

NATHALIA VIEIRA DOS SANTOS

**Participação da angiotensina na manutenção da pressão
arterial em ratos depletados de sódio**

Araraquara

2015

NATHALIA VIEIRA DOS SANTOS

**Participação da angiotensina na manutenção da pressão
arterial em ratos depletados de sódio**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
ao Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica da
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara,
da Universidade Estadual Paulista, para a obtenção do
grau de Farmacêutica-Bioquímica.

Orientador: Profa. Dra. Patrícia Maria de Paula

Araraquara

2015

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha mãe, Vanessa Maria Porphório, por sempre me apoiar e ter desistido de tanto por mim.

AGRADECIMENTOS

- Agradeço à Faculdade de Ciências Farmacêuticas pelo aprendizado e experiências;
- À Profa. Dra. Patrícia Maria de Paula pela orientação deste trabalho;
- Michele Fávero, Miguel Furtado Menezes, Naira Marques, Silas Pereira Barbosa, Adriano Oliveira por todo o apoio nos treinamentos e na realização deste trabalho;
- Minha família e amigos, especialmente minha mãe Vanessa Maria Porphírio, por sempre me apoiar.

SUMÁRIO

1. RESUMO.....	6
2. LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	8
3. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
4. INTRODUÇÃO	10
5. DESENVOLVIMENTO.....	12
5.1 OBJETIVO.....	12
5.2. MATERAIS E MÉTODOS.....	13
5.2.1. Animais	13
5.2.2. Drogas e soluções utilizadas.....	13
5.2.3. Canulação da artéria e veia femoral.....	14
5.2.4. Medida da pressão arterial e frequência cardíaca	14
5.2.5. Depleção de sódio de 24 h.....	14
5.2.6 Medida da ingestão de água após 24 horas da depleção de sódio com furosemida e dieta pobre em sódio.....	15
5.2.7. Protocolo de repleção de sódio e medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio com furosemida e 24 horas de dieta pobre em sódio	15
5.2.8. Apresentação dos resultados e análise estatística	15
5.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL	16
5.3.1. Efeito do bloqueio do sistema renina-angiotensina ou do sistema vasopressinérgico sobre as respostas cardiovasculares basais em animais depletados de sódio com furosemida com 24h de dieta pobre em sódio.....	16

5.4. RESULTADOS	18
5.4.1. <i>Efeitos da depleção de sódio sobre os parâmetros cardiovasculares basais e ingestão de água 24 h após a depleção.</i>	18
5.4.2. <i>Efeito do bloqueio do sistema renina-angiotensina com losartan (antagonista dos receptores AT1 da ANG II) sobre as respostas cardiovasculares basais e ingestão de água em animais depletados de sódio com furosemida e 24 horas de dieta pobre em sódio.</i>	21
5.4.3. <i>Efeito do bloqueio do sistema vasopressinérgico com composto de Manning (AVPX, antagonista de receptores V1 da vasopressina) sobre as respostas cardiovasculares basais e ingestão de água e sódio em animais depletados de sódio com furosemida e 24 horas de dieta pobre em sódio.</i>	28
5. DISCUSSÃO	35
6. CONCLUSÃO	37
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

1. RESUMO

Alterações de volemia podem ser causadas por diferentes situações fisiológicas como vômito, diarreia, aumento da ingestão de sódio, ou pelo uso de diuréticos. A depleção de sódio produzida pela injeção subcutânea (s.c.) do diurético furosemida acompanhada de uma dieta deficiente em sódio por 24 horas é um modelo amplamente utilizado no nosso laboratório para o estudo do apetite ao sódio. A depleção de sódio com o diurético furosemida promove um aumento da excreção de sódio e água, levando a alterações no balanço hidroeletrolítico corporal dos, ativando assim respostas comportamentais, hormonais e autonômicas para corrigir tais mudanças e restaurar a homeostase. Estudo do nosso laboratório demonstrou que apesar de apresentarem redução de volume plasmático, não se observa alterações significativas da pressão arterial em ratos com 24 h de depleção de sódio pelo tratamento com o diurético furosemida combinado com uma dieta deficiente de sódio. Desta forma, no presente estudo investigamos o papel do sistema renina-angiotensina pela injeção periférica de losartan (antagonista de receptores AT1 de angiotensina) e do sistema vasopressinérgico pela injeção periférica de composto de Manning (antagonista de receptores V1 de vasopressina) na manutenção da pressão arterial de ratos depletados de sódio. Foram utilizados ratos Holtzman (280-300 g, n=73) com cateter inserido na artéria femoral para registro da pressão arterial pulsátil (PAP) e veia femoral para injeção intravenosa (i.v.) de losartan ou composto de Manning. A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram calculadas a partir do registro da PAP. A depleção de sódio foi induzida pelo tratamento com o diurético furosemida injetado subcutaneamente (s.c.) combinado com uma dieta deficiente em sódio por 24 h e livre acesso a água. Os parâmetros cardiovasculares foram medidos em ratos depletados de sódio (tratados com furosemida), ratos

controle (tratados com veículo da furosemida) e ratos repletos de sódio (2h de acesso livre a sódio 0,3 M e água).

A depleção de sódio não modificou a PAM (103 ± 1 mmHg, vs. normovolêmicos: 104 ± 1 mmHg) e FC basais (394 ± 6 bpm, vs. normovolêmico: 390 ± 6 bpm). A injeção i.v. de losartan (10 mg/kg de peso corporal) diminuiu a PAM em ratos depletados de sódio (83 ± 3 mmHg, vs. salina: 106 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) e não alterou a FC (418 ± 14 bpm, vs. salina: 411 ± 17 bpm, $p < 0,05$). Em ratos repletos a PAM não retornou aos valores normais (85 ± 2 mmHg) e a FC permaneceu inalterada (398 ± 12 bpm). A injeção i.v. de Composto de Manning (10 mg/kg de peso corporal) não alterou a PAM em ratos depletados de sódio (103 ± 1 mmHg, vs. salina: 107 ± 2 mmHg, $p > 0,05$) e a FC (406 ± 10 bpm, vs. salina: 416 ± 18 bpm, $p < 0,05$). Em ratos repletos a PAM e a FC também permaneceram inalteradas (103 ± 2 mmHg e 414 ± 13 bpm, respectivamente).

Desta forma, nossos resultados sugerem que os mecanismos angiotensinérgicos, mas não os vasopressinérgicos, são importantes para a manutenção da PAM em ratos depletados de sódio.

Palavras-chave: depleção de sódio, regulação cardiovascular, angiotensina, vasopressina.

2. LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c.	19
Figura 2: Ingestão diária de água de ratos tratados com veículo ou furosemida s.c.	20
Figura 3: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo), combinado com injeção i.v. de salina ou losartan antes e após a repleção de sódio (2 h de ingestão de água e sódio 0,3 M).	23
Figura 4: Ingestão cumulativa de água e sódio 0,3 M em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. combinado com injeção i.v. de salina ou losartan.	24
Figura 5: Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e variação da frequência cardíaca (Δ FC) em ratos que receberam injeção i.v. de ANG II ou salina antes e 10 minutos após injeção de salina ou losartan. Os grupos foram tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo), e submetidos a 2 h de repleção com água e sódio 0,3 M.	27
Figura 6: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. combinado com injeção i.v. de salina ou composto de Manning antes e após a repleção de sódio (2 h de ingestão de água e sódio 0,3 M).	30
Figura 7: Ingestão cumulativa de água e sódio 0,3 M em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. combinado com injeção i.v. de salina ou composto de Manning.	31
Figura 8: Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e variação da frequência cardíaca (Δ FC) em ratos que receberam injeção i.v. de AVP ou salina antes e 10 minutos após injeção de salina ou composto de Manning . Os grupos foram tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo, 20 mg/kg de peso corporal), e submetidos a 2 h de repleção com água e sódio 0,3 M.	34

3. LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANG II	angiotensina II
AVP	arginina-vasopressina
AVPX	composto de Manning (antagonista de receptores V1 da vasopressina)
FC	frequência cardíaca
i.v.	intravenoso
NOR	norepinefrina
PA	pressão arterial
PAM	pressão arterial média
PAP	pressão arterial pulsátil
s.c.	subcutâneo
SNC	sistema nervoso central

4. INTRODUÇÃO

A composição e o volume dos líquidos corporais devem ser regulados dentro de uma faixa estreita para a manutenção adequada da pressão sanguínea para os tecidos. Diariamente os animais perdem água e/ou eletrólitos (principalmente o sódio), através do suor, respiração e predominantemente pela urina. Portanto, é essencial que haja uma regulação dos mecanismos que controlam o balanço entre a ingestão e a excreção de água e eletrólitos, em especial o sódio que representa o principal fator osmótico do compartimento extracelular para evitar mudanças na volemia corporal (Verbalis, 2003).

Alterações de volemia podem ser causadas por diferentes situações fisiológicas como vômito, diarreia, ou pelo uso de diuréticos. A depleção de sódio produzida pela injeção subcutânea do diurético furosemida acompanhada de uma dieta deficiente em sódio por 24 horas é um modelo amplamente utilizado para o estudo do apetite ao sódio (Sato e cols., 1996; Menani e cols., 1998; Nozaki e cols., 2002; de Oliveira e cols., 2003; de Oliveira e cols., 2007; Menezes e cols., 2011). A depleção de sódio promove a redução do sódio corporal e diminuição da volemia, levando a alterações no balanço dos fluidos corporais que ativam respostas comportamentais, hormonais e autonômicas para corrigir tais mudanças e restaurar a homeostase de sódio (Zardetto-Smith e cols., 1993; De Luca e cols., 1996; De Luca e cols., 2000). Porém, apesar da diminuição da volemia corporal, estudo anterior de nosso laboratório demonstrou que não há alterações cardiovasculares decorrente da depleção de sódio (Fávero, 2012). Esse resultado levanta questionamentos sobre quais mecanismos estariam atuando na manutenção dos parâmetros cardiovasculares nesses animais hipovolêmicos.

Na depleção de sódio com furosemida, ocorrem modificações endócrinas e neuronais que podem estar envolvidas na manutenção dos parâmetros cardiovasculares nesses animais

depletados de sódio. Durante a depleção de sódio com furosemida ocorre redução na reatividade vascular (Armstrong e cols., 1986; Gerkens e cols., 1987), desativação de receptores de volume, atenuação do barorreflexo (Rocchini e cols., 1977; Echtenkamp e Anderson, 1988) e alterações neuroendócrinas como um elevado nível de angiotensina II (ANG II), vasopressina e aldosterona circulante (Haber, 1976; Speilman e Davis, 1974). Considerando o aumento da ANG II e vasopressina circulante em ratos depletados de sódio, decidimos estudar se as ações desses neurotransmissores estariam atuando na manutenção dos parâmetros cardiovasculares nesses animais.

O sistema renina-angiotensina é um sistema de regulação cardiovascular que interage com o sistema nervoso simpático garantindo a manutenção da pressão arterial (Zimmerman, 1973). A ANG II age na terminação pré-sináptica do nervo simpático facilitando a neurotransmissão simpática e auxiliando na conservação do tônus vascular (Reid, 1992; Zimmerman, 1973; Zimmerman e cols., 1984). Apesar de ANG II potencializar a atividade simpática, foi sugerido que durante a depleção de sódio a atividade simpática estaria reduzida em cães (Brosnihan e cols., 1981; Szilagyi e cols., 1981). Adicionalmente, estudos do nosso laboratório mostraram que a depleção de sódio reduziu a resposta pressora à injeção periférica de ANG II e NOR, mas não a AVP (Colombari e cols., 1992). O mesmo efeito de atenuação de resposta pressora foi obtido com injeção central de ANG II, NOR e carbachol, sugerindo que a depleção de sódio atenua os mecanismos envolvidos na resposta pressora mediada pela ativação central e periférica mediada por ativação simpática e ANG II (Colombari e cols., 1992).

A ativação do sistema renina-angiotensina pode acarretar também liberação de vasopressina, um hormônio que possui um importante papel na regulação cardiovascular e no balanço hidroeletrolítico, tendo uma ação vasoconstritora e favorecendo reabsorção renal de água (Boone e Deen, 2008). Foi sugerido que a vasopressina tem um papel vasoconstritor relevante em

ratos depletados de sódio (Jover e cols., 1987), e que a ausência de AVP nesses animais pode levar a hiponatremia (Harrington, 1981). Contudo, foi observado que a depleção de sódio com furosemida e dieta pobre em sódio por três dias atenua a resposta pressora da vasopressina em ratos, sugerindo que este modelo de depleção pode comprometer mecanismos vasopressinérgicos de regulação da pressão arterial (Murray e Paller, 1986).

Os sistemas renina-angiotensina e vasopressina são cruciais na manutenção dos parâmetros cardiovasculares. Contudo, os mecanismos envolvidos na manutenção da pressão arterial em ratos depletados de sódio com furosemida ainda não foram completamente elucidados. Desta forma, o objetivo do estudo foi investigar o papel dos sistemas angiotensinérgico e vasopressinérgico sobre as respostas cardiovasculares de ratos depletados de sódio com furosemida, também analisando o efeito da repleção de sódio nesses animais.

5. DESENVOLVIMENTO

5.1 OBJETIVO

O objetivo do presente estudo foi investigar se o bloqueio de receptores do tipo AT1 da ANG II com losartan (antagonista de receptores AT1 de angiotensina) e o bloqueio de receptores de vasopressina com composto de Manning (antagonista de receptores V1 de vasopressina) alterariam a PAM e FC de ratos depletados de sódio, assim como analisar os efeitos da repleção de sódio nesses animais.

5.2. MATERAIS E MÉTODOS

5.2.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman, com peso entre 280-320g, fornecidos pelo Biotério do Campus de Araraquara da UNESP. Os animais foram mantidos a uma temperatura controlada ($25\pm 1^{\circ}\text{C}$) e submetidos a um ciclo claro-escuro de 12:12h. Os animais tiveram livre acesso à água, ração e sódio 0,3 M (quando necessário). Os experimentos foram realizados entre as 8:00 e 18:00 no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara (FOAr), UNESP. Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Faculdade de Odontologia de Araraquara da UNESP (Proc. CEUA nº 06/2013).

5.2.2. Drogas e soluções utilizadas

- Furosemida (20 mg/kg de peso corporal, diurético/saliurético) dissolvida em salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio e administrada subcutânea (s.c.), 1 mL por rato;
- Losartan (10 mg/kg de peso corporal, antagonista dos receptores AT1 de ANG II);
- Composto de Manning (AVPX [Mercapto-Ciclopentametilpropionil1, O-Me-Tyr2, Arg8], 10 µg/kg de peso corporal, antagonista de receptores V1 da vasopressina, dose utilizada por Dose Blanch e cols, 2007);
- Angiotensina II (ANG II, 50 ng/0,1 mL/por rato);
- Arginina-vasopressina (AVP, 12,5 ng/0,1 mL/por rato).

Todas as drogas foram obtidas da Sigma Chemical, St. Louis, MO, EUA. As drogas (com exceção da furosemida) foram dissolvidas em salina isotônica estéril e tiveram administração

intravenosa. Salina isotônica estéril ou veículo da furosemida (salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio) foram utilizados nos experimentos controle.

5.2.3. Canulação da artéria e veia femoral

Um dia antes dos experimentos foi realizada a canulação da artéria e veia femorais. Antes de serem implantadas, as cânulas foram preenchidas com solução fisiológica e obstruídas na extremidade livre do PE-50 com pinos de metal. Sob anestesia pela ketamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal), a cânula arterial foi introduzida na aorta abdominal, através da artéria femoral e uma outra cânula foi introduzida na veia femoral. Uma vez implantadas, as cânulas foram dirigidas subcutaneamente, com auxílio de um trocáter, para a região escapular do rato, onde foram exteriorizadas e fixadas com linha de sutura. A cânula arterial foi utilizada para registro direto da pressão arterial pulsátil e a cânula venosa utilizada para administração sistêmica de drogas.

5.2.4. Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial pulsátil (PAP) foi registrada em ratos não anestesiados submetidos a canulação prévia (um dia antes do registro) da artéria femoral. A PAM e FC foram calculadas a partir desse registro. A cânula PE 50 foi conectada a um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db) acoplado a um sistema computadorizado de registro (Power Lab, ADInstruments).

5.2.5. Depleção de sódio de 24 h

A depleção de sódio foi feita pelo tratamento com uma única dose de 1 ml/rato do diurético furosemida, seguido da manutenção dos ratos por 24 h com dieta deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum* antes de se iniciar o protocolo experimental. Os ratos do grupo controle receberam tratamento com o veículo da furosemida (salina isotônica com pH próximo a 9,0

ajustado com solução de hidróxido de sódio, única dose de 1 mL/rato s.c.) e foram mantidos também por 24 horas com alimento deficiente em sódio (fubá, contendo 0,001% de sódio) e água *ad libitum*.

5.2.6 Medida da ingestão de água após 24 horas da depleção de sódio com furosemida e dieta pobre em sódio

Buretas graduadas (divisão de 0,1 ml) contendo água foram ofertadas aos animais *ad libitum* e a ingestão de água induzida pela depleção de sódio com furosemida e dieta pobre em sódio foi registrada 24 horas após a injeção s.c. do diurético.

5.2.7. Protocolo de repleção de sódio e medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio com furosemida e 24 horas de dieta pobre em sódio

A ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio com furosemida e 24 horas de dieta pobre em sódio foi registrada no protocolo de repleção de sódio a cada 30 min durante 2 horas. Para o registro da ingestão de água e de NaCl 0,3 M foram utilizadas buretas graduadas (divisão de 0,1 ml), oferecidas aos animais *ad libitum* por 2 horas. Durante o período de registro da ingestão de água os ratos não tiveram acesso à fubá.

5.2.8. Apresentação dos resultados e análise estatística

A média e o erro padrão da média (EPM) estão representados graficamente. Análise de variância (ANOVA) de duas vias e pós-teste de Student-Newman-Keuls foram utilizados para as comparações entre os diferentes tratamentos e grupos. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

5.3. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

5.3.1. Efeito do bloqueio do sistema renina-angiotensina ou do sistema vasopressinérgico sobre as respostas cardiovasculares basais em animais depletados de sódio com furosemida com 24h de dieta pobre em sódio.

Neste protocolo experimental avaliamos os efeitos cardiovasculares do bloqueio do sistema renina-angiotensina e dos receptores V1 da vasopressina de ratos tratados com furosemida (animais depletados) e animais tratados com veículo da furosemida (animais normovolêmicos), antes e após a repleção de sódio (animais repletos).

Os ratos foram divididos aleatoriamente em dois grupos: furosemida (grupo que recebeu injeção subcutânea de furosemida e 24 horas de dieta pobre em sódio) e veículo (grupo que recebeu injeção subcutânea de veículo da furosemida, salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio mais 24 horas de dieta pobre em sódio).

Os parâmetros cardiovasculares foram avaliados antes e após a repleção com sódio hipertônico (NaCl 0,3 M) e água. No protocolo de repleção de sódio, buretas graduadas contendo água e NaCl 0,3 M são oferecidas aos animais durante 2 horas, e a medida da ingestão é realizada a cada 30 minutos. Em cada um dos grupos (furosemida e veículo), metade recebeu a injeção intravenosa do antagonista (losartan ou composto de Manning) e a outra metade recebeu injeção intravenosa de salina. Portanto, foram avaliados os parâmetros cardiovasculares, antes e após repleção de sódio de quatro grupos: veículo + salina (normovolêmicos sem bloqueio dos receptores, grupo controle); veículo + losartan ou composto de Manning (normovolêmicos com o bloqueio dos receptores AT1 ou V1, respectivamente); furosemida + salina (depletados, sem bloqueio dos receptores); furosemida + losartan ou composto de Manning (depletados com bloqueio dos receptores AT1 ou V1, respectivamente).

No dia anterior ao experimento, os ratos foram submetidos à cirurgia para canulação da artéria e veia femoral e então receberam uma injeção subcutânea de 1 ml de furosemida, e foram colocados em caixas individuais seguido da manutenção destes animais por 24 h com dieta deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum*. Foi realizada a medida de ingestão de água após 24 horas da depleção dos animais por meio de buretas graduadas.

No dia seguinte, os animais foram conectados ao transdutor de pressão com livre movimentação, e tiveram um período exploratório que variou de 30 a 60 minutos, até que os parâmetros cardiovasculares se estabilizassem. Após este período, as medidas basais de PAM e FC foram registradas por 10 minutos. Em seguida, foram realizadas as injeções intravenosas de losartan (10 mg/kg de peso corporal, antagonista dos receptores AT1 de ANG II) ou composto de Manning (10 ug/kg de peso corporal, antagonista dos receptores V1 da vasopressina) ou salina nos animais. Para confirmar a efetividade do bloqueio dos receptores AT1 de ANG II ou V1 da vasopressina, 10 minutos após a injeção dos antagonistas, foi realizada administração dos agonistas da ANG II ou vasopressina.

Após este experimento, com o objetivo de restaurar o balanço de sódio e volume corporal em ratos depletados de sódio, os ratos foram colocados em gaiolas individuais e tiveram livre acesso a água e sódio 0,3 M em buretas graduadas (divisão de 0,1 ml). A ingestão cumulativa de água e sódio 0,3 M foi medida durante 2 h aos 30, 60, 90 e 120 min. Após as 2 h de ingestão, os ratos repletos de sódio foram conectados novamente ao transdutor de pressão, passaram pelo período exploratório, foram realizadas as medidas basais de PAM e FC, foram realizadas as injeções intravenosas de losartan ou composto de Manning ou salina nos ratos repletos de sódio, e após 10 minutos foi administrada ANG II ou vasopressina para verificar a efetividade do bloqueio dos receptores pelos antagonistas, sendo que a PAM e FC foram monitoradas durante todo o processo.

5.4. RESULTADOS

5.4.1. Efeitos da depleção de sódio sobre os parâmetros cardiovasculares basais e ingestão de água 24 h após a depleção.

A depleção de sódio não modificou a pressão arterial média (PAM, 103 ± 1 mmHg, vs. veículo: 104 ± 1 mmHg, figura 1, painel superior) e a FC (394 ± 6 bpm, vs. veículo: 398 ± 6 bpm, figura 1, painel superior). Porém, a ingestão diária de água aumentou nos animais depletados de sódio (20 ± 1 ml/24 h, vs. veículo: 10 ± 1 ml/24 h, $p < 0,05$; figura 2).

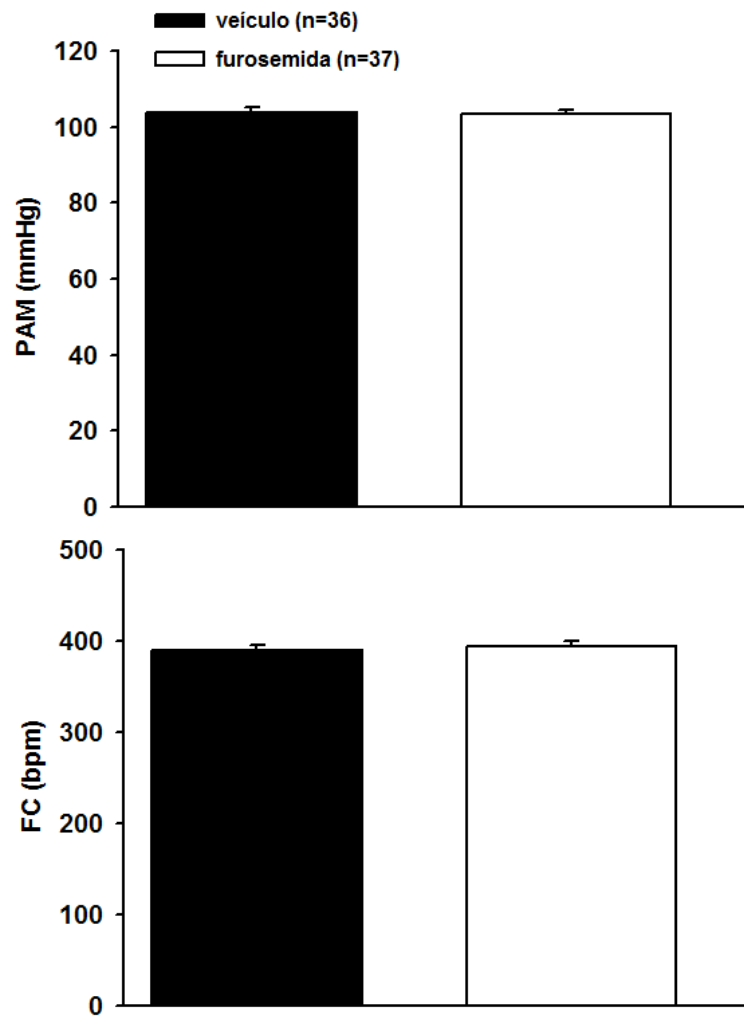


Figura 1: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. n = número de animais por grupo. Teste t-student.

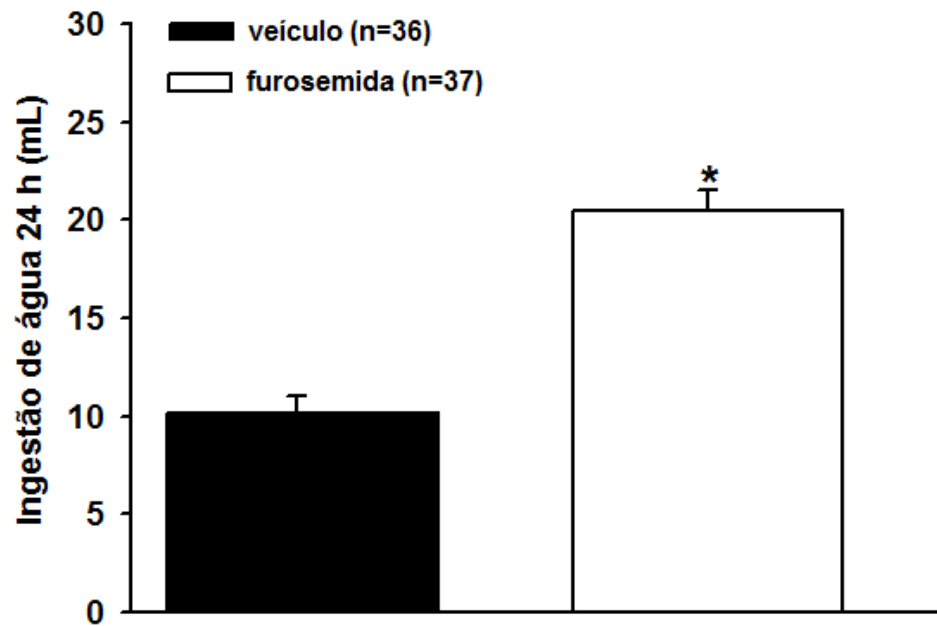


Figura 2: Medida da ingestão de água por 24 horas de ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. n = número de animais por grupo. Teste t-student. * diferente do grupo que recebeu veículo s.c.

5.4.2. Efeito do bloqueio do sistema renina-angiotensina com losartan (antagonista dos receptores AT1 da ANG II) sobre as respostas cardiovasculares basais e ingestão de água em animais depletados de sódio com furosemida e 24 horas de dieta pobre em sódio.

A figura 3 apresenta a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos tratados com veículo (salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio) ou furosemida s.c., que receberam injeção intravenosa de salina ou losartan (10 mg/kg de peso corporal). As medidas foram realizadas antes e após a repleção com água e sódio 0,3 M. A injeção i.v. de losartan diminuiu a PAM em ratos normovolêmicos (veículo + losartan: 92 ± 3 mmHg, vs. veículo + salina: 101 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) e depletados de sódio (furo + losartan: 83 ± 3 mmHg, vs. furo + salina: 107 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) e não alterou a FC (veículo + losartan: 401 ± 11 bpm, vs. veículo + salina: 410 ± 11 bpm, furo + losartan: 418 ± 14 bpm, vs. furo + salina 411 ± 17 bpm). Vale destacar que a injeção i.v. de losartan produziu uma queda maior na pressão arterial no grupo depletado quando comparado com o grupo normovolêmico (furo + losartan: 83 ± 3 mmHg, vs. veículo + losartan: 92 ± 3 mmHg, $p < 0,05$). Após a repleção, a injeção i.v. de losartan diminuiu a PAM em ratos normovolêmicos (veículo + losartan: 91 ± 4 mmHg, vs. veículo + salina: 100 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) e depletados de sódio (furo + losartan: 85 ± 2 mmHg, vs. furo + salina: 105 ± 2 mmHg, $p < 0,05$) e não alterou a FC (veículo + losartan: 416 ± 17 bpm, vs. veículo + salina: 393 ± 11 bpm, furo + losartan: 398 ± 11 bpm, vs. furo + salina 409 ± 13 bpm). Vale destacar que após a repleção, a injeção i.v. de losartan também produziu queda na pressão arterial no grupo depletado e no grupo normovolêmico, porém estas quedas na PAM não foram estatisticamente diferentes (furo + losartan: 85 ± 2 mmHg, vs. veículo + losartan: 91 ± 4 mmHg, $p < 0,05$).

A figura 4 apresenta a ingestão cumulativa de água e sódio 0,3 M em ratos tratados com veículo (salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio) ou furosemida s.c., que receberam injeção intravenosa de salina ou losartan (10 mg/kg de peso corporal). A ingestão cumulativa foi avaliada por 2 horas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Podemos verificar que os grupos que receberam furosemida tiveram um aumento na ingestão de sódio 0,3 M (furo + salina: 12 ± 1 ml/120 min e furo + losartan: 11 ± 1 ml/120 min, vs. veículo + salina: 3 ± 1 ml/120 min e veículo + losartan: 2 ± 1 ml/120 min), e água (furo + salina: 3 ± 1 ml/120 min e furo + losartan: 3 ± 1 ml/120 min, vs. veículo + salina: $1 \pm 0,4$ ml/120 min e veículo + losartan: $0,5 \pm 0,2$ ml/120 min). Não houve diferença estatística na ingestão de água ou sódio entre os grupos veículo + salina e veículo + losartan, bem como entre os grupos furo + salina e furo + losartan.

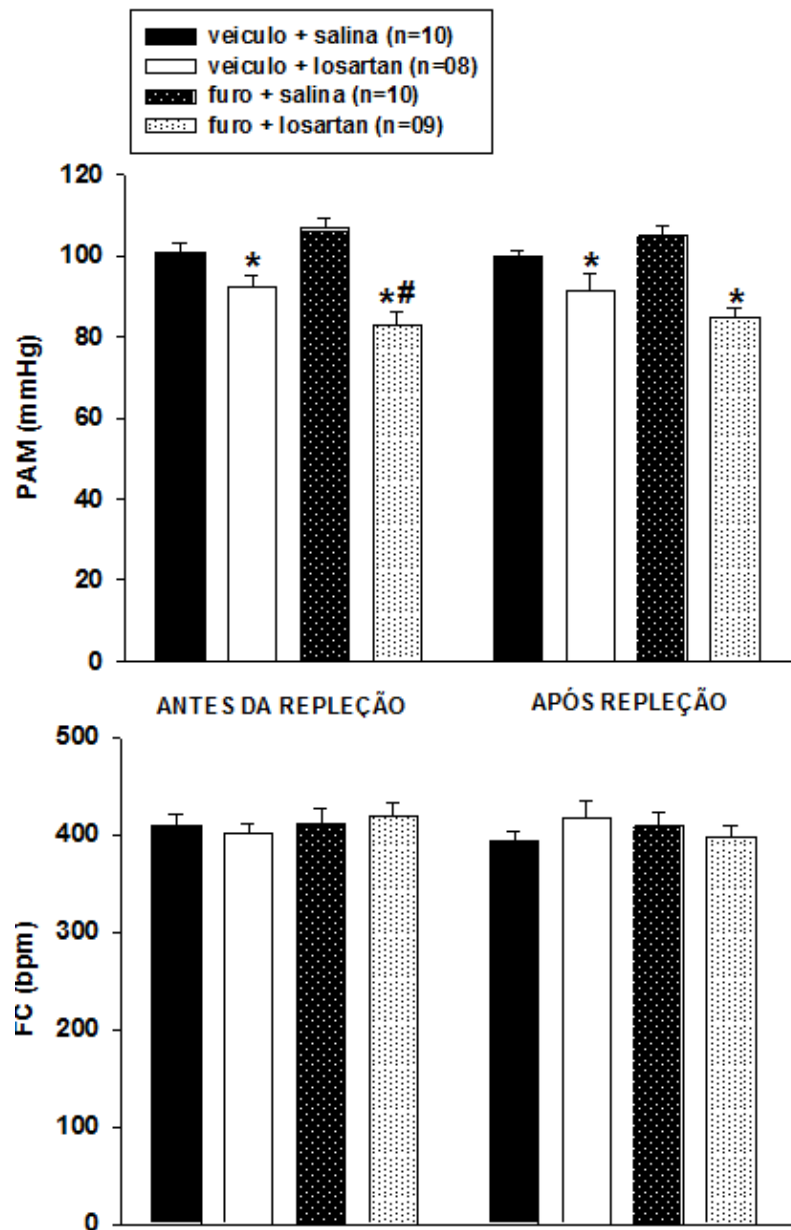


Figura 3: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo), combinado com injeção i.v. de salina ou losartan (10 mg/kg de peso corporal) antes e após a repleção de sódio (2 h de ingestão de água e sódio 0,3 M). Resultados expressos como média $\pm$ EPM. n = número de animais por grupo. ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. * diferente de veículo + salina e furo + salina. # diferente de veículo + losartan.

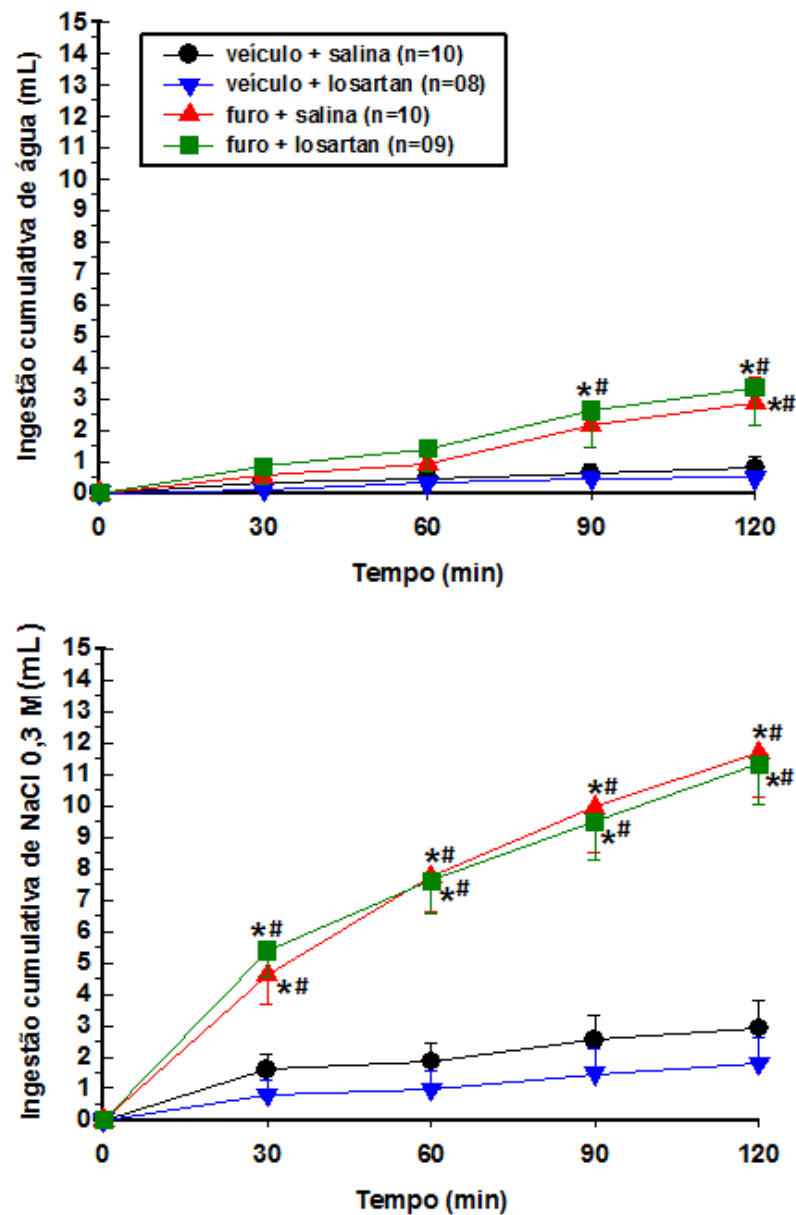


Figura 4: Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo, 20 mg/kg de peso corporal) combinado com injeção i.v. de salina ou losartan (10 mg/kg de peso corporal). Resultados expressos como média $\pm$ EPM. n= número de animais por grupo. ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. * diferente de veículo + salina e # diferente de veículo + losartan.

Para testar a efetividade do bloqueio dos receptores AT1 de ANG II, os mesmos animais receberam ANG II (50 ng/0,1 mL) antes e após o tratamento com losartan.

A figura 5 mostra a variação da pressão arterial média (Δ PAM) e variação da frequência cardíaca (Δ FC) em ratos que receberam injeção i.v. de ANG II (50 ng/0,1 mL) ou salina antes e 10 minutos após injeção de salina ou losartan (10 mg/kg de peso corporal). Os grupos foram tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo, 20 mg/kg de peso corporal), e submetidos a 2 h de repleção com água e sódio 0,3 M. É possível observar que o pré-tratamento com losartan bloqueou a resposta pressora produzida pela injeção i.v. de ANG II em animais normovolêmicos (veículo + losartan + ANG II: $\Delta = 0,3 \pm 1$ mmHg, vs. veículo + salina + ANG II: $\Delta = 43 \pm 2$ mmHg, $p < 0,05$) e bloqueou também a bradicardia (veículo + losartan + ANG II: $\Delta = -4 \pm 4$ bpm, vs. veículo + salina + ANG II: $\Delta = -75 \pm 11$, $p < 0,05$) bem como em animais depletados (furo + losartan + ANG II: $\Delta = 0,2 \pm 1$ mmHg, vs. furo + salina + ANG II: $\Delta = 31 \pm 3$ mmHg, $p < 0,05$) e a bradicardia (furo + losartan + ANG II: $\Delta = -1 \pm 4$ bpm, vs. furo + salina + ANG II: $\Delta = -48 \pm 14$ bpm, $p < 0,05$). Vale destacar, que a resposta pressora e a bradicardia à injeção i.v. de ANG II foram atenuadas no grupo furo + salina + ANG II ($\Delta = 31 \pm 3$ mmHg e $\Delta = -48 \pm 14$ bpm, $p < 0,05$) quando comparadas com o grupo veículo + salina + ANG II ($\Delta = 43 \pm 2$ mmHg e $\Delta = -75 \pm 11$ bpm), antes da repleção. Após a repleção com água e sódio 0,3 M, o pré-tratamento com losartan também bloqueou a resposta pressora produzida pela injeção i.v. de ANG II em animais normovolêmicos (veículo + losartan + ANG II: $\Delta = -0,3 \pm 1$ mmHg, vs. veículo + salina + ANG II: $\Delta = 42 \pm 2$ mmHg, $p < 0,05$) e a bradicardia (veículo + losartan + ANG II: $\Delta = 1 \pm 3$ bpm, vs. veículo + salina + ANG II: $\Delta = -66 \pm 5$ bpm, $p < 0,05$) bem como em animais depletados (furo + losartan + ANG II: $\Delta = -0,1 \pm 1$ mmHg, vs. furo + salina + ANG II: $\Delta = 38 \pm 4$ mmHg, $p < 0,05$) e a bradicardia (furo + losartan + ANG II: $\Delta = 2 \pm 4$ bpm, vs. furo + salina +

ANG II: $\Delta = 64 \pm 9$ bpm, $p < 0,05$). Porém, após a repleção, a resposta pressora e a bradicardia à injeção i.v. de ANG II no grupo furo + salina + ANG II ($\Delta = 38 \pm 4$ mmHg e $\Delta = -64 \pm 9$ bpm) não foi diferente do grupo veículo + salina + ANG II ($\Delta = 43 \pm 2$ mmHg e $\Delta = -66 \pm 5$ bpm).

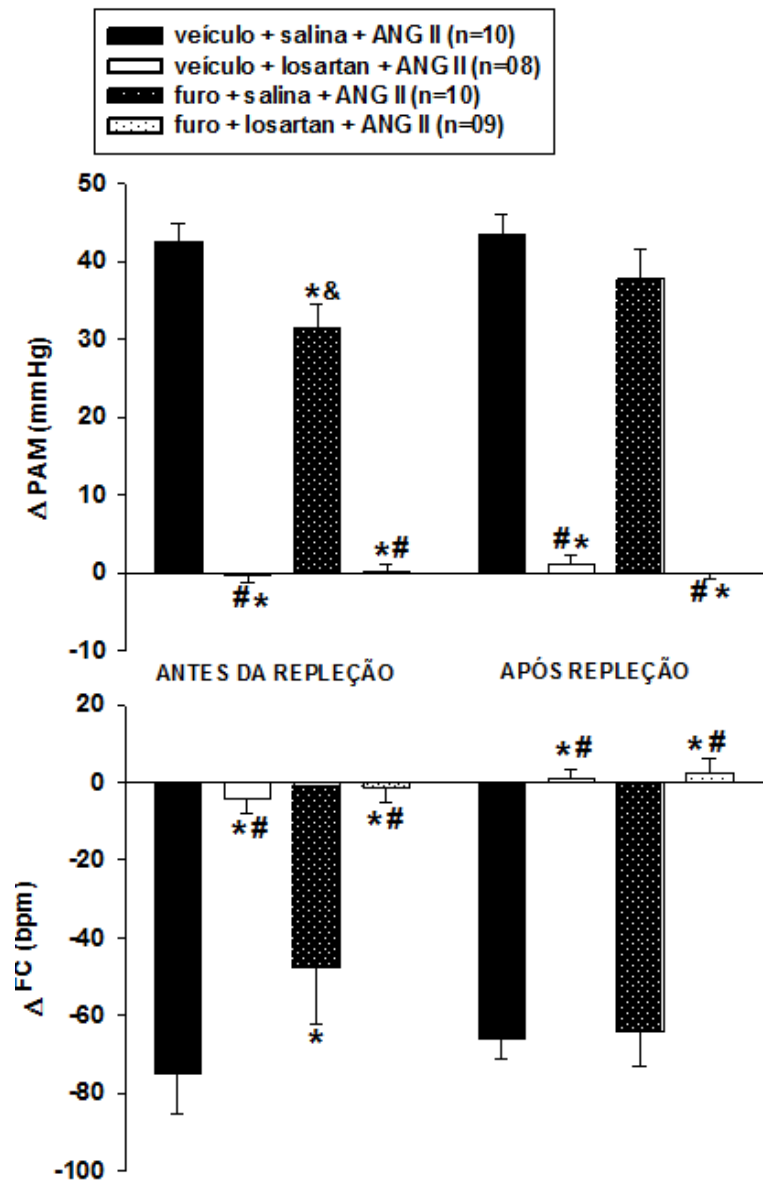


Figura 5: Variação da pressão arterial média (Δ PAM) e variação da frequência cardíaca (Δ FC) em ratos que receberam injeção i.v. de ANG II (50 ng/0,1 mL) ou salina antes e 10 minutos após injeção de salina ou losartan (10 mg/kg de peso corporal). Os grupos foram tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo), e submetidos a 2 h de repleção com água e sódio 0,3 M. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. n = número de animais por grupo. Estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. # diferente de furo + salina. * diferente de veículo + salina. & diferente de repleto.

5.4.3. Efeito do bloqueio do sistema vasopressinérgico com composto de Manning (AVPX, antagonista de receptores V1 da vasopressina) sobre as respostas cardiovasculares basais e ingestão de água e sódio em animais depletados de sódio com furosemida e 24 horas de dieta pobre em sódio.

A figura 6 apresenta a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos tratados com veículo (salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio) ou furosemida s.c., que receberam injeção intravenosa de salina ou composto de Manning (AVPX, 10 µg/kg de peso corporal). As medidas foram realizadas antes e após a repleção com água e sódio 0,3 M. A injeção i.v. de Composto de Manning não alterou a PAM em ratos normovolêmicos (veículo + AVPX: 105 ± 3 mmHg, vs. veículo + salina: 104 ± 4 mmHg) e depletados de sódio (furo + AVPX: 103 ± 1 mmHg, vs. furo + salina: 106 ± 2 mmHg) e também não alterou a FC (veículo + AVPX: 401 ± 15 bpm, vs. veículo + salina: 393 ± 8 bpm, furo + AVPX: 406 ± 10 bpm, vs. furo + salina 416 ± 18 bpm). Em ratos repletos a PAM não foi alterada em animais normovolêmicos (veículo + AVPX: 107 ± 3 mmHg, vs. veículo + salina: 105 ± 3 mmHg) e depletados de sódio (furo + AVPX: 103 ± 2 mmHg, vs. furo + salina: 104 ± 1 mmHg) e também não alterou a FC (veículo + AVPX: 394 ± 16 bpm, vs. veículo + salina: 392 ± 15 bpm, furo + AVPX: 414 ± 13 bpm, vs. furo + salina 409 ± 13 bpm).

A figura 7 apresenta a ingestão cumulativa de água e sódio 0,3 M em ratos tratados com veículo (salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio) ou furosemida s.c. (20 mg/kg de peso corporal), que receberam injeção intravenosa de salina ou Composto de Manning (AVPX, 10 µg/kg de peso corporal). A ingestão cumulativa foi avaliada por 2 horas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos. Podemos verificar que os grupos que receberam furosemida tiveram um aumento na ingestão de sódio 0,3 M (furo + salina: 12 ± 1

ml/120 min e furo + AVPX: 13 ± 2 ml/120 min, vs. veículo + salina: 3 ± 1 ml/120 min e veículo + AVPX: 4 ± 1 ml/120 min) e água (furo + salina: 4 ± 1 ml/120 min e furo + AVPX: 3 ± 1 ml/120 min, vs. veículo + salina: $1 \pm 0,4$ ml/120 min e veículo + AVPX: $1 \pm 0,3$ ml/120 min). Não houve diferença estatística entre os grupos veículo + salina e veículo + AVPX, bem como entre os grupos furo + salina e furo + AVPX.

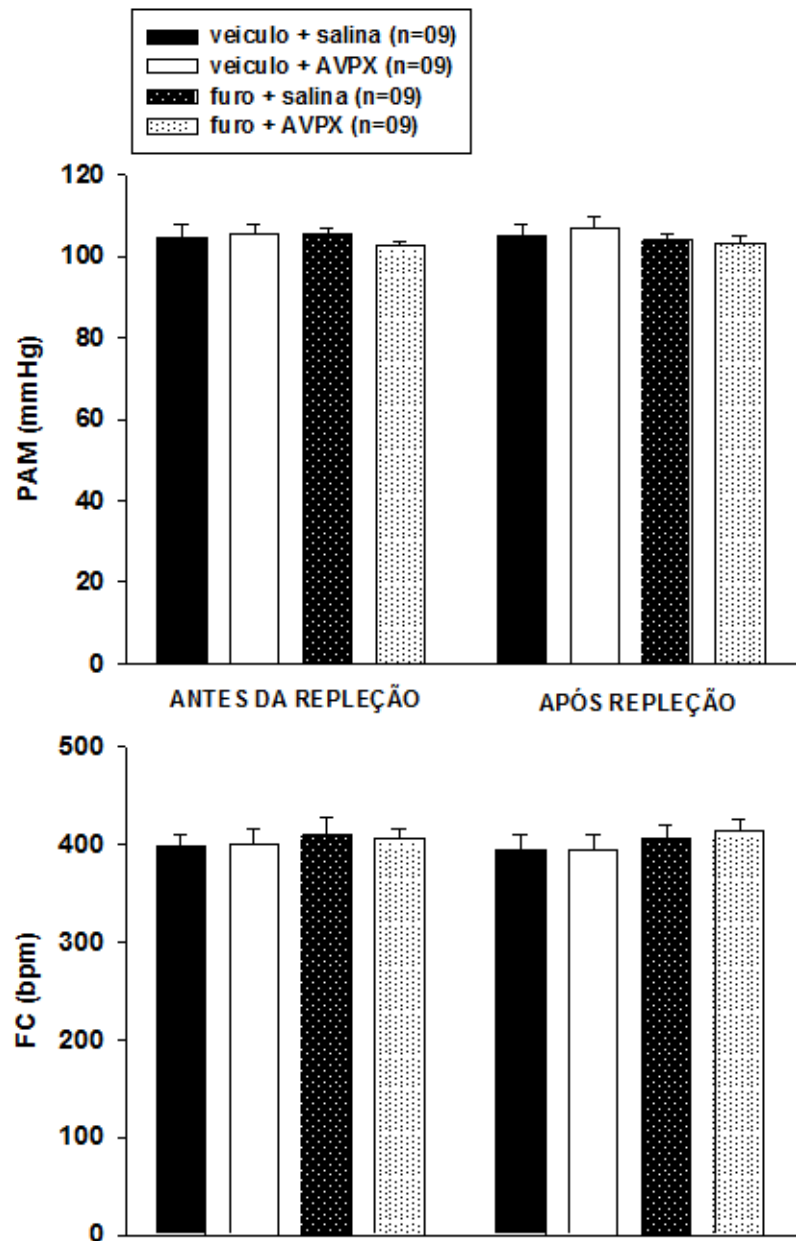


Figura 6: Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo, 20 mg/kg de peso corporal) combinado com injeção i.v. de salina ou composto de Manning (AVPX, 10 µg/mL/kg de peso corporal) antes e após a repleção de sódio (2 h de ingestão de água e sódio 0,3 M). Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais por grupo. Estatística: ANOVA de duas vias.

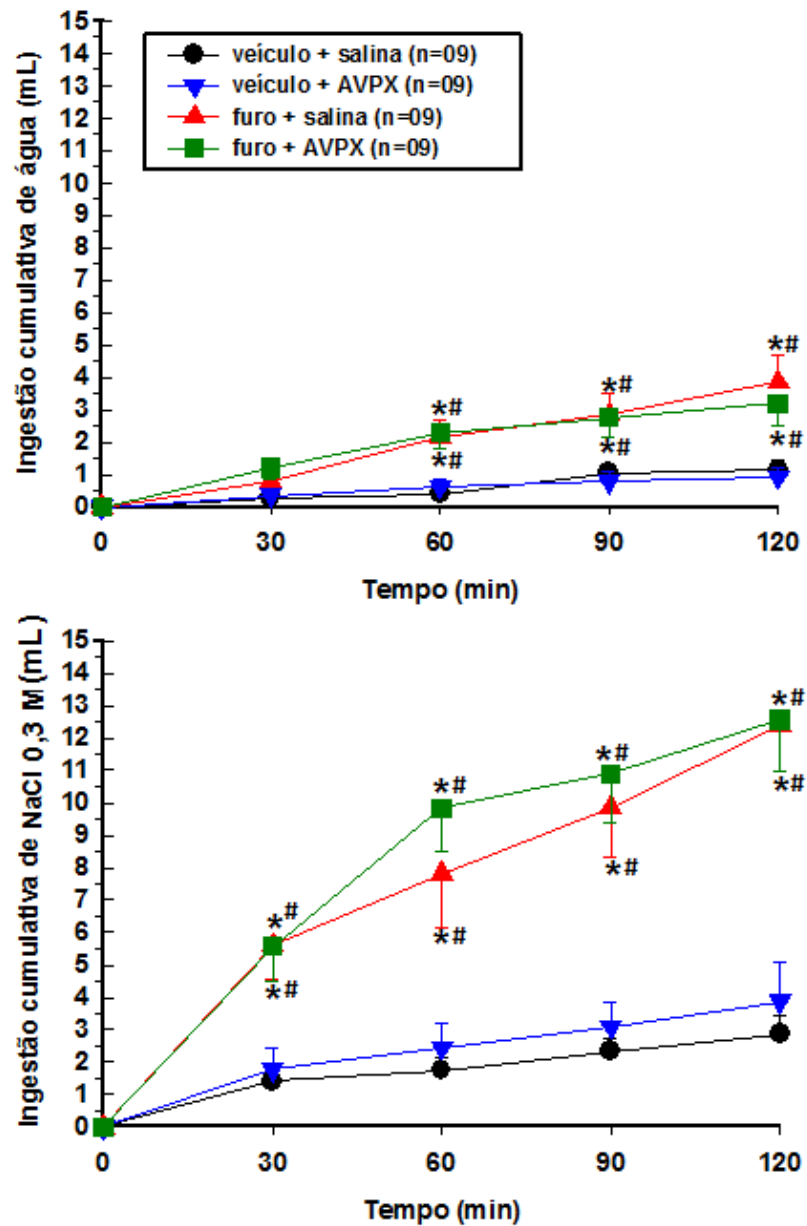


Figura 7: Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo, 20 mg/kg de peso corporal) combinado com injeção i.v. de salina ou composto de Manning (AVPX, 10 µg/mL/kg de peso corporal). Resultados expressos como média ± EPM. n= número de animais por grupo. Estatística. ANOVA de duas vias. * diferente de veículo + salina e # diferente de veículo + AVPX.

Para testar a efetividade do bloqueio dos receptores V1 de vasopressina pelo Composto de Manning, os mesmos animais receberam vasopressina (AVP, 12,5 ng/0,1 mL) antes e após o tratamento com Composto de Manning.

A figura 8 mostra a variação da pressão arterial média (Δ PAM) e variação da frequência cardíaca (Δ FC) em ratos que receberam injeção i.v. de AVP (12,5 ng/0,1 mL) ou salina antes e 10 minutos após injeção de salina ou composto de Manning (AVPX, 10 μ g/mL/kg de peso corporal). Os grupos foram tratados com veículo ou furosemida s.c. (furo, 20 mg/kg de peso corporal), e submetidos a 2 h de repleção com água e sódio 0,3 M. É possível observar que o pré-tratamento com composto de Manning bloqueou a resposta pressora produzida pela injeção i.v. de AVP em animais normovolêmicos (veículo + AVPX + AVP: $\Delta = 1 \pm 1$ mmHg, vs. veículo + salina + AVP: $\Delta = 22 \pm 3$ mmHg, $p < 0,05$) e a bradicardia (veículo + AVPX + AVP: $\Delta = -4,1 \pm 4,1$ bpm, vs. veículo + salina + AVP: $\Delta = -40 \pm 7$ bpm, $p < 0,05$) bem como em animais depletados (furo + AVPX + AVP: $\Delta = 1 \pm 1$ mmHg, vs. furo + salina + AVP: $\Delta = 25 \pm 4$ mmHg, $p < 0,05$) e a bradicardia (furo + AVPX + AVP: $\Delta = -1 \pm 4$ bpm, vs. furo + salina + AVP: $\Delta = -42 \pm 14$ bpm, $p < 0,05$). Antes da repleção, a resposta pressora e a bradicardia à injeção i.v. de AVP não foram diferentes entre os grupos furo + salina + AVP ($\Delta = 25 \pm 4$ mmHg e $\Delta = -42 \pm 14$ bpm, $p < 0,05$) e o grupo veículo + salina + AVP ($\Delta = 22 \pm 3$ mmHg e $\Delta = -40 \pm 7$ bpm). Após a repleção com água e sódio 0,3 M, o pré-tratamento com AVPX também bloqueou a resposta pressora produzida pela injeção i.v. de AVP em animais normovolêmicos (veículo + AVPX + AVP: $\Delta = -1 \pm 1$ mmHg, vs. veículo + salina + AVP: $\Delta = 23 \pm 2$ mmHg, $p < 0,05$) e a bradicardia (veículo + AVPX + AVP: $\Delta = -3 \pm 5$ bpm, vs. veículo + salina + AVP: $\Delta = -51 \pm 16$ bpm, $p < 0,05$) bem como em animais depletados (furo + AVPX + AVP: $\Delta = -1 \pm 1$ mmHg, vs. furo + salina: $\Delta = 20 \pm 3$ mmHg, $p < 0,05$) e a bradicardia (furo + AVPX + AVP: $\Delta = -7 \pm 6$ bpm, vs.

furo + salina + AVP: $\Delta = -45 \pm 10$ bpm, $p < 0,05$). Após a repleção, a resposta pressora e a bradicardia à injeção i.v. de AVP no grupo furo + salina + AVP ($\Delta = 20 \pm 3$ mmHg e $\Delta = -45 \pm 10$ bpm) não foi diferente do grupo veículo + salina + AVP ($\Delta = 23 \pm 2$ mmHg e $\Delta = -51 \pm 16$ bpm).

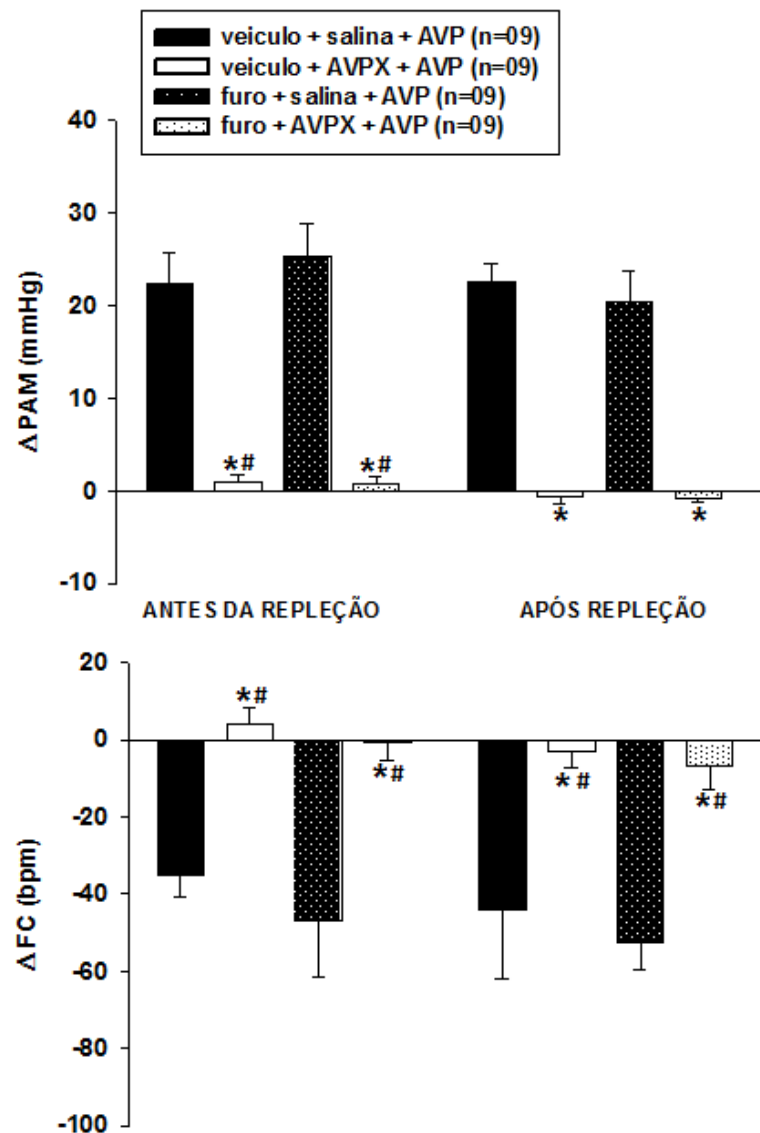


Figura 8: Variação da pressão arterial média (ΔPAM) e variação da frequência cardíaca (ΔFC) em ratos que receberam injeção i.v. de AVP (12,5 ng/0,1 mL) ou salina antes e 10 minutos após injeção de salina ou composto de Manning (AVPX, 10 μ g/mL/kg de peso corporal). Os grupos foram tratados com veículo ou furosemda s.c. (furo, 20 mg/kg de peso corporal), e submetidos a 2 h de repleção com água e sódio 0,3 M. Resultados expressos como média $\pm$ EPM. n = número de animais por grupo. Estatística: ANOVA de duas vias com pós teste de Student-Newman-Keuls. * diferente de veículo + salina e # diferente de furo + salina.

5. DISCUSSÃO

Nossos resultados demonstraram que mesmo após a depleção de sódio não houve alterações cardiovasculares basais nos ratos, como já havia sido descrito em experimentos anteriores de nosso laboratório (De Luca e cols., 1996; Fávero, 2012).

Segundo nossos resultados, o antagonismo dos receptores de ANG II com losartan injetado perifericamente atenuou a PAM basal em animais normovolêmicos, bem como em animais depletados de sódio com furosemida. No entanto, a queda na PAM observada nos animais depletados foi maior quando comparada com os animais normovolêmicos. Esses dados estão de acordo com Colombari e cols. (1992), que demonstrou que a resposta a ANG II está atenuada em animais depletados de sódio. Após a repleção de sódio, a injeção periférica de losartan i.v. também atenuou a PAM basal nos animais normovolêmicos e depletados, porém, a diferença entre os dois grupos foi abolida. Não houve alterações significativas da FC basal em qualquer dos grupos estudados em relação a ação da ANG II.

A injeção de losartan foi efetiva, pois bloqueou as ações da ANG II injetada i.v. Os grupos que não receberam losartan (veículo + salina e furo + salina) tiveram a resposta clássica à ANG II i.v. (hipertensão e bradicardia), porém, o grupo depletado de sódio teve a resposta à ANG II atenuada em relação ao grupo normovolêmico. Esse resultado também está de acordo com Colombari e cols. (1992), porém, ainda não havia sido estudado o efeito da repleção de sódio nesses animais. Após a repleção de sódio, a resposta a ANG II não foi diferente comparando os grupos normovolêmico e depletado de sódio, o que sugere que a repleção reestabelece a ação da ANG II nos animais previamente depletados de sódio. Os resultados sugerem que a ANG II tem um papel relevante na manutenção da PAM em ratos depletados de sódio.

O antagonismo dos receptores V1 de vasopressina com Composto de Manning injetado perifericamente i.v. não alterou PAM ou FC basais dos grupos normovolêmico ou depletado de sódio. Esse dado está de acordo com Colombari e cols. (1992), que demonstrou que a resposta da AVP i.v. não é alterada em animais depletados de sódio. As respostas cardiovasculares se mantiveram inalteradas após a repleção de sódio.

Os grupos que receberam o Composto de Manning tiveram o bloqueio das ações da AVP injetada i.v. Os grupos que não receberam Composto de Manning (veículo + salina e furo + salina) tiveram a resposta clássica à AVP i.v. (hipertensão e bradicardia), sem diferenças entre os grupos normovolêmico e depletado de sódio. Esse dado está de acordo com Colombari e cols. (1992). Após a repleção de sódio, a resposta a AVP i.v. permaneceu inalterada nos grupos normovolêmico e depletado de sódio. Os resultados sugerem que mecanismos vasopressinérgicos não atuam na manutenção dos parâmetros cardiovasculares de ratos depletados.

No protocolo de repleção de água e sódio 0,3 M e no protocolo de ingestão de água 24h, foi possível observar que todos os grupos tratados com furosemida (depletados) tiveram um aumento significativo da ingestão de água e sódio em relação ao grupo veículo (normovolêmico). O aumento do apetite de água e sódio em ratos depletados já é bem retratado na literatura científica (Falk, 1965; McKinley, 2013). O bloqueio dos receptores AT1 de ANG II com losartan e dos receptores V1 de vasopressina com o composto de Manning não alteraram a ingestão de água e sódio 0,3 M induzida pela depleção de sódio.

Dessa forma, podemos concluir que mecanismos angiotensinérgicos são importantes para a manutenção da PAM em ratos depletados de sódio. Ainda, nossos resultados indicam que a repleção de sódio reestabelece a resposta a ANG II de animais previamente depletados de sódio. Porém, os resultados sugerem que os receptores V1 de vasopressina não participam dos mecanismos de manutenção de PAM em ratos.

6. CONCLUSÃO

Os presentes resultados mostram que mecanismos angiotensinérgicos são importantes para a manutenção da PAM em ratos depletados de sódio. Ainda, indicam que a repleção de sódio reestabelece a resposta a ANG II de animais previamente depletados de sódio. Porém, os resultados sugerem que os receptores V1 de vasopressina não participam dos mecanismos de manutenção de PAM nesses animais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARMSWORTH, S. J.; GERKENS, J. F.; SMITH, A. J. Furosemide inhibition of sympathetic vasoconstriction in the rat in situ blood perfused mesentery. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 13, p. 495-503, 1986.
2. BLANCH, T. B.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V.; COLOMBARI, E.; COLOMBARI, D. S. A. Vasopressin-dependent pressor responses induced by hypertonic saline load in rats with commissural NTS lesions. *The FASEB Journal*, v. 21, p. 598.13, 2007.
3. BOONE, M.; DEEN, P. M. T. Physiology and pathophysiology of the vasopressin-regulated renal water reabsorption. *Pflügers Archiv*, v. 456, n. 6, p. 1005-1024, 2008.
4. BROSNIHAN, K. B.; SZILAGYI, J. E.; FERRARIO C. M. Effect of chronic sodium depletion on cerebrospinal fluid and plasma catecholamines. *Hypertension*, v. 3, p. 233-239, 1981.
5. COLOMBARI, D. S. A.; COLOMBARI, E.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A. A.; RENZI, A.; DE LUCA, L.A. JR.; MENANI, J. V. Effect of furosemide treatment on the central and peripheral pressor responses to cholinergic and adrenergic agonists, angiotensin II, hypertonic solution and vasopressin. *Neuroscience letters*, v. 143, p. 255-258, 1992.
6. DE LUCA, L. A. JR.; BARBOSA, S. P.; SUGAWARA, A. M.; MENANI, J. V. Effects of intracerebroventricular injections of losartan or PD 123319 on arterial pressure and heart rate of sodium replete and sodium deplete rats. *Regulatory Peptides*, v. 66, p. 31-35, 1996.

7. DE LUCA, L. A. JR.; SUGAWARA, A. M.; MENANI, J. V. Brain versus peripheral angiotensin II receptors in hypovolaemia: behavioural and cardiovascular implications. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, v. 27, p. 437-442, 2000.
8. DE OLIVEIRA, L. B.; CALLERA, J. C.; DE LUCA, L. A. JR.; COLOMBARI, D. S.; MENANI, J. V. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. *Brain Research Bulletin*, v. 73, p. 238-247, 2007.
9. DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA, L. A. JR.; MENANI, J. V. Moxonidine and central alpha2 adrenergic receptors in sodium intake. *Brain Research*, v. 993, p. 177-182, 2003.
10. ECHTENKAMP, S. F.; ANDERSON, A. C. Baroreflex modulation by cardiopulmonary receptors during chronic sodium depletion. *American Journal of Physiology*, v. 254, p. H905-H911, 1998.
11. FALK, J. L. Water intake and NaCl appetite in sodium depletion. *Psychological Reports*, v. 16, p. 315-325, 1965.
12. FÁVERO, M. T. 2012. Respostas cardiorrespiratórias promovidas pela ativação de receptores glutamatérgicos e purinérgicos no núcleo do trato solitário [dissertação]. Araraquara (SP): Universidade Federal de São Carlos e Universidade Estadual Júlio de Mesquita Filho; 2012.
13. GERKENS, J. F.; ARMSWORTH, S. J.; SMITH, A. J. Inhibition of sympathetic constriction of the ex vivo tail artery perfused with blood from rats given furosemide. *Clinical and Experimental Hypertension*, v. 9, p. 51-79, 1987.
14. HABER, E. The role of renin in normal and pathological cardiovascular homeostasis. *Circulation*, v. 54, p. 849-961, 1976.

15. HARRINGTON, A. R. Hyponatremia due to sodium depletion in the absence of vasopressin. *American Journal of Physiology*, v. 222, p. 768-774, 1981.
16. JOVER, B.; DUPONT, M.; MIMRAN, A.; WOODS, R.; MCGRATH, B. Vasoconstrictor role for vasopressin in conscious, sodium-depleted rats. *American Journal of Physiology*, v. 253, p. H763-H769, 1987.
17. MCKINLEY, M. J. Adaptive appetites for salted and unsalted food in rats: differential effects of sodium depletion, DOCA, and dehydration. *American Journal of Physiology: regulatory, integrative and comparative physiology*, v. 304, n. 12, p. R1149-R1160, 2013.
18. MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A. JR.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *American Journal of Physiology*, v. 274, p. R555-R560, 1998.
19. MENEZES, M. F.; BARBOSA, S. P.; DE ANDRADE, C. A.; MENANI, J. V.; DE PAULA, P. M. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. *Brain Research*, v. 1372, p. 49-58, 2011.
20. MURRAY, B. M.; PALLER, M. S. Pressor resistance to vasopressin in sodium depletion, potassium depletion, and cirrhosis. *American Journal of Physiology*, v. 251, p. R525-R530, 1986.
21. NOZAKI, P. N.; PEREIRA, D. T.; MOURA, F. V.; MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A. JR. Ingestion of hypertonic NaCl vs. palatable drinks by sodium-depleted rats. *Physiology & Behavior*, v. 75, p. 443-448, 2002.
22. REID, I. A. Interactions between ANG II, sympathetic nervous system, and baroreceptor reflexes in regulation of blood pressure. *American Journal of Physiology*, v. 262, p. E763-E778, 1992.

23. ROCHINI, A. P.; CANT, J. R.; BARGER, A. C. Carotid sinus reflex in dogs with low-to-high-sodium intake. *American Journal of Physiology*, v. 233, p. H196-H202, 1977.
24. SALGADO, H. C.; SALGADO, M. C.; KRIGE, E. M. Cardiovascular reflexes in conscious sodium-depleted rats. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 19, p. 319-325, 1986.
25. SATO, M. A.; YADA, M. M.; RENZI, A.; CAMARGO, L. A.; SAAD, W. A.; MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A. JR. Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 29, p. 1663-1666, 1996.
26. SPEILMAN, W. S.; DAVIS, J. O. The renin-angiotensin system and aldosterone secretion during sodium depletion in the rat. *Circulation Research*, v. 35, p. 615-624, 1974.
27. SZILAGYI, J. E.; MASAKI, Z.; BROSNIHAN, K. B.; FERRARIO, C. M. Neurogenic suppression of carotid sinus reflexes by vagal afferents in sodium depleted dogs. *American Journal of Physiology*, v. 241, p. H255-H262, 1981.
28. VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, v.17, p. 471–503, 2003.
29. ZARDETTO-SMITH, A. M.; THUNHORST, R. L.; CICHA, M. Z.; JOHNSON, A. K. Afferent signaling and forebrain mechanisms in the behavioral control of extracellular fluid volume. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 689, p. 161-76, 1993.

30. ZIMMERMAN, B. G.; SYBERTZ, E. J.; WRONG, P. C. Interaction between sympathetic and renin-angiotensin system. *Journal of Hypertension*, v. 2, p. 581-587, 1984.
31. ZIMMERMAN, B. G. Blockade of adrenergic potentiating effect of angiotensin by 1-Sar-8-Ala-angiotensin II. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 85, p. 486-492, 1973.

“De acordo”.

Nathalia Vieira dos Santos

Profa. Dra. Patrícia Maria de Paula