol Behav*, v. 47, p.625-630, 1990.

SÁNCHEZ F, ALONSO JR, ARÉVALO R, BLANCO E, AIJÓN J, VÁZQUEZ R Coexistence of NADPH-diaphorase with vasopressin and oxytocin in the hypothalamic magnocellular neurosecretory nuclei of the rat. *Cell Tissue Res*, v. 276(1), 31-34, 1994.

SANDERS PW Effect of salt intake on progression of chronic kidney disease. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, v. 15(1), 54-60, 2006.

SANTOLLO J, DANIELS D Control of fluid intake by estrogens in the female rat: role of the hypothalamus. Front Syst Neurosci, v. 9, p. 25, 2015.

SCHAFFLHUBER M, VOLPI N, DAHLMANN A, HILGERS KF, MACCARI F, DIETSCH P, WAGNER H, LUFT FC, ECKARDT KU, TITZE J Mobilization of osmotically inactive Na+ by growth and by dietary salt restriction in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, v. 292(5), p. F1490-500, 2007.

SCHEIDLER MG, VERBALIS JG, STRICKER EM Inhibitory effects of estrogen on stimulated salt appetite in rats. *Behav Neurosci*, v. 108(1), p. 141-50, 1994.

SCHIEBINGER RJ, BAKER MZ, LINDEN J Effect of adrenergic and muscarinic cholinergic agonists on atrial natriuretic peptide secretion by isolated rat atria. Potential role of the autonomic

nervous system in modulating atrial natriuretic peptide secretion. *J Clin Invest*, v. 80, p. 1687-1691, 1987.

SCHIFFRIN EL, GENEST J. Mechanism of captopril-induced drinking. *Am J Physiol*, v. 242(1), p. R136-R140, 1992.

SHIH CD Activation of estrogen receptor beta-dependent nitric oxide signaling mediates the hypotensive effects of estrogen in the rostral ventrolateral medulla of anesthetized rats. *J Biomed Sci1*, v. 6, p. 60, 2009.

SCHOORLEMMER GH, JOHNSON AK, THUNHORST RL Circulating angiotensin II mediates sodium appetite in adrenalectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 281(3), p. R723-9, 2001.

SHULTZ PJ, TOLINS JP. Adaptation to increased dietary salt intake in the rat. Role of endogenous nitric oxide. *J Clin Invest*, v. 91(2), p. 642-650, 1993.

SIMON G. Experimental evidence for blood pressure-independent vascular effects of high sodium diet.
Am J Hypertens, v. 16(12), p. 1074-1078, 2003.

SIMONIAN SX & HERBISON AE. Differential expression of estrogen receptor alpha and beta immunoreactivity by oxytocin neurons of rat paraventricular nucleus. *J Neuroendocrinol*, v. 9(11), p. 803-806, 1997.

SKOFITSCH G, JACOBOWITZ DM, ESKAY RL & ZAMIR N. Distribution of atrial natriuretic factor-like immunoreactive neurons in the rat brain.Neuroscience16(4): 917 – 948, 1985.

SKOWSKY WR, SWAN L, SMITH P Effects of sex steroid hormones on arginine vasopressin in intact and castrated male and female rats. *Endocrinology*, v. 104(1), p. 105-108, 1979.

SLADEK CD, SWENSON KL, KAPOOR R & SIDOROWICZ HE. The role of steroid hormones in the regulation of vasopressin and oxytocin release and mRNA expression in hypothalamo-neurohypophysial explants from the rat. *Exp Physiol*, v. 85, p. 171S-177S, 2000.

SLY JD, COLVILL L, MCKINLEY JM & OLDFIELD JB Identification of neural projections from the forebrain to the kidney, using the virus pseudorabies. *J Auton Nerv Syst*, v. 77(2-3), p. 73 – 82, 1999.

SMITH DW & DAY TA. Catecholamine and oxytocin cells respond to hypovolaemia as well as hypotension. *Neuroreport*, v. 14, p. 1493-1495, 2003.

SOMPONPUN SJ, SLADEK CD Osmotic regulation of estrogen receptor-beta in rat vasopressin and oxytocin neurons. *J Neurosci*, v. 23(10), p. 4261-4269, 2003.

SOMPONPUN SJ, JOHNSON AK, BELTZ T, SLADEK CD Osmotic regulation of estrogen receptor-beta expression in magnocellular vasopressin neurons requires lamina terminalis. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, v. 286(3), p. R465-R473, 2004.

SOMPONPUN SJ Neuroendocrine regulation of fluid and electrolyte balance by ovarian steroids: contributions from central oestrogen receptors. *J Neuroendocrinol*, v. 19(10), p. 809-818, 2007.

SONG SL, CROWLEY WR, GROSVENOR CE Evidence for involvement of an adrenal catecholamine in the beta-adrenergic inhibition of oxytocin release in lactating rats. *Brain Res*, v. 457, p. 303-309, 1988.

SONG D, ARIKAWA E, GALIPEAU DM, YEH JN, BATTELL ML, YUEN VG, MCNEILL JH Chronic estrogen treatment modifies insulin-induced insulin resistance and hypertension in ovariectomized rats. *Am J Hypertens*, v. 18(9 Pt 1), p. 1189-94, 2005

ST JOHN SJ The Perceptual Characteristics of Sodium Chloride to Sodium-Depleted Rats. *Chem Senses*, v. 42(2), p. 93-103, 2017.

STACHENFELD NS, TAYLOR HS, LEONE CA, KEEFE DL Oestrogen effects on urine concentrating response in young women. *J Physiol*, v. 552(Pt 3), p. 869-880, 2003.

STANHEWICZ AE, KENNEY WL Determinants of water and sodium intake and output. *Nutr Rev*, v. 73 Suppl 2, p. 73-82, 2015.

STRICKER EM, THIELS E & VERBALIS JG Sodium appetite in rats after prolonged dietary sodium deprivation: a sexually dimorphic phenomenon. *Am J Physiol, v.* 260, p. R1082 – R1088, 1991.

STRICKER EM, VERBALIS JG Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *Regul Pept*, v. 66, p. 83-85, 1996.

SWANSON LW & SAWCHENKO PE. Paraventricular nucleus: a site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Neuroendocrinology*, v. 31(6), p. 410-417, 1980.

SWENSON KL, SLADEK CD Gonadal steroid modulation of vasopressin secretion in response to osmotic stimulation. *Endocrinology*, v. 138(5), p. 2089-2097, 1997.

TANAKA J, MIYAKUBO H, FUJISAWA S & NOMURA M. Reduced dipsogenic response induced by angiotensin II activation of subfornical organ projections to the median preoptic nucleus in estrogen-treated rats. *Exp Neurol*, v. 179, p. 83-89, 2003.

THORNBOROUGH JR, PASSO SS The effects of estrogens on sodium and potassium metabolism in rats. *Endocrinology*, v. 97(6), p. 1528-1536, 1975.

THORNTON SN, SANCHEZ A, NICOLAIDIS S An angiotensin-independent, hypotension-induced, sodium appetite in the rat. *Physiol Behav*, v. 57, p. 555-561, 1995.

THUNHORST RL, MORRIS M, JOHNSON AK Endocrine changes associated with a rapidly developing sodium appetite in rats. *Am J Physiol*, v. 267, p. R1168-R1173, 1994.

THUNHORST RL, FITTS DA, SIMPSON JB Angiotensin-converting enzyme in subfornical organ mediates captopril-induced drinking. *Behav Neurosc*, v. 103, p. 1302-1310, 1989.

TIPPETT FE, PADGETT GA, EYSTER G, BLANCHARD G, BELL T Primary hypertension in a colony of dogs. *Hypertension*, v. 9(1), p. 49-58, 1987.

TOSTES RC, NIGRO D, FORTES ZB, CARVALHO MH Effects of estrogen on the vascular system. Braz J Med Biol Res, v. v. 36(9), p. 1143-1158, 2003.

VAN TOL HH, VOORHUIS DT, BURBACH JP Oxytocin gene expression in discrete hypothalamic magnocellular cell groups is stimulated by prolonged salt loading. *Endocrinology*, v. 120(1), p. 71-76, 1987.

VARGAS KG, MILIC J, ZACIRAGIC A, WEN KX, JASPERS L, NANO J, DHANA K, BRAMER WM, KRAJA B, VAN BEECK E, IKRAM MA, MUKA T, FRANCO OH The functions of estrogen receptor beta in the female brain: A systematic review. *Maturitas*, v. 93, p. 41-57, 2016.

VENTURA RR, GOMES DA, REIS WL, ELIAS LL, CASTRO M, VALENÇA MM, CARNIO EC, RETTORI V, MCCANN SM, ANTUNES-RODRIGUES J Nitrergic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to so dium intake and hypertonic blood volume expansion. *Braz J Med Biol Res*, v. 35(9), p. 1101-1109, 2002.

VENTURA RR, GIUSTI-PAIVA A, GOMES DA, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. *Neurosci Lett*, v. 379(2), p. 75-80, 2005.

VERBALIS JG, BLACKBURN RE, HOFFMAN GE & STRICKER EM. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. *Adv Exp Med Biol*395: 209 – 225, 1995.

VILHENA-FRANCO T, MECAWI AS, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J Oestradiol potentiates hormone secretion and neuronal activation in response to hypertonicextracellula r volume expansion in ovariectomised rats. *J Neuroendocrinol*, v. 23(6), p. 481-489, 2011.

VILHENA-FRANCO T, MECAWI AS, ELIAS LL, ANTUNES-RODRIGUES J Oestradiol effects on neuroendocrine responses induced by water deprivation in rats. J Endocrinol, v. 231(2), p. 167-180, 2016.

VILLAR MJ, CECCATELLI S, RÖNNQVIST M, HÖKFELT T Nitric oxide synthase increases in hypothalamic magnocellular neurons after salt loading in the rat. An immunohistochemical and in situ hybridization study. *Brain Res*, v. 644(2), p. 273-281, 1994.

VOKES TJ, WEISS NM, SCHREIBER J, GASKILL MB & ROBERTSON GL. Osmoregulation of thirst and vasopressin during normal menstrual cycle. *Am J Physiol*, v. 254, p. R641-R647, 1988.

WADE CE, KEIL LC, RAMSAY DJ Role of volume and osmolality in the control of plasma vasopressin in dehydrated dogs. *Neuroendocrinology*, v. 37(5), p. 349-53, 1983

WEISS ML & HATTON GI Collateral input to the paraventricular and supraoptic nuclei in rat. I. Afferents from the subfornical organ and the anteroventral third ventricle region. *Brain Res Bull*, v. 24(2), p. 231-238, 1990a.

WEISS ML & HATTON GI Collateral input to the paraventricular and supraoptic nuclei in rat. II. Afferents from the ventral lateral medulla and nucleus tractus solitarius. *Brain Res Bull*, v. 25(4), p. 561-567, 1990b.

WILLIAMS TD, EDWARDS A, FAIRHALL KM, ROBINSON IC, MCGARRICK GM & LIGHTMAN SL Influence of endogenous and exogenous oestrogens on posterior pituitary secretion in women. *Clin Endocrinol (Oxf)*, v. 22(5), p. 589-596, 1985.

WYSOCKI J, YE M, SOLER MJ, GURLEY SB, XIAO HD, BERNSTEIN KE, COFFMAN TM, CHEN S, BATLLE D. ACE and ACE2 activity in diabetic mice. *Diabetes*, v. 55(7), p. 2132-2139, 2006.

WOLF G. Refined salt appetite methodology for rats demonstrated by assessing sex differences. *J Comp Physiol Psychol*, v. 96(6), 1016-1021, 1982.

WONG NL, WONG EF, AU GH, HU DC Effect of alpha- and beta-adrenergic stimulation on atrial natriuretic peptide release in vitro. *Am J Physiol*, v. 255, E260-E264, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2015. WHO Sodium intake for adults and children [Online]. Disponível em http://apps.who.int/iris/handle/10665/77985 (acessado em 04/04/2017)

YAMADA K, EMSON P, HÖKFELT T Immunohistochemical mapping of nitric oxide synthase in the rat hypothalamus and colocalization with neuropeptides. *J Chem Neuroanat*, v. 10(3-4), p. 295-316, 1996.

YAMAMOTO T, SASAKI S, FUSHIMI K, ISHIBASHI K, YAOITA E, KAWASAKI K, MARUMO F, KIHARA I Vasopressin increases AQP-CD water channel in apical membrane of collecting duct cells in Brattleboro rats. *Am J Physiol*, v. 268(6 Pt 1), p. C1546-C1551, 1995.

YUAN K, RHEE KS, PARK WH, KIM SW, KIM SH Different response of ANP secretion to adrenoceptor stimulation in renal hypertensive rat atria. *Peptides*, v. 29, p. 1207-1215, 2008.

ZARDETTO-SMITH AM, MAGNUSON DJ & GRAY TS Efferent projections from the bed nucleus of the stria terminalis to the nucleus of the solitary tract and the ventrolateral medulla in the rat. *Soc Neurosci Abstr, v.* 15, p. 265, 1989.