



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Faculdade de Odontologia de Araçatuba
Departamento de Ciências Básicas

Gabriela Patrício Bearare

**EFEITO DA INJEÇÃO DE ANGIOTENSINA II NO
NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL (NPBL) NA
INGESTÃO DE ÁGUA E NaCl HIPERTÔNICO**

Araçatuba-SP

2011

Gabriela Patrício Bearare

Efeito da injeção de angiotensina II no Núcleo
Parabraquial Lateral (NPBL) na ingestão de água e
NaCl hipertônico

Trabalho de Conclusão de Curso como parte dos
requisitos para a obtenção do título de Bacharel em
Odontologia da Faculdade de Odontologia de
Araçatuba, Universidade Estadual Paulista “Júlio de
Mesquita Filho” (UNESP).

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Callera

Araçatuba-SP

2011

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Sergio e Jaçanã, ao incentivo, apoio e compreensão pelas minhas ausências para realização dessa pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, por guiar meus caminhos;

Ao meu orientador, Prof. Dr. João Carlos Callera, pela oportunidade do conhecimento e aprimoramento do meu perfil de pesquisadora;

Aos meus amigos de laboratório, Gean Domingos da Silva Souza, Talita de Melo e Silva, Rita de Cássia Alves Nunes, e aos demais companheiros do Departamento, pelos auxílios e ensinamentos durante o meu período de estudos;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa (Processo 2010/17822-5).

BEARARE, G.P. **Efeito da injeção de Angiotensina II no núcleo parabraquial lateral (NPBL) na ingestão de água e NaCl hipertônico.** Faculdade de Odontologia, Departamento de Ciências Básicas, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brasil. 2011.

RESUMO

Estudos recentes mostraram que o Losartan, antagonista do receptor AT_1 da Angiotensina II (ANG II), injetado no núcleo parabraquial lateral (NPBL) reduz a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pela ativação de receptores $GABA_A$ com muscimol injetado no mesmo local. A ANG II é um importante peptídeo envolvido no controle de ingestão de água e sódio. No presente estudo, foi investigado os efeitos da ANG II injetada no NPBL na ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio, utilizando a injeção do diurético furosemida (FURO, 10 mg/kg), associado com o inibidor da enzima de conversão de angiotensina, captopril (CAP, 5 mg/kg) (modelo FURO + CAP). Para isso, foram utilizados ratos Wistar (280-320 gramas), implantados com cânulas de aço inoxidável no NPBL, que tiveram acesso simultâneo à água e NaCl 0,3 M (n=7). Injeções no NPBL bilateral de ANG II (50 ng/0.2 μ L) não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M e de água induzida pelo tratamento FURO+CAP (4.1 ± 1.3 e 8.7 ± 1.7 vs. salina: 5.2 ± 1.2 e 6.6 ± 1.0 mL/150 min, respectivamente). O pré tratamento com losartan (50 μ g/0.2 μ L) no NPBL não promoveu alterações significativas dos efeitos produzidos pela ANG II na ingestão de NaCl 0,3 M e de água (9.4 ± 4.0 e 8.0 ± 2.4 mL/150 min, respectivamente). Injeção sozinha de losartan no NPBL não modificou a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP. Os resultados sugerem que a sede e o apetite ao sódio não são afetados por mecanismos angiotensinérgicos do NPBL em ratos com depleção aguda de água e sódio.

Palavras-chave: ANG II, NPBL, ingestão, água, NaCl 0,3 M.

BEARARE, G.P. **Effects of Angiotensin II injected into the lateral parabrachial nucleus on water and 0,3 M NaCl intake in sodium depleted rats.** School of Dentistry, Department of Basic Sciences, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araçatuba, São Paulo, Brazil, 2011.

ABSTRACT

Recent studies showed that losartan, the AT₁ angiotensin II antagonist injected into the lateral parabrachial nucleus (LPBN) reduces water and 0.3 M NaCl intake induced by activation of GABA_A receptors with muscimol injected in the same site. Angiotensin II (ANG II) is an important peptide involved on sodium intake control. In the present study, we investigated the effects of ANG II injected into the LPBN on water and sodium intake in sodium-depleted rats. Male Wistar rats (280-320 g) with stainless steel cannulas implanted bilaterally into LPBN had access simultaneously to water and 0.3 M NaCl intake. Water and 0.3 M NaCl intakes were tested in rats treated with subcutaneous injections of the diuretic furosemide (FURO – 10 mg/kg) combined with the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril (CAP – 5 mg/kg). Bilateral injections of ANG II (50 ng/0.2 µL, n=7) into the LPBN did not affect 0.3 M NaCl and water intake induced by FURO+CAP treatment (4.1 ± 1.3 and 8.7 ± 1.7 vs. saline: 5.2 ± 1.2 and 6.6 ± 1.0 mL/150 min, respectively). The pre-treatment with losartan (50 µg/0.2 µL) into the LPBN produced no effects on 0.3 M NaCl and water intake induced by ANG II (9.4 ± 4.0 and 8.0 ± 2.4 mL/150 min, respectively). Losartan by itself injected into LPBN did not affect water and sodium intake in FURO-CAP treated rats. The results suggest that thirst and sodium appetite is not affected by angiotensinergic mechanisms in the LPBN of sodium-depleted rats.

Keywords: Ang II, LPBN, intake, water, 0,3 M NaCl.

LISTA DE FIGURAS

Número	Figura	Página
01	Gaiolas individuais no biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.....	12
02	Anestésico (Ketamina) e relaxante muscular (Xilazina).....	13
03	Tricotomia.....	13
04	Estereotáxico (modelo David-Kopf) para cirurgia em pequenos animais.....	14
05	Colocação do rato no aparelho estereotáxico com o auxílio das barras auriculares.....	14
06	Incisão longitudinal com bisturi.....	15
07	Exposição dos pontos lambda e bregma.....	15
08	Cânulas de aço inoxidável acopladas ao aparelho estereotáxico.....	16
09	Colocação dos parafusos.....	16
10	Fixação dos parafusos.....	17
11	Utilização da broca para perfuração da calota craniana.....	17
12	Utilização da resina acrílica para dar suporte à cânula-guia....	18
13	Gaiolas individuais para recuperação (pós operatório).....	18
14	Seringa Hamilton de 10 µL.....	19
15	Injeção da droga no NPBL utilizando a seringa de Hamilton...	19
16	Introdução da injetora na cânula-guia previamente implantada no NPBL.....	20
17	Abertura da região torácica e exposição do coração para perfusão com salina tamponada e formol.....	21
18	Procedimento para remoção do encéfalo.....	21
19	Encéfalo de rato.....	22
20	Criostato – Leica.....	22

21	Colocação das fatias do encéfalo nas lâminas.....	23
22	Lâminas montadas para análise microscópica.....	23
23	Fotomicrografia de um corte histológico cerebral representativo de um rato, mostrando a área de injeção bilateral do corante Azul de Evans 2% no NPBL.....	24
24	Efeito da injeção de losartan (50 µg/0,2 µL) combinado com salina ou com ANG II (50 ng/0.2 µL), ANG II combinada com salina e apenas salina injetados no NPBL bilateral na ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio com furosemida + captopril.....	27

SUMÁRIO

1. Introdução.....	09
2. Objetivos.....	11
3. Materiais e Métodos.....	11
4. Resultados.....	26
5. Discussão.....	28
Referências.....	31
Anexo.....	38

1- INTRODUÇÃO

O núcleo parabraquial lateral (NPBL) é uma estrutura localizada dorsalmente na ponte (parte integrante do tronco encefálico) e tem uma participação importante no controle inibitório da ingestão de água e cloreto de sódio (NaCl) durante a desidratação (Ohman e Johnson, 1986 e 1995; De Gobbi et al., 2000; Menani et al., 2002 e Callera et al., 2005). O NPBL recebe projeções aferentes da área postrema (AP) e do núcleo medial do trato solitário (NmTS) (Herbert et al., 1990 e Norgren, 1995) e envia projeções eferentes em direção a região anterior do encéfalo, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (NPV), o núcleo central da amígdala (AMYG), e núcleo pré-óptico mediano (NPOm) (Ciriello et al., 1984; Fulwiler e Saper, 1984; Jhamandas et al., 1992 e 1996 e Krukoff et al., 1993). Importantes mecanismos inibitórios envolvidos no controle da ingestão de água e sódio foram demonstrados no NPBL (Callera et al., 2005; Colombari et al., 1996; De Luca et al., 2003; Menani et al., 1996, 2000, 2002; Menani e Johnson, 1995, 1998 e De Oliveira et al., 2007).

A perda de água que ocorre nos compartimentos intra e/ou extracelulares, seletiva ou conjuntamente, estimula os diferentes tipos de sede e o apetite ao sódio. Uma substância muito potente na estimulação da sede é o neuropeptídeo angiotensina II (ANG II), onde sua produção está elevada em situações de hipovolemia e hipotensão (Fitzsimons, 1998). A ANG II atua tanto por suas ações periféricas (controle da secreção de aldosterona), como pela ação em algumas áreas do encéfalo como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) e o órgão subfornical (OSF) (Brody e Johnson, 1989 e Mangiapane e Simpson, 1980).

A ANG II é descrita como um peptídeo que faz parte do sistema renina-angiotensina-aldosterona. Sua formação se dá a partir da ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) sobre a angiotensina I. Tem numerosas funções conhecidas na fisiologia, em especial na homeostase de água e eletrólitos, estimula a secreção de hormônio adrenocorticotrófico (ACTH),

liberação de vasopressina, catecolaminas e no controle da pressão arterial. Exerce suas funções celulares interagindo com receptores (AT_1 e AT_2) na membrana celular das células alvo (Beresford e Fitzsimons, 1992 e Rang, 2004).

A ANG II age no cérebro estimulando o apetite ao sal; sua administração em regiões anteriores do encéfalo, aumenta a ingestão de soluções de cloreto de sódio concentrados (Menani et al., 1998). Estudos feitos com diversos tipos de animais utilizando a injeção intracerebroventricular de ANG II mostraram que houve estímulo à ingestão de água e sódio na maioria de espécies testadas (Fitzsimons, 1998). Ainda, de acordo com estes autores, a ANG II pode contribuir para a regulação do apetite ao sódio, como na sede em condições fisiológicas normais. A ingestão de água e o apetite ao sódio induzido pelo ANG II são reduzidos pelo bloqueio prévio dos receptores AT_1 da angiotensina.

Evidências mostrando que a lesão química ou eletrolítica do NPBL potencia o efeito dipsogênico da ANG II (Ohman e Johnson, 1995), e que o bloqueio de receptores serotoninérgicos ou colecistocinérgicos do NPBL potencia a ingestão de água e sódio (Menani et al., 1995 e 1996) serviram de base para a proposição de um substrato neural que controla a inibição do apetite ao sódio. Portanto, estes estudos apontam para a importância do papel inibitório do NPBL na ingestão de água e sódio hipertônico, em situações onde existe a presença de um estímulo facilitador para a ingestão de água e sódio, tal como, depleção de sódio, furosemida associada ao captopril ou administração central de ANG II (Menani et al., 1996 e De Gobbi et al., 2000).

Existem modelos experimentais que auxiliam nos estudos que envolvem o balanço hídrico e eletrolítico; um desses modelos exige a combinação de dois fármacos, a Furosemida e o Captopril (FURO + CAP). O fármaco furosemida é um medicamento da classe dos diuréticos que aumenta de forma intensa a secreção de urina e sódio pelo organismo. O captopril é um fármaco inibidor da enzima conversora da ANG II (ECA). Esse modelo experimental, quando utilizado, provoca hipotensão e depleção de íons, como o sódio, e conseqüentemente induz a ingestão de água e sódio (De Gobbi et al., 2000 e 2001 e Callera et al., 2005).

Estudos anteriores avaliaram o envolvimento dos mecanismos gabaérgicos no NPBL na ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos (Callera et al., 2002 e 2005; De Luca-Jr et al., 2003; Kimura et al., 2004 e 2008 e De Oliveira et al., 2004, 2005 e 2007). Estes estudos demonstraram que a ativação no NPBL de receptores gabaérgicos (GABA_A e GABA_B) com muscimol e baclofen, respectivamente, induziu uma forte ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados, hiperosmóticos e depletados de sódio. O bloqueio dos receptores AT₁ da ANG II, com injeções de losartan no NPBL reduziu o aumento da ingestão de sódio hipertônico induzido pelo muscimol (Da Silva et al., 2011).

Portanto, existem diversos estudos na literatura mostrando que a ANG II injetada no Sistema Nervoso Central (SNC) aumenta a ingestão de água e sódio (Fitzsimons, 1998). Como não existem evidências mostrando o efeito da aplicação bilateral no NPBL de ANG II na regulação da ingestão de água e no apetite ao sódio, este trabalho estudou os mecanismos angiotensinérgicos do NPBL na ingestão de água e sódio em ratos depletados de sódio utilizando o modelo de desidratação extracelular FURO+CAP.

2- OBJETIVOS

- 1) Investigar os possíveis efeitos da administração da ANG II no NPBL na ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio (modelo FURO + CAP);
- 2) Investigar os efeitos da administração prévia de losartan (antagonista AT₁) na ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pela injeção de ANG II no NPBL em ratos depletados de sódio (modelo FURO + CAP).

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. ANIMAIS

Neste trabalho foi utilizado aproximadamente um total de 100 ratos Wistar com peso padronizado entre 290 e 320 gramas. Esses animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Campus da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araçatuba, SP. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais no Biotério do Departamento de Ciências Básicas em condições adequadas de umidade, temperatura e alimentados com ração granulada e água de torneira (Figura 1). Pesquisa aprovada em 16/12/2010, pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal (Protocolo FOA 7755/10).



Figura 1: Gaiolas individuais no Biotério do Departamento de Ciências Básicas da Faculdade de Odontologia de Araçatuba.

3.2. IMPLANTES DE CÂNULAS DE AÇO INOXIDÁVEL NO NPBL

Os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg i.p.) associado com xilazina (7 mg/kg i.p.) (figura 2). Em seguida, realizou-se a tricotomia na cabeça do rato para facilitar a cirurgia e evitar possíveis infecções (figura 3).



Figura 2: Anestésico (Ketamina) e relaxante Muscular (Xilazina).



Figura 3: Tricotomia.

Os ratos foram adaptados a um aparelho estereotáxico (David Kopf, figura 4) e com o auxílio de duas barras auriculares, a cabeça do animal foi colocada em posição fixa (figura 5). Após a assepsia da pele da cabeça com solução de álcool iodado, foi feita uma incisão longitudinal (figura 6) com uma lâmina de bisturi para exposição da calota craniana, expondo os pontos lambda

e bregma (figura 7) que foram utilizados como referência para nivelar a cabeça no mesmo nível horizontal, utilizados como parâmetro para que o NPBL fosse localizado.



Figura 4: Estereotáxico (modelo David-Kopf) para cirurgia em pequenos animais.



Figura 5: Colocação do rato no aparelho estereotáxico com o auxílio das barras auriculares.



Figura 6: Incisão longitudinal com bisturi.



Figura 7: Exposição dos pontos lambda e bregma.

Utilizando-se o ponto bregma e a linha mediana, foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável, obedecendo as coordenadas obtidas no Atlas Histológico de Paxinos e Watson (1986): 9,5 mm caudal ao bregma; 2,2 mm lateral a linha média e 3,9 mm abaixo da duramater. Essas cânulas de aço inoxidável (12 mm), confeccionadas a partir de agulhas hipodérmicas (25x0,6 mm), foram posicionadas bilateralmente 2 mm acima do

NPBL, para que essa estrutura não fosse lesionada no momento da injeção (figura 8). As cânulas foram fixadas ao crânio do rato com resina acrílica de uso odontológico, ancorada por pequenos parafusos de aço inoxidável, previamente introduzido no osso (figura 9 e 10).



Figura 8: Cânulas de aço inoxidável acopladas ao aparelho estereotáxico.



Figura 9: Colocação dos parafusos.



Figura 10: Fixação dos parafusos.

Nestes pontos foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca odontológica esférica acoplada a um motor de baixa rotação, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro (figura 11). Após a exposição do seio venoso a cânula é abaixada no valor desejado e a resina é colocada confeccionando um “capacete” (figura 12).



Figura 11: Utilização da broca para perfuração da calota craniana.



Figura 12: Utilização da resina acrílica para dar suporte à cânula-guia.

Após a completa secagem e fixação da cânula, a torre do estereotáxico foi removida e, para impedir a obstrução da cânula guia até a realização dos experimentos, foi introduzido na mesma um mandril (12 mm) também de aço inoxidável. O rato foi retirado do aparelho estereotáxico e como medida profilática, após a cirurgia, para evitar o surgimento de infecção no período de restabelecimento do animal, foi injetado 0.2 mL de um antibiótico veterinário (associação de penicilina com estreptomicina 1.200.000 UI) por via intramuscular. Terminada a cirurgia cerebral, os ratos foram devolvidos em suas gaiolas individuais (figura 13) com ração, água de torneira e NaCl 0,3 M, por um período de, pelo menos 5 dias, antes do início dos experimentos.



Figura 13: Rato em recuperação (pós-operatório).

3.3. INJEÇÃO DE DROGA NO NPBL

As drogas foram dissolvidas em salina fisiológica e injetadas no NPBL dos ratos, de acordo com o protocolo experimental utilizado, usando-se uma seringa Hamilton de 10 μ L (figura 14), conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora (30 gauge de diâmetro) que foi introduzida através da cânula guia previamente fixada (figuras 15 e 16). A cânula injetora foi 2 mm mais longa do que a cânula guia. O volume da injeção foi de 0,2 μ L (200 nL).



Figura 14: Seringa Hamilton de 10 μ L.



Figura 15: Injeção da droga no NPBL utilizando a seringa de Hamilton.



Figura 16: Introdução da injetora na cânula guia previamente implantada no NPBL.

3.4. DEPLEÇÃO AGUDA DE ÁGUA E SÓDIO (MODELO FURO+CAP)

Depleção aguda de água e sódio foi induzida por injeções subcutâneas de furosemda (FURO, 10 mg/kg de peso corporal) associado com captopril (CAP, 5mg/kg de peso corporal), como descrito previamente em estudos anteriores (Menani et al., 1996; De Gobbi et al., 2001; Callera et al., 2005). Os ratos foram removidos de suas gaiolas para a injeção de FURO + CAP e retornaram na ausência de água, NaCl 0,3 M e ração. Uma hora mais tarde, as buretas contendo água e NaCl 0,3 M foram colocadas nas gaiolas e a ingestão foi medida de forma cumulativa em intervalos de 30 minutos durante 120 minutos de experimento. Os experimentos tiveram o intervalo de 48 horas.

3.5. SOLUÇÕES E DROGAS

- Solução fisiológica (NaCl 0.9%); solução hipertônica (NaCl 1,8%- 0,3M)
- Angiotensina II (Sigma – Aldrich) 50 ng/0,2 μ L
- Losartan, antagonista AT₁ (Sigma – Aldrich) 50 μ g/0,2 μ L

3.6. HISTOLOGIA CEREBRAL

Terminados os experimentos, os ratos receberam uma injeção no NPBL bilateral do corante Azul de Evans 2% (volume de 0.2 μ L) para determinar o

local específico das injeções. A seguir, os ratos foram anestesiados com pentobarbital sódico (80 mg/kg i.p.) e submetidos à abertura da região torácica expondo o coração para perfusão com salina tamponada seguida de solução de formalina 10% (figura 17). Para facilitar a perfusão cerebral, a artéria aorta descendente foi bloqueada com pinça hemostática e a cava superior seccionada.



Figura 17: Abertura da região torácica e exposição do coração para perfusão com salina tamponada e formol.

A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formol 10% por alguns dias (figuras 18 e 19).



Figura 18: Procedimento para remoção do encéfalo.



Figura 19: Encéfalo de rato.

Cortes transversais (60 μ m de espessura) foram feitos nos pontos de injeção das drogas com auxílio de um aparelho Criostato (figuras 20). Os cortes histológicos montados em lâmina foram analisados a fresco, para se localizar os pontos das injeções (figuras 21 e 22).



Figura 20: Criostato (Leica).



Figura 21: Colocação das fatias do encéfalo nas lâminas.



Figura 22: Lâminas montadas para análise microscópica.

Somente os ratos que apresentaram marcações bilaterais no NPBL foram considerados na análise estatística dos resultados (figura 23).

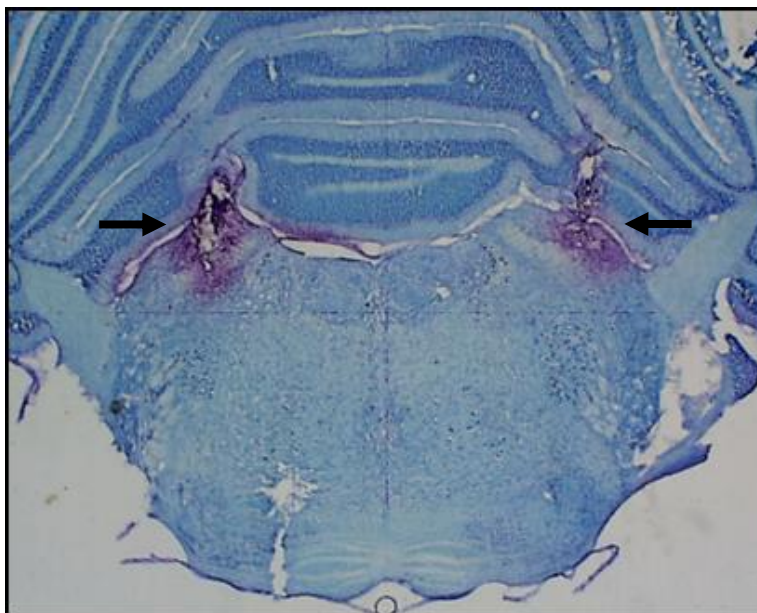


Figura 23: Fotomicrografia de um corte histológico cerebral representativo de um rato, mostrando a área de injeção bilateral do corante Azul de Evans 2% no NPBL.

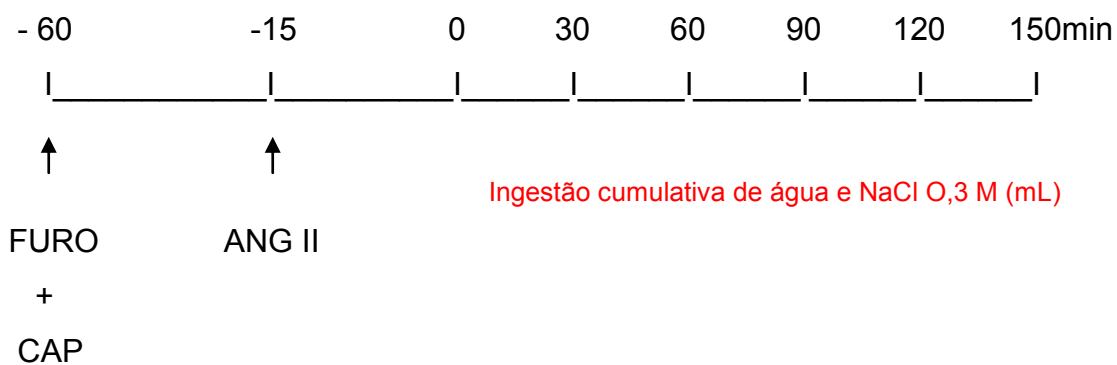
3.7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.). Os efeitos das injeções bilaterais no NPBL na ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M foram avaliados pelo análise de variância two-way (ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls. As diferenças estatísticas foram aceitas como significativas para $p < 0,05$.

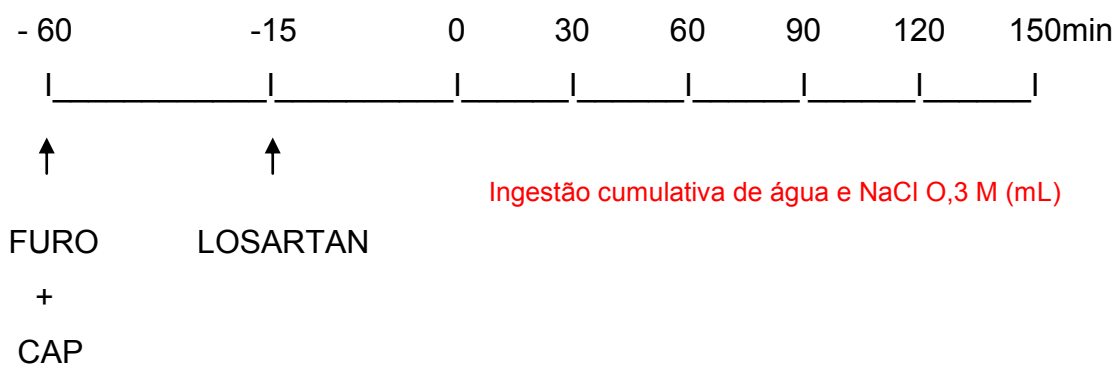
3.8. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.8.1. Efeitos da administração da ANG II no NPBL na ingestão de água e NaCl 0,3 M por ratos depletados de água e sódio:

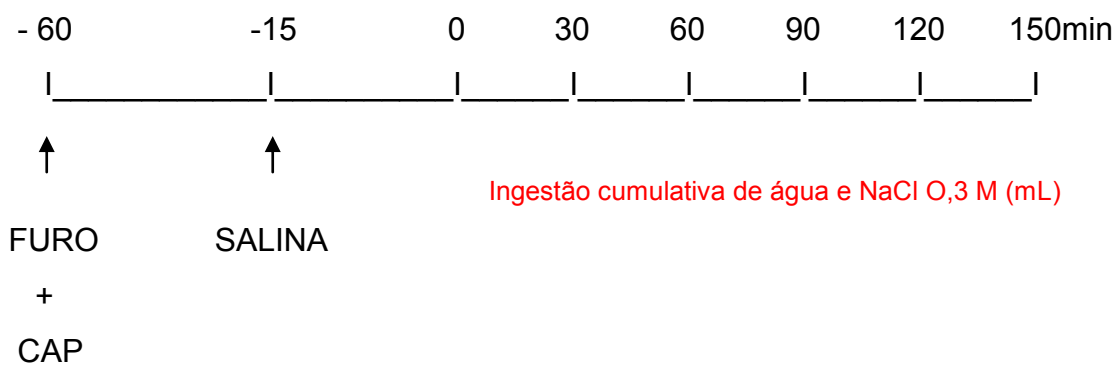
EXPERIMENTO 1:



EXPERIMENTO 2:



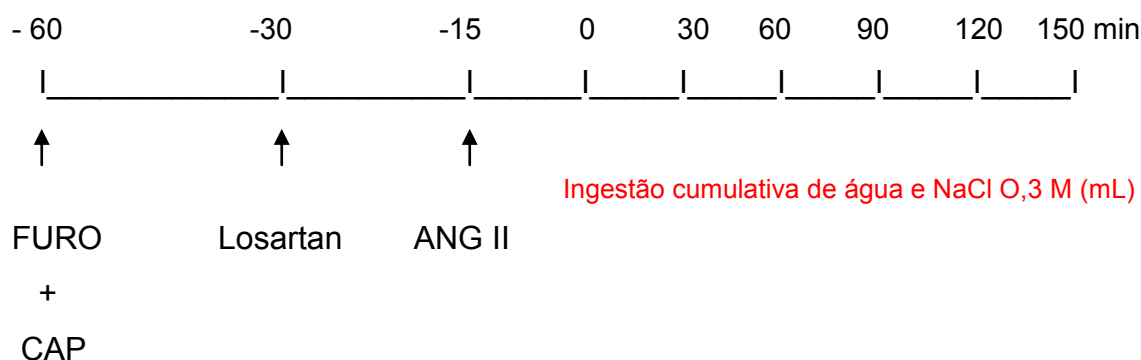
EXPERIMENTO 3 (grupo controle):



No dia do experimento, a depleção aguda de água e sódio foi induzida pelo tratamento FURO+CAP e os ratos retornaram às gaiolas na ausência de ração, água e NaCl 0,3 M. 45 minutos após, foi feita a administração da ANG II no NPBL e 15 minutos após foi feita a medida de ingestão de água e NaCl 0,3 M de forma cumulativa aos 30, 60, 90 e 120 e 150 minutos.

3.8.2. Efeitos da administração prévia do antagonista AT₁ na ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pela injeção de ANG II no NPBL em ratos depletados de água e sódio:

EXPERIMENTO 4:



No dia do experimento, a depleção de água e sódio foi induzida pelo tratamento FURO+CAP e os ratos retornaram às gaiolas na ausência de ração, água e NaCl 0,3 M. As injeções de losartan foram feitas previamente à injeção de ANG II no NPBL e 15 minutos após foi feita a medida de ingestão de água e NaCl 0,3 M de forma cumulativa aos 30, 60, 90 e 120 e 150 minutos.

Os experimentos eram realizados de forma aleatória.

4- RESULTADOS

4.1 – Efeito de injeções no NPBL do antagonista angiotensinérgico AT₁ na ingestão de água e NaCl 0,3 M induzido pela ANG II em ratos depletados de água e sódio.

A figura 24, sumariza os resultados do efeito de injeções bilaterais no NPBL do antagonista angiotensinérgico AT₁ losartan (50 µg/0.2 µL), na ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pela ANG II (50 ng/0.2 µL, n=7) no modelo de depleção aguda de água e sódio, promovido pela administração simultânea do diurético furosemida (10 mg/kg sc) e baixas doses do inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril (5 mg/kg sc).

Injeções no NPBL bilateral de ANG II, não promoveu alterações significativa na ingestão de NaCl 0,3 M e água (4.1 ± 1.3 e 8.7 ± 1.7 vs. salina: 5.2 ± 1.2 e 6.6 ± 1.0 mL/150 min, respectivamente). Apesar de constataremos uma tendência a reverter o efeito inibitório da ANG II na ingestão de NaCl 0,3 M, o pré-tratamento com losartan (50 µg/0.2 µL) no NPBL não promoveu alterações significativas dos efeitos produzidos pela ANG II na ingestão de NaCl 0,3 M e de água (9.4 ± 4.0 e 8.0 ± 2.4 mL/150 min, respectivamente). Injeções sozinhas de losartan no NPBL não promoveram modificações significativas na ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento FURO + CAP.

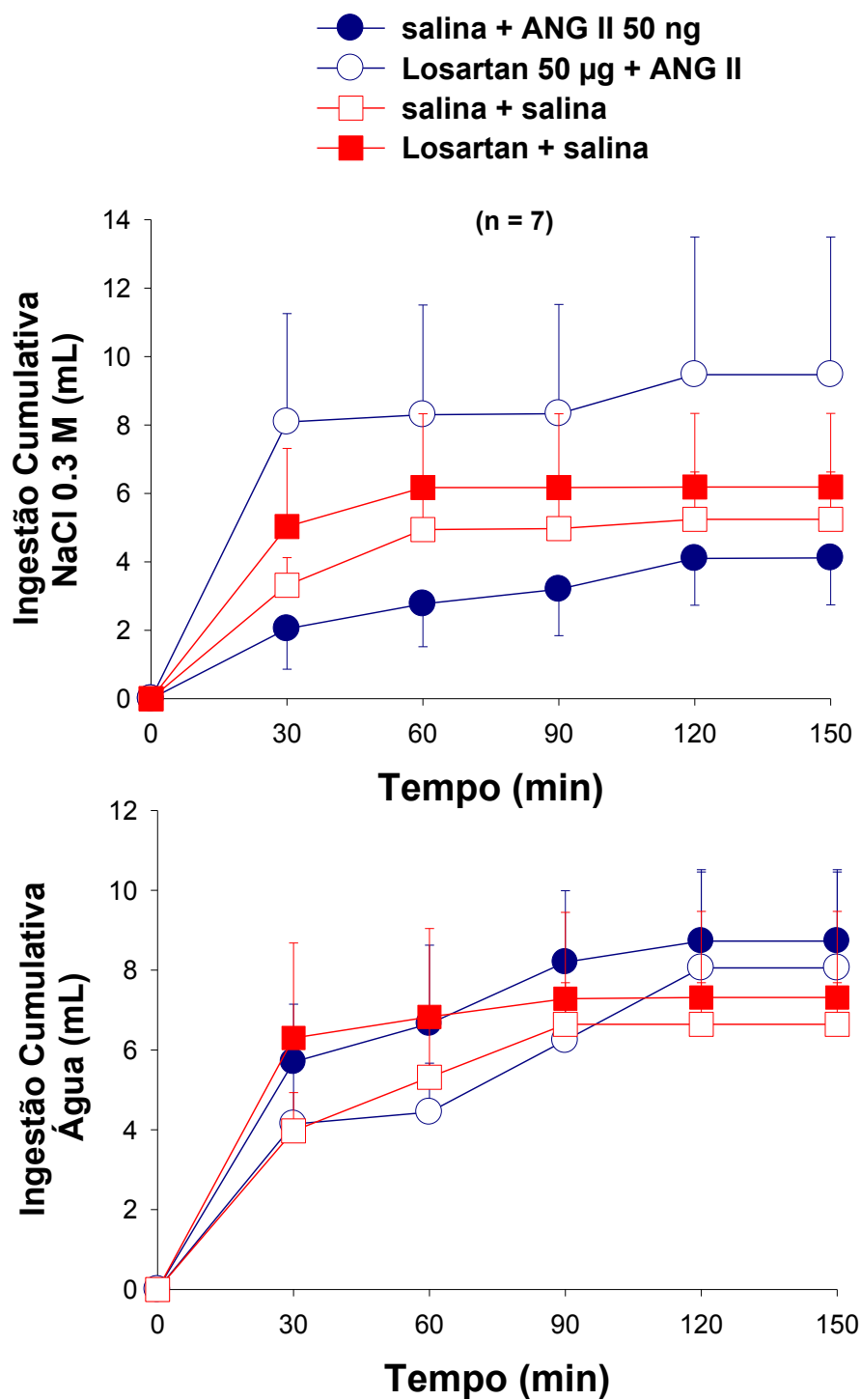


Figura 24: Efeito da injeção de losartan (50 µg/0,2 µL) combinado com salina ou com ANG II (50 ng/0.2 µL), ANG II combinada com salina, e de apenas salina injetados no NPBL bilateral na ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio com furosemida + captopril. n = número de ratos.

5- DISCUSSÃO

O NPBL integra importantes mecanismos de controle da ingestão de água e sódio (Menani e Johnson, 1995; Menani et al., 1996). Lesões eletrolíticas ou químicas do NPBL aumentam a ingestão de água após a injeção central ou periférica de angiotensina II (Edwards e Johnson, 1991 e Ohman e Johnson, 1986).

Este trabalho, como objetivo principal, estudou os efeitos de injeções bilaterais no NPBL de ANG II na ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com desidratação extracelular, utilizando o modelo de depleção aguda FURO + CAP. O modelo de depleção aguda de água e sódio, induzido pela administração simultânea do diurético furosemida (10 mg/kg sc) e baixas doses do inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril (5 mg/kg sc), promove hipotensão e induz ingestão de água e NaCl 0,3 M por formação de angiotensina central (Thunhorst and Johnson, 1994 e Menani et al., 1996). Portanto, utilizando este modelo experimental, onde se tem a formação de angiotensina central e o bloqueio de sua formação periférica, verificamos o papel da angiotensina no NPBL na ingestão de água e NaCl 0,3 M.

Os resultados apresentados mostraram que em ratos depletados de água e sódio, a injeção de ANG II (50 ng/0.2 μ L) no NPBL não modificou a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento FURO+CAP. Injeções prévias do antagonista AT₁ losartan (50 μ g/0.2 μ L) não promoveram alterações estatisticamente significativas dos efeitos produzidos pela ANG II na ingestão de água e sódio. Apesar de ter uma tendência de aumento na ingestão de NaCl 0,3 M, esses dados sugerem que os mecanismos angiotensinérgicos do NPBL não estão envolvidos na sede e no apetite ao sódio.

A administração de angiotensina II em regiões do sistema nervoso central, relacionadas com o controle cardiovascular e com o controle do balanço de fluidos e eletrólitos, como por exemplo, a região do terceiro ventrículo (AV3V) e órgão subfornical (OSF), estimula a ingestão de água e o apetite ao sódio (Brody e Johnson, 1980 e Johnson e Loewy, 1990). Outro estudo mostrou que a

ingestão de água e sódio induzido pela injeção central de ANG II foi inibida pelo antagonista AT₁ losartan, mas não pelo antagonista AT₂ CGP 42112B.

Receptores AT₁ e neurônios angiotensinérgicos estão presentes no NPBL (Lenkei et al, 1997; McKinley et al, 2002.).

Estudos recentes do nosso laboratório (Callera et al., 2005; Kimura et al., 2008; De Oliveira et al., 2007 e 2011), mostraram que a ativação de receptores do aminoácido inibitório GABA (ácido γ -aminobutírico), com injeções de muscimol (agonista de receptor GABA_A) ou baclofen (agonista de receptor GABA_B) no NPBL induziram ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados, depletados de sódio (modelo FURO+CAP) e ratos hiperosmóticos tratados previamente com a sobrecarga intragástrica de NaCl 12% (tratamento que promove alterações como hipernatremia, hiperosmolaridade e redução da renina plasmática, sem redução da volemia). Baseado em evidências da literatura, a ingestão de NaCl 0,3 M induzido pelos agonistas de receptores GABAérgicos poderia ser devido a inibição de mecanismos inibitórios presentes no NPBL responsáveis pela sede ou apetite ao sódio, ou mesmo o envolvimento da angiotensina II, serotonina ou mecanismos opióides do NPBL.

A hipótese de um possível envolvimento de receptores da angiotensina II, na modulação do apetite ao sódio induzido por agonistas GABAérgicos, baseou-se em estudos anteriores (Callera et al., 2003 e Roncari et al., 2008), onde mostraram que injeções periféricas ou centrais do antagonista AT₁ losartan, reduziram o efeito excitatório do muscimol e do baclofen injetados no NPBL na ingestão de NaCl 0,3 M. Além disso, mais recentemente, foi mostrado que o pré tratamento com losartan no NPBL reduziu os efeitos de ingestão de água e sódio induzido pelo muscimol injetado no mesmo local em ratos saciados e depletados com FURO+CAP (Da Silva et al., 2011).

As respostas dipsogênicas e natriorexigênicas da angiotensina II dependem dos níveis basais de pressão arterial e da quantidade dos fluidos corporais. Administração intracerebroventricular de ANG II aumenta a ingestão de água após a redução da pressão arterial, induzida, por exemplo, pela infusão de minoxidil (Thunhorst et al., 1993 e Thunhorst e Johnson, 1993). Ao contrário,

infusão intravenosa de ANG II, promove aumento de pressão arterial e inibe a ingestão de água (Robinson e Evered, 1987).

Múltiplos fatores estão envolvidos no controle da ingestão de água (sede) e no controle do apetite ao sódio, incluindo mecanismos inibitórios e excitatórios (Stricker e Verbalis, 1990). O presente estudo mostra que injeções de ANG II no NPBL, não modificaram a ingestão de água e sódio em ratos depletados de água e sódio com FURO+CAP (tratamento que induz hipotensão). A próxima etapa deste estudo será investigar o papel dos receptores AT2 da ANG II nestas respostas, uma vez que o bloqueio dos receptores AT1 não modificou a ingestão de água e sódio induzido pela ANG II injetada no NPBL.

REFERÊNCIAS

BERESFORD, M.J.; FITZSIMONS, J.T. Intracerebroventricular angiotensin 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. **Experimental Physiology**. V. 77, p. 761-764, 1992.

BRODY, M.J.; JOHNSON, A.K. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. IN: **Frontiers in Neuroendocrinology**, New York, v. 6, p. 249-292, 1980.

CALLERA, J.C.; BARBOSA, S.P.; DE LUCA Jr, L.A.; COLOMBARI, D.S.A.; MENANI, J.V. Activation of GABA receptors in the lateral parabrachial nucleus induces sodium intake in rats. Abstract Viewer/Itinerary Planner Washington, D.C., **Society for Neuroscience**, program n. 774.16, 2002.

CALLERA, J.C.; BARBOSA, S.P.; DE LUCA Jr, L.A. and MENANI, J.V. Effect of central injection of losartan (DUP-753) on water and sodium intake induced by muscimol into the lateral parabrachial nucleus in rats. **Resumo do XXXVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia (SBFis) e XXI Congresso da Associação Latino Americana de Ciências Fisiológicas**, program nº. PT 05.007, 2003

CALLERA, J.C.; OLIVEIRA, L.B.; DE LUCA Jr, L.A.; BARBOSA, S.P.; COLOMBARI, D.S.A.; MENANI, J.V. GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v.3, n. 134, p. 725-735, 2005.

CIRIELLO, J.; LAWRENCE, D.; PITTMAN, Q.J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Res.**, v. 322, p. 388-392, 1984.

COLOMBARI, D.S.A.; MENANI, J.V.; JOHNSON, A.K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake., **Am. J. Physiol.**, v. 271, p. R1470-R1476, 1996.

DA SILVA, C.Z.C.; MENANI, J.V.; CALLERA, J.C. AT₁ receptor blockade in the lateral parabrachial nucleus reduces the effects of muscimol on sodium intake, **Brain Res**, v. 1403, p. 28-36, 2011.

DE GOBBI, J.I.F.; DE LUCA Jr, L.A.; MENANI, J.V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA- induced sodium intake., **Brain Res.**, v. 880, p. 131-138, 2000.

DE GOBBI, J.I.F.; DE LUCA Jr, L.A.; JOHNSON, A.K.; MENANI, J.V. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **Am. J. Physiol.**, v. 280, p. R1301-R1307, 2001.

DE LUCA Jr, L.A.; BARBOSA, S.P.; MENANI, J.V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neuroscience**, v. 121, p. 1055-1061, 2003.

DE OLIVEIRA, L.B.; BARBOSA, S.P.; DE LUCA Jr, L.A.; CALLERA, J.C.; COLOMBARI, E.; MENANI, J.V. Effects of GABAB receptor activation in the lateral parabrachial nucleus on hypertonic NaCl intake in sodium depleted rats. Resumo **FESBE**, program number 01.05.002, 2004.

DE OLIVEIRA, L.B.; DE LUCA Jr, L.A.; COLOMBARI, D.S.A.; COLOMBARI, E.; CALLERA, J.C.; MENANI, J.V. Treatment with serotonergic 5-HT_{2A/2C} agonist inhibits NaCl intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial

nucleus. **Abstract FASEB and IUPS meeting**, San Diego, CA, p. 1649, program number 923.9, 2005.

DE OLIVEIRA, L.B.; CALLERA, J.C.; DE LUCA Jr, L.A.; COLOMBARI, D.S.A.; MENANI, J.V. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. **Brain Res. Bull.** V. 73, p. 238-247, 2007.

DE OLIVEIRA, L.B.; KIMURA, E.H.; CALLERA, J.C.; DE LUCA Jr., L.A.; COLOMBARI, D.S.A.; MENANI, J.V. Baclofen into the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic NaCl and sucrose intake in rats. **Neuroscience** 183 p. 160-170, 2011.

EDWARDS G.L.; JOHNSON A.K. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **Am. J. Physiol.** **261** (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 30): R1039–R1044. 1991.

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

FULWILER, C.E.; SAPER, C.B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat., **Brain Res. Ver.**, v.7, p.229-259, 1984.

HERBERT, H.; MOGA, M.M.; SAPER, C.B. Connections of the parabrachial nucleus to the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J. Comp. Neurol.** V. 293, p. 540-580, 1990.

JHAMANDAS, J.H.; HARRIS, K.H.; PETROV, T.; KRUKOFF, T.L. Characterization of the parabrachial nucleus input to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **J. Endocrinol**, v. 4, p. 461-471, 1992.

JHAMANDAS, J.H.; PETROV, T.; HARRIS, K.H.; VU, T.; KRUKOFF, T.L. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat. Electrophysiological and anatomical observations., **Brain Res. Bull**, v. 39, p. 115-126, 1996.

JOHNSON, A.K.; LOEWY, A.D. Circumventricular organs and their role in visceral functions. In: **Central Regulation of 28- Autonomic Functions**, edited by A. D. Loewy and K. Spyer. New York: Oxford Univ. Press, p. 247-267. 1990.

KIMURA, E.H.; DE OLIVEIRA, L.B.; CALLERA, J.C.; DE LUCA Jr, L.A.; MENANI, J.V. Effect of GABA_B receptor activation in the lateral parabrachial nucleus on water and sodium intake in cell-dehydrated rats., **Abstract FESBE meeting**, Águas de Lindóia/SP, program number 01.05.001, 2004.

KIMURA, E.H.; DE OLIVEIRA, L.B.; CALLERA, J.C.; DE LUCA Jr, L.A.; MENANI, J.V. Sodium intake by hyperosmotic rats treated with a GABA_A receptor agonist into the lateral parabrachial nucleus. **Brain Research**, 1190: 86-93, 2008.

KRUKOFF, T.L.; HARRIS, K.H.; JHAMANDAS, J.H. Effects projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer phaseolus vulgaris leucoagglutinin., **Brain Res. Bull**, v. 30, p. 163-172, 1993.

Lenkei, Z., Palkovits, M., Corvol, P., Llorens-Cortès, C. Expression of angiotensin type-1 (AT₁) and type-2 (AT₂) receptor mRNAs in the adult rat brain: A functional neuroanatomical review, **Frontiers in Neuroendocrinology** 18, 383-439, 1997.

MANGIAPANE, M.L.; SIMPSON, J.B. Subfornical organ: Forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II., **Am. J. Physiol.** V. 239, p. R382-R389, 1980.

McKinley, M.J., Albiston, A.L., A.M., Allen, Mathai, M.L., May, C.N., McAllen, R.M., Oldfield, B.J., Mendelsohn, F.A.O., Chai, S.Y. The brain renin–angiotensin system: location and physiological roles. **Intern. J. Biochem. & Cell Biol.** 35, 901–918, 2002.

MENANI, J.V.; JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses., **Am. J. Physiol** (Regulatory Integrative Comp. Physiol 269), p. R1044-R1049, 1995.

MENANI, J.V.; THUNHORST, R.T.; JOHNSON, A.K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats., **Am. J. Physiol** (Regulatory Integrative Comp. Physiol 270), p. R162-R168, 1996.

MENANI, J.V.; JOHNSON, A.K. Colecystolinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite., **Am J. Physiol** (Regulatory Integrative Comp. Physiol 275), p. R1431-R1437, 1998.

MENANI, J.V.; DE LUCA Jr, L.A.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite., **Am. J. Physiol.**, Regul. Integr. Comp. Physiol., v.279, p. R126-R131, 2000.

MENANI, J.V.; BARBOSA, S.P.; DE LUCA Jr, L.A.; DE GOBBI, J.I.F.; JOHNSON, A.K. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and colinergic-induced sodium appetite., **AJP- Regulatory Integrative Comp. Physiol.**, v.282, p. R837-R841, 2002.

NORGREN, R. Gustatory system. In: Paxinos G (ed). **The Rat Nervous System**, 2nd. ed. San Diego, Academic Press, p. 751-771, 1995.

OHMAN, L.E.; JOHNSON, A.K. Lesions in the lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol., **Am. J. Physiol.**, v. 251, p. R504-R509, 1986.

OHMAN, L.E.; JOHNSON, A.K. Role of the lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake produced by right atrial stretch., **Brain Res.**, 695, p. 275-278, 1995.

OLIVEIRA, L.B.; DE LUCA Jr, L.A.; COLOMBARI, D.S.A. and MENANI, J.V. Possible interaction between GABAergic and opioid mechanisms in the lateral parabrachial nucleus to control NaCl and water intake. **XIX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental**. Resumo 01.05.009, 2004.

PAXINOS, G.; WATSON, C. The rat brain in stereotaxic coordinates, 2 ed., **Academic Press**, New York, 1986.

RANG, H. P. Farmacologia, 5 ed, Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2004.

ROBINSON, M.M.; EVERED, M.D. Pressor action of intravenous angiotensin II reduces drinking response in rats. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol** 252: R754–R759, 1987.

RONCARI, C.F.; OLIVEIRA, L.B.; BARBOSA, S.P.; DE LUCA Jr, L.A.; COLOMBARI, D.S.A.; DE PAULA, P.M. and MENANI, J.V. Bloqueio de receptores angiotensinérgicos reduzem a ingestão de água e sódio induzida pela ativação GABAérgica no núcleo parabraquial lateral. **Resumo do XII Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular**. program nº. P71, 2008.

STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Sodium appetite. In: **Handbook of Behavioral Neurobiology. Neurobiology of Food and Fluid Intake**. New York: Plenum, vol. 10. 1990

THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Effects of arterial pressure on drinking and urinary responses to intracerebroventricular angiotensin II. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 264: R211–R217, 1993.

THUNHORST, R.L.; LEWIS, S.J.; JOHNSON, A.K. Role of arterial baroreceptor input on thirst and urinary responses to intracerebroventricular angiotensin II. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol* 265: R591–R595, 1993.

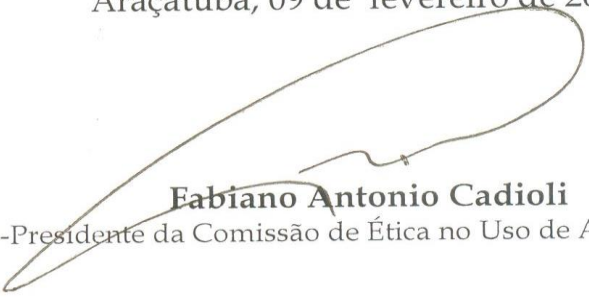
THUNHORST, R.L. and JOHNSON, A.K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure and salt appetite in rats. *Am. J. Physiol (Regulatory Integrative Comp Physiol 266)*: R458-R465, 1994.



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto *"Efeito da injeção de angiotensina II no núcleo parabraquial lateral (NPBL) na ingestão de NaCl hipertônico e água"*, sob a responsabilidade de JOÃO CARLOS CALLERA está de acordo com os Princípios Éticos em Uso de Animais e foi aprovado em reunião realizada em 16/12/2010, de acordo com o Protocolo FOA-7755/10.

Araçatuba, 09 de fevereiro de 2011.



Fabiano Antonio Cadioli

Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA

mfsr.