

UFRRJ

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

DISSERTAÇÃO

**PROTOCOLOS QUE DESAFIAM O APETITE AO SÓDIO:
ALTERAÇÕES HIDROELETROLÍTICAS,
CARDIOVASCULARES E MOLECULARES**

Lívia da Rocha Natalino Monteiro

2016



UFRRJ

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

**PROTOCOLOS QUE DESAFIAM O APETITE AO SÓDIO:
ALTERAÇÕES HIDROELETROLÍTICAS,
CARDIOVASCULARES E MOLECULARES**

LÍVIA DA ROCHA NATALINO MONTEIRO

Sob orientação do Professor

Luís Carlos Reis

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração em Fisiologia.

Seropédica, RJ

Fevereiro de 2016

616.39

M775p

T

Monteiro, Livia da Rocha Natalino, 1991-
Protocolos que desafiam o apetite ao
sódio: alterações hidroeletrolíticas,
cardiovasculares e moleculares / Livia da
Rocha Natalino Monteiro. - 2016.

101 f.: il.

Orientador: Luis Carlos Reis.

Dissertação (mestrado) - Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas,
2016.

Bibliografia: f. 71-79.

1. Equilíbrio hidro-eletrolítico
(Fisiologia) - Teses. 2. Sistema
cardiovascular - Teses. 3. Hipertensão -
Teses. 4. Sódio - Metabolismo - Teses. 5.
Apetite - Teses. 6. Rato como animal de
laboratório - Teses. I. Reis, Luis Carlos,
1952- II. Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Curso 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 EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

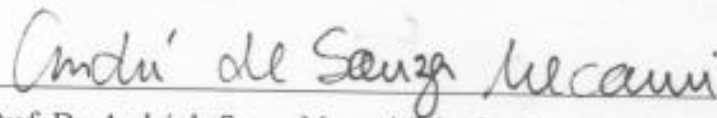
LÍVIA DA ROCHA NATALINO MONTEIRO

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em (Fisiologia e Farmacologia).

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17/02/2016



Prof. Dr. Luis Carlos Reis (Orientador, Membro Interno – UFRRJ)



Prof. Dr. André de Souza Mecawi (Membro Interno – UFRRJ)



Prof. Dr. Charles Thomas Colin Hindmarch (Membro Externo
– University of Bristol - Reino Unido)

Dedico este trabalho aos meus pais por sempre estimularem meus estudos e pela paciência e dedicação durante todos esses anos.

E a todos aqueles que sonham em trilhar os caminhos do meio acadêmico apesar de todas as dificuldades.

AGRADECIMENTOS

A caminhada foi longa e não foi fácil chegar até aqui, mas se hoje este trabalho está terminado foi graças a todos aqueles que estiveram ao meu lado, torcendo pelo meu sucesso. Agradeço em primeiro lugar à minha família, minha avó Yhone, meu tio João Carlos, meus irmãos Vitor e Gabriel e, especialmente aos meus pais, Carlos José e Rita de Cássia, que sempre apoiaram meus estudos e são meu exemplo de dedicação profissional, sempre a serviço do outro. Tudo o que sou hoje devo a essas pessoas, a nossa convivência em família, e a cada momento de nossas histórias que ajudou a moldar o que sou hoje. Agradeço com especial carinho à minha mãe, que além do exemplo profissional é também uma das mais doces pessoas que já conheci e que apesar de todas as dificuldades sempre me incentivou a manter a força e a ternura acima de tudo – ainda mais nesses últimos meses, cuidando de nossa cachorrinha doente, passando noites e noites em claro.

Jamais poderia deixar de agradecer também aos mestres, àqueles que possibilitaram minha entrada no meio acadêmico. Tenho profunda admiração por aqueles que seguem esta vocação, de ensinar, de tornar esse mundo um pouco melhor dividindo o conhecimento que têm com aqueles que dele precisam. Foram muitos os mestres que passaram pela minha vida, e que ajudaram a despertar minha sede pelo conhecimento desde cedo. Mas destaco aqui aquele que despertou o meu interesse pela fisiologia ainda na graduação e que me acolheu como sua aluna de iniciação científica quando nada sabia. Obrigada mestre Luís por me acolher como sua aluna e pela paciência durante esses anos! Agradeço ainda aos outros mestres do Departamento de Ciências Fisiológicas pelas aulas tanto na graduação como na pós, assim como os conselhos sobre aulas e didática. Quero deixar ainda meu agradecimento à Fabricia, que me acolheu assim que cheguei ao departamento, e me ensinou muito do que sei hoje, não só sobre fisiologia, mas sobre o que fazer para manter o ambiente de trabalho leve para todos. E por último, ao mestre André, não só por ter me dado a oportunidade de trabalhar neste projeto, como também por ter supervisionado de perto cada etapa executada, ajudando em todos os passos.

Como esquecer então, dos alunos de IC e de pós do DCFis, que tornam tudo mais leve e divertido, mesmo quando as coisas estão difíceis? Obrigada a vocês, por tornarem os dias de laboratório mais animados, principalmente à equipe LCR, Bruno, Verônica e Raoni! Não poderia deixar de agradecer ainda àqueles que estão sempre dispostos a ajudar os outros, mesmo que eles já estejam bem enrolados... O DCFis jamais seria o mesmo sem Claudinho e Raquel. Raquel, doutoranda e técnica, que além de suas funções se desdobra em mil para ajudar quem precisa, e que além de super competente é também uma amiga para todas as horas.

Falando em amigas, obrigada fífetes (Joyce, Débora e Gabi). Vocês tornaram esses anos difíceis muito mais divertidos! Obrigada principalmente à Joyce (Juice) e Débora (Abóbora) por dividirem todos os momentos, fossem eles alegres ou tristes. Foram muitas aulas de Fifa, muitas fofocas, maluquices e gargalhadas (algumas lágrimas também), e vocês tornaram tudo mais alegre, mesmo quando estávamos todas desesperadas, querendo jogar tudo para o alto e correr para longe de Seropédica!

Amo vocês, todos vocês que fizeram parte desse pedaço da minha história de forma direta ou indireta!

É, não foi fácil chegar até aqui, mas consegui, conseguimos!

RESUMO

MONTEIRO, Livia da Rocha Natalino. **PROTÓCOLOS QUE DESAFIAM O APETITE AO SÓDIO: ALTERAÇÕES HIDROELETROLÍTICAS, CARDIOVASCULARES E MOLECULARES**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas. Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2016.

A regulação constante do balanço de água e sódio é essencial para a manutenção da vida. Desde os organismos mais simples até os mais complexos, a conservação de tais elementos em níveis adequados constitui ponto crucial para a homeostase do indivíduo. Para tanto, os organismos lançam mão de uma série de mecanismos neuro-humorais que regulam a todo momento o conteúdo de água e sódio corporal. Nas últimas décadas, estudos sobre mecanismos neurais envolvidos na regulação do apetite ao sódio têm ganhado destaque, uma vez que o consumo exagerado de cloreto de sódio está diretamente relacionado a alterações funcionais que podem gerar doenças como a hipertensão arterial. Além do alto consumo diário de sódio pelas sociedades ocidentais, há também um crescente número de casos de hipertensão arterial, particularmente do tipo denominado sal-sensível. Assim, é necessário que os mecanismos envolvidos nessas alterações sejam intensamente estudados em modelos científicos. Desta forma, através do uso de modelo animal, investigamos neste trabalho as alterações funcionais advindas da modificação do conteúdo de sódio presente na dieta dos animais. Para tanto, ratos Wistar machos foram randomicamente divididos em 4 grupos experimentais: i) controle (CTRL); ii) dieta pobre em sódio (DP); iii) furosemida (FURO); iv) sobrecarga salina (SS). A partir desta divisão, traçamos os perfis hidroeletrólítico, cardiovascular e molecular desses paradigmas de desafio ao balanço hidroeletrólítico. Verificamos que a dieta hipossódica e a furosemida foram capazes de induzir o apetite ao sódio de forma sustentada até 4 horas após reapresentação de fluidos (DP $4,1 \pm 0,8$ de peso corporal; FURO $8,5 \pm 1,0$ vs. CTRL $0,15 \pm 0,08$ mL/100g; $p < 0,05$). Confirmamos a ocorrência de hipernatremia a partir da sobrecarga salina (SS $163,7 \pm 1,6$ vs. CTRL $143,2 \pm 0,7$ mEq/L; $p < 0,05$) e, surpreendentemente, encontramos níveis natrêmicos maiores que o controle no grupo DP (DP $148,7 \pm 1,8$ vs. Ctrl $143,2 \pm 0,7$ mEq/L; $p < 0,05$). Quanto à avaliação dos parâmetros cardíacos, somente o grupo furosemida apresentou PAM menor que o controle após a administração de fenilefrina nas concentrações de 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$ (Phe10 = Furo $142,6 \pm 19,1$ vs. Ctrl $222,4 \pm 14,2$; Phe50 = Furo $261,0 \pm 74,8$ vs. Ctrl $190,9 \pm 19,6$ mmHg; $p < 0,05$), provavelmente devido à hipovolemia nestes animais. Verificamos ainda que no grupo submetido à sobrecarga salina ocorre aumento da expressão de mRNA para AVP (SS $2,61 \pm 0,16$ vs. CTRL $1,04 \pm 0,04$ a.u - unidades arbitrárias; $p < 0,05$) e OT (SS $1,52 \pm 0,12$ vs. CTRL $1,01 \pm 0,05$ a.u; $p < 0,05$), enquanto que no grupo dieta pobre estes parâmetros são reduzidos (AVP - DP $0,65 \pm 0,07$ vs. CTRL $1,04 \pm 0,04$; OT - DP $0,65 \pm 0,06$ vs. CTRL $1,01 \pm 0,05$ a.u; $p < 0,05$). Por fim, encontramos níveis aumentados de mRNA do receptor AT1 nos grupos sobrecarga salina (SS $2,94 \pm 0,26$ vs. CTRL $1,14 \pm 0,25$ a.u; $p < 0,05$) e furosemida (Furo $3,08 \pm 0,51$ vs. CTRL $1,14 \pm 0,25$ a.u; $p < 0,05$). Deste modo, estes resultados reforçam o importante papel dos sistemas neuroendócrinos centrais na modulação da homeostase hidroeletrólítica e cardiovascular.

Palavras-chave: Equilíbrio hidroeletrólítico. Apetite ao sódio. Alterações cardiovasculares.

ABSTRACT

MONTEIRO, Livia da Rocha Natalino. **SODIUM APPETITE CHALLENGING PROTOCOLS: HYDROELECTROLITIC, CARDIOVASCULAR AND MOLECULAR ALTERATIONS**. 2016. Dissertation (MS in Physiological Sciences. Institute of Biological and Health Sciences, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2016.

The constant regulation of sodium and water balance is essential for the maintenance of life. From the simplest to the most complex organisms, conservation of such elements at appropriate levels is a vital issue for the homeostasis of the individual. In order to maintain this balance, organisms resort a set of neurohumoral mechanisms that constantly regulate the content of bodily water and sodium. In recent decades, studies of neural mechanisms involved in the regulation of sodium appetite have gained ground since the excessive intake of sodium chloride has been directly related to functional changes which can lead to diseases such as hypertension. Besides the high daily consumption of sodium chloride by occidental societies, there is also a growing number cases of hypertension, particularly the so-called “salt-sensitive”. Therefore, it is necessary that the mechanisms involved in these changes are intensively studied in scientific models. Thus, through the use of an animal model, we investigated the functional changes arising from the modification of sodium content in the diet of animals. Wistar male rats were randomly divided into 4 groups: i) control (CTRL); ii) low-sodium diet (LSD); iii) furosemide (FURO); iv) saline overload (SO). From this division, we draw the hydroelectrolytic, cardiovascular and molecular profiles of these paradigms four days after the protocols beginning. We found that low-sodium diet and furosemide were able to induce a sustained sodium appetite 4 hours after reintroduction of fluids when compared to control group (LSD: 4.1 ± 0.8 and FURO: 8.5 ± 1.0 vs. CTRL 0.15 ± 0.08 mL/100g body weight, $p < 0.05$, respectively). Besides we have confirmed the occurrence of hypernatremia in SO group (163.7 ± 1.6 vs. 143.2 ± 0.7 mEq/L, $p < 0.05$) we surprisingly have found higher plasma sodium levels in LSD (148.7 ± 1.0 vs. 143.2 ± 0.7 mEq/L, $p < 0.05$) when compared to control group. During the assessment of cardiac parameters, only the FURO group showed smaller mean arterial pressure than control after administration of phenylephrine at both 10 and 50 $\mu\text{g/mL}$ concentrations (Phe10: 142.6 ± 19.1 vs. 222.4 ± 14 bpm, $p < 0.05$; Phe50: 261.0 ± 74.8 vs. 190.9 ± 19.6 mmHg, $p < 0.05$, respectively), probably due to hypovolemia, a factor which could also explain the absence of hyponatremia in these animals. Concerning the molecular parameters within the PVN, SO group showed an increased mRNA expression of AVP (2.61 ± 0.16 vs. 1.04 ± 0.04 a.u., $p < 0.05$) and OT (1.52 ± 0.12 vs. 1.01 ± 0.05 a.u., $p < 0.05$), while in the LSD group, these parameters are reduced (AVP: 0.65 ± 0.07 vs. 1.04 ± 0.04 a.u., $p < 0.05$; OT: 0.65 ± 0.06 vs. 1.01 ± 0.05 a.u., $p < 0.05$), when compared to control group, respectively. Finally, we found increased levels of AT1 receptor mRNA in SO group (2.94 ± 0.26 vs. 1.14 ± 0.25 a.u., $p < 0.05$) and FURO (3.08 ± 0.51 vs. 1.14 ± 0.25 a.u., $p < 0.05$) compared to control, respectively. Thus, these results underscore the central role of neuroendocrine systems in the modulation of electrolyte and cardiovascular homeostasis.

Key-words: Hydroelectrolitic balance. Sodium appetite. Cardiovascular alterations.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema representativo do circuito neural envolvido na regulação do equilíbrio hidroeletrolítico.	7
Figura 2. Linha do tempo do experimento realizado em gaiola metabólica.	14
Figura 3. Ingestão diária de fluidos.	17
Figura 4. Ingestão diária de salina hipertônica.	18
Figura 5. Ingestão diária de ração.	18
Figura 6. Ganho de peso corporal cumulativo.	19
Figura 7. Volume urinário diário.	20
Figura 8. Osmolalidade urinária diária.	21
Figura 9. Excreção diária de sódio.	21
Figura 10. Excreção diária de potássio.	22
Figura 11. Ingestão cumulativa de salina 0,3 M.	23
Figura 12. Ingestão cumulativa de água.	24
Figura 13. Índice de preferência por sódio.	24
Figura 14. Volume urinário cumulativo.	25
Figura 15. Osmolalidade urinária.	26
Figura 16. Excreção urinária de sódio após reapresentação de fluidos.	26
Figura 17. Excreção urinária de potássio após reapresentação de fluidos.	27
Figura 18. Hematócrito dos animais submetidos a alteração do conteúdo de sódio ingerido ao final de 4 dias de dieta.	28
Figura 19. Osmolalidade plasmática.	28
Figura 20. Concentração de sódio plasmático.	29
Figura 21. Concentração de potássio plasmático.	29
Figura 22. Pressão arterial média em resposta à fenilefrina, nitroprussiato de sódio e expansão de volume hipertônica.	30
Figura 23. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de AVP.	32
Figura 24. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de OT.	32
Figura 25. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de AT ₁ no PVN.	33
Figura 26. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de AT ₂ no PVN.	33
Figura 27. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de AT ₁ no PVN.	34

LISTA DE ABREVIACOES

5-HT	5-hidroxitriptamina (serotonina)
5-HT _{2A/2C}	Receptores para serotonina do tipo 2 a e 2c
ANG-(1-7)	Angiotensina (1-7)
ANG I	Angiotensina I
ANG II	Angiotensina II
AP	Área postrema
AT ₁	Receptor para angiotensina do tipo 1
AT ₂	Receptor para angiotensina do tipo 2
AVP	Arginina vasopressina
AV3V	Região anteroventral do terceiro ventrículo cerebral
CVLM	Bulbo caudoventrolateral
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA ₂	Enzima conversora de angiotensina isoforma 2
FC	Frequência cardíaca
ICV	Intracerebroventricular
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LIC	Líquido intracelular
LEC	Líquido extracelular
LHA	Área hipotalâmica lateral
MAS	Receptor para ang-(1-7)
MNPO	Núcleo preóptico mediano
NPBL	Núcleo parabraquial lateral
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NPV	Núcleo paraventricular
NTS	Núcleo do trato solitário
NOS	Núcleo supraóptico
PAM	Pressão arterial média
Órgãos circumventriculares	OCVS

OSF	Órgão subfornicial
OVL	Órgão vascular da lâmina terminal
OT	Ocitocina
RVL	Bulbo rostroventrolateral
SNC	Sistema nervoso central
SRA	Sistema renina angiotensina
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
TRPV	Receptores vanilóides de potencial transitório
V ₁	Receptor para vasopressina do tipo 1
V ₂	Receptor para vasopressina do tipo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.5 Sódio E Regulação Cardiovascular	10
3 JUSTIFICATIVA	11
4 OBJETIVOS.....	12
4.1 Objetivo Geral.....	12
4.2 Objetivo Específico.....	12
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
5.1 Apreciação Bioética Da Experimentação Animal.....	13
5.2 Grupos Experimentais.....	13
5.3 Protocolos Experimentais.....	13
5.4 Técnicas Para Análise De Amostras E Tecidos	15
5.5 Análise Estatística	16
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	17
6.1 Gaiola Metabólica.....	17
6.2 Parâmetros Plasmáticos Dos Animais Submetidos A Alterações No Conteúdo De Sódio Durante Quatro Dias	27
6.3 Parâmetros Cardíacos Dos Animais Submetidos A Alterações No Conteúdo De Sódio Durante Quatro Dias	30
6.4 Quantificação de mRNA por qPCR	31
7 CONCLUSÕES	35
VERSÃO EM IGLÊS.....	36
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71

1 INTRODUÇÃO

O sódio é o soluto majoritário do meio extracelular e, principal responsável pela manutenção do gradiente osmótico, possibilitando a movimentação da água através dos compartimentos intra e extracelular. Por isso, esse íon se mostra imprescindível para a manutenção da homeostase hidroeletrolítica, permitindo a regulação de volume e osmolaridade. Esses últimos são pontos cruciais a serem regulados, uma vez que desvios de suas faixas ótimas podem levar à morte do indivíduo. Desta forma, os organismos desenvolveram mecanismos refinados para controle deste balanço que permitem a manutenção da vida mesmo em ambientes adversos.

Por este motivo, o balanço hidroeletrolítico encontra-se sob um controle altamente sensível e de rápida execução, sendo constituído por componentes renais e neuroendócrinos que a todo momento recebem informações sobre o estado osmótico do indivíduo, possibilitando o acionamento de mecanismos que irão corrigir os desvios ocasionados. O controle central destes parâmetros se dá através de neurônios e células gliais especializadas que detectam alterações na pressão osmótica e na concentração de sódio extracelular. Estas células estão localizadas nos órgãos circumventriculares (OCVs), áreas desprovidas de barreira hematoencefálica (BHE), como o órgão subfornicial (OSF), órgão vascular da lâmina terminal (OVL) e área postrema (AP). Estas regiões por sua vez apresentam conexões com outras regiões encefálicas relacionadas ao balanço hidrossalino e regulação cardiovascular.

Populações de células dos OCVs são sensíveis à angiotensina II (ANG II), um importante componente do Sistema Renina - Angiotensina - Aldosterona (SRAA). Dentre as ações periféricas da ANG II destacam-se a intensa vasoconstrição e a secreção de aldosterona, que causa uma maior reabsorção renal de sódio e excreção de potássio, aumentando o volume circulante. Quanto às ações centrais, tem a capacidade de estimular a sede e o apetite ao sódio, ocasionando também elevação da pressão sanguínea, representando assim uma importante interface entre o balanço hidroeletrolítico e a homeostase cardiovascular.

Dentre estas áreas para as quais os OCVs enviam projeções, destacam-se os núcleos hipotalâmicos supraóptico (NSO) e paraventricular (NPV), cujos neurônios são responsáveis pela síntese e secreção dos hormônios vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) em resposta à hiperosmolalidade e hipovolemia. Além disso, essas células enviam ainda projeções para o núcleo dorsal da rafe (NDR) e núcleo parabraquial lateral (NPBL) que estão envolvidos na modulação do apetite específico ao sódio. Desta forma, o estímulo de neurônios presentes nos OCVs leva à ativação de um complexo circuito, culminando com a deflagração de respostas simpáticas, endócrinas e comportamentais.

O sistema serotoninérgico que ascende da rafe mesencefálica apresenta forte papel sobre a inibição do apetite ao sódio. Populações de neurônios serotoninérgicos projetam-se ainda para diversas áreas encefálicas, relacionadas ao equilíbrio hidroeletrolítico, controle neuroendócrino e cardiovascular. O NDR conteria então, a principal população de neurônios serotoninérgicos responsáveis pela sinalização de saciedade ao sódio, uma vez que a depleção corporal de sódio diminui sua atividade. Por outro lado, o consumo induzido ou a submissão do indivíduo a uma sobrecarga de sódio leva a um aumento da atividade destes neurônios.

Tanto as áreas cerebrais responsáveis pelo estímulo do apetite ao sódio (angiotensinérgicas) quanto aquelas relacionadas a sua inibição (serotoninérgicas) apresentam conexões entre si, formando um complexo circuito que associa as informações obtidas pelos dois sistemas. Com isso, numa situação de hiponatremia, alterações na pressão osmótica e no conteúdo de sódio presente no líquido cefalorraquidiano (LCR) são detectadas pelos OCVs, onde a ANG II atuará também em seus receptores AT_1 , gerando os comportamentos motivados

de sede e apetite ao sódio. Por outro lado, os mecanismos inibitórios serotoninérgicos devem encontrar-se inibidos, de modo a facilitar o apetite ao sódio.

Dada a grande integração destes sistemas, neste trabalho analisamos as alterações funcionais observadas nos parâmetros hidroeletrólíticos, cardiovasculares e moleculares ocasionadas por diferentes concentrações de sódio na dieta dos animais que serão submetidos tanto a uma situação de sobrecarga de sódio quanto a situações de déficit de sódio. Possibilitando assim que comparemos as alterações ocorridas quando há inibição ou estimulação dos circuitos que modulam o apetite ao sódio.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Importância Histórica E Biológica Do Sódio

O uso de cloreto de sódio pela humanidade remonta milhares de anos. Enquanto os animais migravam em busca de fontes de sal, o homem parece ter feito algo semelhante, construindo assim rotas e povoados ao redor de tais fontes. Algumas destas rotas cruzaram o globo e permitiram que o sal se tornasse uma moeda de troca desde o Marrocos até Roma. Desde o princípio, o sal era muito utilizado pelas sociedades antigas, servindo para realçar o sabor de alimentos, aumentar o tempo de conservação dos mesmos, e até mesmo para fins antissépticos. Tamanha era a importância deste mineral que cidades foram nomeadas devido a fontes de sal presentes, guerras foram travadas para decidir seu controle; chegando a ser utilizado como forma de pagamento aos soldados em Roma, denominando-se *salarium*, palavra em latim que deu origem ao termo salário, amplamente utilizado. (CIRILLO *et al.* 1994).

Na Grécia antiga, apresentava também um importante papel e seu consumo era cercado de misticismos, uma vez que estava ligado ao mito de Afrodite, deusa do amor e da fertilidade que, em uma das versões do mito, teria nascido do sal da espuma do mar. Os gregos acreditavam que o consumo de sal estaria ligado a uma maior fertilidade tanto no homem quanto nos outros animais, onde sua deficiência levaria a alterações reprodutivas. (MOINIER & DRÜEKE 2008). Aristóteles já relatava a suplementação de sal mineral como forma de aumentar a reprodução e lactação de ovelhas. Atualmente, realiza-se esta suplementação em animais de produção a fim de evitar alterações como diminuição da produção de leite e perda de peso que são consequências do déficit de sódio, dentre outras mais graves. Em condições naturais, quando ocorre deficiência de sódio, os animais costumam migrar em busca de fontes do mineral. De forma interessante, animais de produção como ovelhas e bezerras, quando submetidos a uma dieta pobre em sódio, apresentam alterações comportamentais que os compelem a buscar e ingerir sal, o que vai ao encontro do que é observado também em outros herbívoros na natureza (DENTON & SABINE 1961; BELL 1972). As alterações comportamentais que levam estes animais a buscar o cloreto de sódio são um notável sinal da importância deste elemento para a manutenção da vida.

Apesar do potássio representar o principal íon intracelular, sódio e cloreto representam, respectivamente os principais cátion e ânion do líquido extracelular, onde o sódio sobressai como principal constituinte. Embora a concentração adequada destes três elementos seja essencial para a manutenção das funções celulares, a regulação do transporte de sódio parece interferir de forma global nas concentrações dos outros elementos. Desta forma, o sódio figura como elemento central na manutenção do meio interno. De fato, sua movimentação através dos compartimentos corporais é o que permite a osmorregulação e possibilita assim a manutenção da vida frente a ambientes adversos (GEERLING; LOEWY, 2008).

Desta forma, o sódio *per se* apresenta-se como elemento imprescindível à manutenção da vida, e está envolvido em todas as funções biológicas; desde o compartimento celular até o funcionamento complexo de órgãos e sistemas. Sua movimentação através das células está envolvida em uma miríade de funções fisiológicas, como o transporte de nutrientes, condução de impulsos nervosos e manutenção do equilíbrio ácido-base. O sódio é essencial para o funcionamento da célula em si, pois permite a manutenção do potencial transmembrana, possibilitando a excitabilidade celular e propagação dos impulsos nervosos (MICHELL AR, 1995).

Para tanto, o gradiente de sódio é mantido através do funcionamento do transportador Na⁺K⁺-ATPase, o que possibilita também a ação de outros sistemas de transporte e, de fato,

mantém a concentração de potássio no compartimento intracelular. O gradiente de sódio ainda: i) permite os processos de diluição da urina na alça de Henle e da concentração da mesma no ducto coletor; ii) através de cotransporte facilita a captação entérica e reabsorção renal de solutos como glicose e aminoácidos; iii) participa na manutenção da volemia e da pressão osmótica, de modo que o conteúdo intra e extracelular de água dependerá principalmente do conteúdo total de sódio disponível no compartimento extracelular, uma vez que representa seu principal constituinte. Além disso, por influenciar a atividade do transportador Na⁺K⁺ ATPase que consome altas concentrações de adenosina trifosfato (ATP), as taxas do transporte de sódio podem afetar diversas vias metabólicas (MICHELL AR 1995).

2.2 Papel Do Sódio No Equilíbrio Hidroeletrólítico

O sódio, como íon mais abundante do líquido extracelular (LEC) é capaz de exercer pressão osmótica relevante, onde a alteração de sua concentração causa a movimentação da água através das membranas. Como este cátion não cruza livremente as barreiras celulares (necessita da ação de transportadores), seu transporte constitui fator limitante para o volume do LEC e distribuição de água através dos compartimentos corporais. Todos os fluidos corporais (LEC - representado pelo plasma e pelo fluido intersticial e o líquido intracelular – LIC) encontram-se em relativo equilíbrio osmótico, de tal modo que alterações no conteúdo de sódio plasmático não afetará somente o volume plasmático e a pressão sanguínea, mas também o compartimento intracelular e o fluido intersticial. Desta forma, água e sódio representam variáveis primárias da homeostase hidroeletrólítica que se relacionam de forma interdependente, uma vez que variações em um dos fatores causam alterações no mesmo sistema, cujos valores devem atender a uma faixa estreita de variação compatível com a vida. Por isso, é necessário realizar um fino controle destes valores, o que nos mamíferos, é feito através do recrutamento de mecanismos renais e neuroendócrinos que a todo momento aferem e controlam alterações no LIC e LEC. A excreção/ reabsorção renal, bem como a ingestão de água e eletrólitos são as principais formas de controle de volume e osmolaridade. Uma redução de cerca de 10% do volume plasmático é capaz de gerar sede, da mesma forma um aumento de cerca de 1 a 2% na osmolaridade plasmática é capaz de gerar este estímulo de maneira muito mais potente. (ANTUNES-RODRIGUES *ET AL.* 2004). Os valores de sódio plasmático e osmolaridade devem orbitar em torno de 145 mM e 290 mosmol/L respectivamente, de modo que grandes desvios destes valores podem levar ao prejuízo das funções fisiológicas primordiais, como a perfusão tecidual, podendo levar à morte do animal se não corrigidas a tempo. Para tanto, os sistemas de controle são recrutados de acordo com o parâmetro alterado. A osmolaridade do LEC é controlada basicamente pela regulação da ingestão e excreção de água, enquanto o volume deste compartimento dependerá primariamente do conteúdo de sódio (VERBALIS 2003). Com isso, o volume total do LEC, como visto anteriormente, dependerá diretamente do conteúdo de sódio, ao redor do qual flutuará o conteúdo de água a fim de controlar finamente a pressão osmótica. Esta organização do sistema torna necessário que o sódio seja então excretado ou ingerido e retido, de forma a reduzir ou aumentar o volume plasmático.

Durante as atividades metabólicas normais de um organismo ocorrem perdas de água e eletrólitos. Apesar de comum, a desidratação pode ser acentuada em determinadas situações patológicas ou durante desafios fisiológicos, onde tais podem representar alto risco ao indivíduo. De forma didática, pode-se separar a desidratação em duas formas principais, a desidratação intracelular e a extracelular, cujas ocorrências geram tipos correspondentes de sede. A primeira, ou desidratação intracelular se dá quando a perda de água supera a perda de

sódio, isto ocorre por exemplo durante a transpiração moderada e durante a privação hídrica. Com a perda de água, o volume do LEC decresce e a osmolaridade aumenta, com o LEC agora hipertônico, as células perdem água e se deformam, o que estimulará a ingestão e reabsorção de água. Já na desidratação extracelular, ocorrem perdas similares de água e sódio (quadros de diarreia e hemorragia), a redução do volume do LEC é mais pronunciada e a osmolaridade pode aumentar ou se manter a mesma; assim, a ingestão de água não será suficiente para repor o déficit. A ingestão de água *per se* é suficiente para repor as perdas de volume somente quando a perda de água é superior a de sódio. Nestes casos, a hipernatremia funciona como um estímulo à sensação de sede e à secreção de AVP, causando ingestão e reabsorção renal de água. Contudo, quando as perdas de fluidos também envolvem grande perda de sódio (como nas hemorragias) a ingestão de água não é suficiente para reparar o déficit. Neste caso específico, a ingestão somente de água sem a reposição de sódio levará à hiponatremia, que tem a capacidade de inibir a ingestão e reabsorção de fluidos (MCKINLEY & JOHNSON 2004).

Em situações de depleção de sódio, inicialmente a concentração plasmática do íon praticamente não se altera, pois, a secreção de AVP é prontamente reduzida, ocorrendo assim um aumento da excreção de água. Porém este ajuste causa hipovolemia, e caso esta se agrave, os estímulos para sede e secreção de AVP são aumentados a ponto de superar a osmolaridade como estímulo dominante, aumentando assim, a retenção de água para manutenção do volume em detrimento da concentração de sódio. Desta forma, o indivíduo desenvolve hiponatremia e, caso o déficit não seja repostado, a hipovolemia também se mantém. Seguindo este pensamento linear, onde volume e conteúdo de sódio corporal encontram-se intrinsecamente relacionados, mudanças no conteúdo de sódio ingerido levariam então a alterações no volume circulante, com os devidos ajustes circulatórios a fim de manter a perfusão tecidual e consequente aumento ou redução da excreção renal de água e sódio. Com isso, a maior parte do sódio ingerido, seria prontamente eliminado na urina, mantendo certa constância no conteúdo de sódio e volume corpóreo. Contudo, um estudo realizado durante simulações de voos espaciais, com duração de mais de cem dias contestou tais afirmativas. No estudo com seres humanos, o conteúdo de sódio ingerido era controlado e avaliava-se o montante do íon excretado na urina. A pesquisa mostrou que excreção e retenção de sódio apresentavam-se de forma rítmica e independente da pressão sanguínea ou do peso corporal. (RAKOVA *et al.* 2013). Estes achados reforçaram a hipótese do reservatório de sódio, discutida há mais de 100 anos por Cannon e utilizada posteriormente para tentar justificar o retardo no aparecimento do apetite ao sódio em animais depletados (quando em comparação com o aparecimento da sede que ocorre de forma quase imediata à depleção do LEC). Um destes locais que funcionariam como reservatório são os glicosaminoglicanos presentes na pele. Isto foi analisado inicialmente em modelo animal (TITZE *et al.* 2004) e posteriormente no ser humano através do desenvolvimento de técnicas de imagem, onde demonstraram que o acúmulo de sódio no “reservatório” da pele aumenta com a idade em ambos os sexo, mas nos homens este conteúdo é maior do que nas mulheres, e ainda maior em pacientes com hipertensão quando comparados a pessoas saudáveis (KOPP *et al.* 2013). Tais descobertas recentes têm provado que se faz necessária uma mudança dos paradigmas atuais acerca da dinâmica do balanço de água e sódio (TITZE 2014; HOFMEISTER *et al.* 2015).

2.3 Sistema Renina Angiotensina Aldosterona

A depleção do volume do líquido extracelular é um importante estímulo que tem a capacidade de acionar respostas simpáticas e neuroendócrinas. Experimentalmente, isto pode ser feito através do uso de substâncias colóides inertes (STRICKER & JALOWIEC, 1970),

diálise peritoneal (FALK & LIPTON, 1967); ou uso isolado de diuréticos como a furosemida (SUSAN *et al.* 1981; SMITH *et al.* 2007) ou associados à dieta pobre em sódio (JALOWIEC, 1974). Todas essas abordagens produzem um déficit de sódio que leva à depleção do LEC (hipovolemia). Quando isto ocorre, há uma redução do volume de sangue circulante, com consequente queda da pressão, isto leva a redução da atividade dos receptores cardiopulmonares e dos barorreceptores localizados no arco aórtico e seio carotídeo. Essas informações são então carregadas até o sistema nervoso central (SNC), causando aumento do tônus simpático e estimulando a liberação de vasopressina pela neuro-hipófise (COWLEY *et al.* 1983). A vasopressina por sua vez atuará sobre receptores V_2 presentes nas células principais do ducto coletor, causando uma maior inserção de aquaporinas do tipo 2 na membrana apical e, por consequência, aumentando a reabsorção de água. Por outro lado, liga-se também aos receptores V_1 presentes na musculatura lisa vascular, causando vasoconstrição. A redução do volume circulante e o aumento do tono simpático atuarão ainda de forma sinérgica sobre os rins, aumentando a liberação da enzima renina pelo aparelho justaglomerular. A renina apresenta função proteolítica, possibilitando assim a clivagem do angiotensinogênio em angiotensina I. Esta por sua vez será convertida no octapeptídeo ANG II através da ação da enzima conversora de angiotensina (ECA), presente em elevadas concentrações nos pulmões. A ANG II apresenta uma variedade de funções biológicas, atuando tanto na periferia quanto no SNC, relacionando-se à regulação da pressão sanguínea, modulação da sede e do apetite ao sódio dentre outras (FITZSIMONS & SIMONS 1969; EPSTEIN, FITZSIMONS, ROLLS 1970; RUIZ-ORTEGA *et al.* 2001). Periféricamente, as ações mais pronunciadas da ANG II são a intensa vasoconstrição nos leitos vasculares e sobre os receptores AT_1 na zona glomerulosa do córtex da adrenal levando à liberação de aldosterona (GANONG *et al.* 1962; WANG *et al.* 1997). Além da ANG II, outros fatores podem estimular sua síntese e liberação, como ACTH e a concentração do íon potássio (AGARWAL & MIRSHAHI 1999). Uma vez liberada, a aldosterona atuará sobre seus receptores mineralocorticoides no néfron, levando a uma maior excreção de potássio e reabsorção de sódio. Além disso, assim como a ANG II, a aldosterona também apresenta propriedades natriorexigênicas, de forma que a ação de ambos parece convergir a fim de aumentar a ingestão de sódio. (J. T. FITZSIMONS *et al.* 1998).

Além dos componentes clássicos deste sistema, mais recentemente diversos novos mediadores foram descobertos, dentre os quais destacam-se a ANG-(1-7) e o receptor para angiotensinas do tipo II (AT_2), que são antagonistas funcionais do SRA clássico em diversas situações (FERRARIO *et al.*, 2014). A ANG-(1-7) é formada a partir da ação da enzima ECA_2 , mas também pode ser formada pela ação da ECA ou endopeptidases sobre a ANG-(1-9). Apesar do possível papel contra-regulatório deste peptídeo, em algumas situações já foi demonstrado que a ANG-(1-7) centralmente pode apresentar atividade similar à da ANG-II (ALZAMORA *et al.* 2002; CHENG *et al.* 2012; SANTOS *et al.* 2003). A ANG-(1-7) tem a capacidade de se ligar ao receptor MAS que se encontra amplamente distribuído no SNC, tendo sido localizado nas regiões rostraventrolateral (RVLM), caudoventrolateral (CVLM), núcleo do trato solitário (NTS) e NPV, dentre outros (BECKER *et al.* 2007). As ações periféricas da ANG-(1-7) encontradas na literatura variam desde a melhora da função cardíaca, vasodilatação e redução da angiogênese até aumento do fluxo renal, bem como da natriurese. Dentre as ações centrais, parece estar envolvida na liberação da vasopressina e facilitação do barorreflexo. (SANTOS *et al.* 2008). De forma que juntamente com os componentes do SRA clássico, parece funcionar como importante componente da integração da homeostase cardiovascular e hidroeletrólítica.

2.4 Sede E Apetite Ao Sódio

A sede pode ser definida como uma sensação subjetiva e, com isso, só poderia ser assim denominada no homem. Contudo, a desidratação é um fenômeno fisiológico observado tanto no homem quanto em outros mamíferos, de forma que todos reagem de maneira semelhante, ao buscar intensamente e consumir fluidos. (STRICKER & VERBALIS, 1988). Da mesma forma, o apetite ao sódio também se apresenta como comportamento motivado e foi observado experimentalmente pela primeira vez na década de 30 por Curt Richter após cirurgia de adrenalectomia, onde os animais não só apresentavam apetite ao sódio, como necessitavam ingerir uma maior quantidade dele para sobreviver (STELLAR 1993; SAKAI 2007). Estes comportamentos apetitivos à água e ao sódio parecem estar altamente conservados filogeneticamente, de modo que diferentes espécies respondem de forma semelhante à administração de substâncias que evocam estes comportamentos, como a ANG II (FITZSIMONS, 1998). Para a gênese destes padrões, entretanto, é necessário que ocorra intensa integração de sinais periféricos e centrais a fim de evocar as respostas necessárias. Para isso, o SNC deve receber informações sobre a osmolaridade do LEC, a concentração de sódio, sensação gustativa, de volume e de pressão, que serão enviados para outras áreas encefálicas, relacionadas ao processamento e execução das respostas simpática, neuroendócrinas e comportamentais necessárias à manutenção da homeostase. Algumas destas áreas podem ser observadas na figura abaixo.

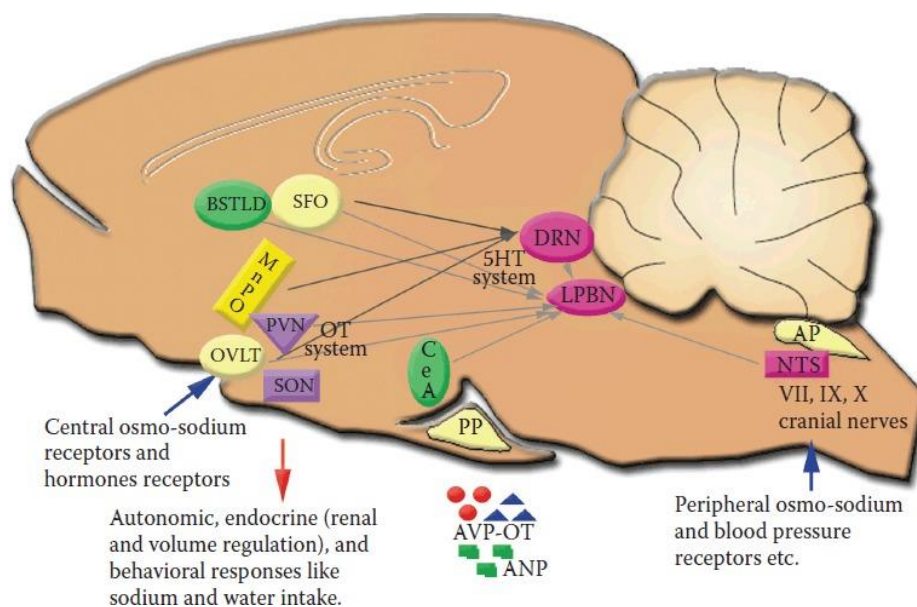


Figura 1. Esquema representativo do circuito neural envolvido na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico (VIVAS et al. 2014).

Experimentalmente, pode-se aumentar a osmolaridade plasmática através da administração de substâncias que não cruzam livremente a membrana celular, como o cloreto de sódio. A desidratação celular causada pela elevação da osmolaridade é capaz de ativar mecanismos centrais que provocarão o comportamento de buscar e ingerir água. Tais mecanismos dependem diretamente da captação de sinais realizado por estruturas denominadas osmorreceptores, termo cunhado na década de 40, estando relacionado inicialmente à secreção de vasopressina (VERNEY, 1947). Mais tarde, evidências experimentais levaram à conclusão de que tais estruturas estariam localizadas na região anteroventral do terceiro ventrículo cerebral (AV3V), onde seriam influenciados pela tonicidade do LCR e principalmente pelo conteúdo de sódio ali presente (ANDERSSON, 1978). Estudos posteriores utilizando técnicas de lesão

tecidual, estudos eletrofisiológicos e expressão de c-Fos confirmaram que os osmorreceptores estariam localizados nos órgãos circumventriculares, as duas estruturas da lâmina terminal, OVLT, OSF e a AP, uma estrutura bulbar. Os osmorreceptores são células capazes de detectar mudanças na pressão osmótica e traduzi-las em sinais que serão enviados a regiões centrais, responsáveis pelo balanço osmótico. Periféricamente, existem células com função osmorreceptora localizadas na veia porta hepática, um dos locais iniciais, onde chegam informações acerca do impacto osmótico da ingestão de comida e fluidos (BOURQUE, *et al.* 1994). Seguindo o conceito proposto que caracteriza os osmorreceptores, outras estruturas centrais além do OCVs entrariam nessa classificação, incluindo o núcleo préóptico mediano (MnPO), que apesar de não ser uma estrutura desprovida de BHE, também é fortemente ativada por estímulos osmóticos, assim como os outros núcleos que compõem a lâmina terminal. De forma semelhante, estudos eletrofisiológicos demonstraram que as células secretoras magnocelulares do NSO são excitadas por estímulos hiperosmóticos, e inibidas por estímulos hiposmóticos. Nos últimos anos, foi possível identificar parte do mecanismo relacionados à osmorrecepção em algumas destas áreas e, aparentemente, a família dos receptores vanilóides de potencial transitório (TRPV) está envolvida na transdução dos sinais nos neurônios magnocelulares do NSO (SHARIF NAEINI *et al.* 2006), OVLT (CIURA & BOURQUE 2006), e na circulação hepática (LECHNER *et al.* 2011). Neurônios do OVLT enviam ainda projeções para o NSO, de modo a estimular a secreção de AVP pelas células magnocelulares em resposta a desafios a homeostase como a desidratação (MCKINLEY, HARDS, & OLDFIELD, 1994).

Como discutido anteriormente, a ANG II apresenta forte capacidade dipsogênica que está ligada principalmente a sua ação no SNC e não na periferia (FITZSIMONS & SIMONS 1969; EPSTEIN, FITZSIMONS, ROLLS, 1970; SHARPE & SWANSON, 1974). O MnPO apresenta alta densidade de receptores AT₁ apesar de não estar sujeito aos níveis circulantes de ANG II, uma vez que não mantém contato com o LCR; por isso, possivelmente este seria um dos componentes de uma via central angiotensinérgica. Esta hipótese é reforçada pelo fato de ser possível bloquear o comportamento de ingestão de água a partir do bloqueio farmacológico com antagonistas angiotensinérgicos administrados por via intracerebroventricular (ICV). Ademais, por receber projeções do OSF e OVLT, o MnPO poderia atuar como uma região integrativa das informações vindas dos osmorreceptores e informações viscerais vindas da periferia via tronco cerebral. Embora muito se tem avançado nas últimas décadas, algumas dúvidas essenciais ainda permanecem acerca da gênese do comportamento dipsogênico. Por ser um componente altamente preservado na escala evolutiva, o circuito pode envolver diversas outras áreas pouco discutidas. De fato, a região da lâmina terminal possui papel de destaque, contudo os neurônios que a compõem se projetam para outros núcleos, como o NPV, a área hipotalâmica lateral (LHA), e substância cinzenta periaquedutal, o que pode representar uma importante integração entre o balanço hidroeletrólítico e outras funções essenciais à sobrevivência.

De forma convergente, as estruturas da lâmina terminal estão envolvidos na gênese do apetite ao sódio (MnPO, OSF e OVLT). Além da capacidade de detectar diferenças na pressão osmótica, células presentes em algumas dessas regiões conseguem também detectar alterações específicas no conteúdo de sódio extracelular. Estas células apresentam um tipo especial de canal para sódio, capaz de detectar alterações em seu conteúdo (canais Na_x), estes canais parecem estar distribuídos em regiões restritas no SNC, dentre elas, destacam-se OSF e OVLT, onde o primeiro, parece ser o principal responsável pela detecção do conteúdo de sódio (WATANABE *et al.* 2000; WATANABE *et al.* 2002; NODA & HIYAMA, 2005).

Como já citado, estas áreas possuem também uma densidade relevante de receptores para ANG II. O OSF em especial, apresenta uma elevada densidade de receptores AT₁. Com

isso, cerca de 70% dos neurônios desta área funcionam como células-alvo da ANG II circulante. Mais tarde, foi demonstrado que a expressão de RNAm do receptor AT1 aumenta significativamente em ratos submetidos a uma dieta pobre em sódio durante quatro dias (MECAWI *et al.* 2013). Ademais, o bloqueio farmacológico da ECA em diferentes modelos experimentais demonstrou o importante papel da ANG II central, mas não a periférica, para a gênese do comportamento apetitivo ao sódio. Enquanto altas doses periféricas de captopril (um bloqueador da ECA) eram capazes de inibir o apetite ao sódio, baixas doses da droga geravam os comportamentos apetitivos ao sódio e à água. Foi proposto então que em baixas doses, ocorria somente a inibição periférica da ECA, aumentando os níveis da ANG I, que ao chegar ao SNC seria convertida em ANG II (MOE *et al.* 1984). Em pesquisa mais recente, foi demonstrado que células dos OCVs possuem a capacidade de captar a ANG I circulante e convertê-la em ANG II (FRY & FERGUSON, 2007).

O OSF apresenta também diversas conexões com outras áreas encefálicas, dentre elas o NDR, importante estrutura envolvida no apetite ao sódio. Estudos neuroanatômicos sugeriram a existência de projeções angiotensinérgicas originadas no OSF dirigidas ao NDR (LIND *et al.* 1984). Posteriormente, foi demonstrado que grande parte dos neurônios do OSF que respondem à ANG II administrada centralmente, de fato, projetam-se para o NDR (TANAKA *et al.* 1998). O papel excitatório que a ANG II apresenta em modelos de privação de água ou sódio envolveria então o sistema serotoninérgico, representados tanto pelo NDR, quanto pelo NPBL como sugerem evidências experimentais (BADAUÊ-PASSOS *et al.* 2007; COLOMBARI *et al.* 1996; FRANCHINI *et al.* 2002). Assim, quando um indivíduo é submetido a uma sobrecarga de sódio ou quando, após uma depleção ocorre ingestão de sódio, as informações sobre a alteração de volume e níveis natrêmicos chegam ao NDR, que por sua vez libera 5-HT (5-hidroxitriptamina - serotonina) no NPBL, gerando sinais inibitórios que cessarão o consumo de sódio, a fim de evitar alterações significativas no compartimento extracelular. (FRANCHINI *et al.* 2002; GODINO *et al.* 2007).

Neurônios serotoninérgicos dos núcleos da rafe mesencefálica emitem e recebem ainda fibras de núcleos específicos do SNC, relacionados ao controle neuroendócrino, eletrolítico e cardiovascular (AZMITIA & SEGAL, 1978; DOROCIC *et al.* 2014). Nesse contexto, ratos submetidos à administração de drogas que estimulam a neurotransmissão serotoninérgica (agonistas 5-HT_{2A/2C}, liberadores ou inibidores da receptação de serotonina) apresentam uma inibição seletiva no apetite ao sódio (NEILL & COOPER, 1989). Ainda, fêmeas depletadas de sódio ou controle, quando tratadas agudamente com liberadores de serotonina, exibem uma redução dramática na ingestão de salina hipertônica (ROUAH-ROSILIO *et al.* 1994). Esses dados reforçam a hipótese de que a transmissão serotoninérgica exerce uma inibição tônica da ingestão de sódio. Em relação ao sistema serotoninérgico, nossos estudos têm avaliado a hipótese de que o sistema, ao nível do NDR, seria um dos principais mecanismos responsáveis pela sinalização da saciedade ao sódio. Evidências experimentais obtidas nestes estudos corroboram tal hipótese, uma vez que ratos submetidos à lesão do NDR (eletrolítica ou com ácido ibotênico) apresentaram um consumo excessivo de solução de salina hipertônica (OLIVARES *et al.* 2003; CAVALCANTE-LIMA *et al.* 2005a, 2005b;). Além disso, outros trabalhos indicam que a depleção de sódio diminui a atividade dos neurônios serotoninérgicos presentes no NDR – evidenciado por imunohistoquímica da proteína nuclear Fos (Fos-ir) – enquanto seu consumo induzido aumenta a atividade desses grupamentos neuronais (FRANCHINI *et al.* 2002; GODINO *et al.* 2007). Adicionalmente, estudos eletrofisiológicos *in vivo* com sobrecarga de sódio corporal (NaCl 2 M, via subcutânea) mostraram que a frequência de disparo dos neurônios do NDR aumenta significativamente durante este desafio quando em comparação com os animais infundidos com solução de salina isotônica (GODINO *et al.* 2013). Deste modo, a atividade do sistema serotoninérgico do NDR seria modulada pela natremia do indivíduo,

diminuindo em estados de deficiência de sódio e aumentando durante a restauração de seus níveis ou durante uma sobrecarga de sódio, o que reforça o papel inibitório do sistema serotoninérgico sobre o apetite ao sódio.

2.5 Sódio E Regulação Cardiovascular

Como já foi citado, o sódio é de suma importância também para a regulação cardiovascular, pois permite a manutenção do volume circulante, possibilitando adequada perfusão tecidual, dentre outras funções. Desta forma, as áreas de controle central da homeostase cardiovascular devem relacionar-se com aquelas que controlam a homeostase do sódio. Neste contexto, o núcleo do trato solitário (NTS) representa uma região importante, onde, através dos nervos cranianos chegam informações acerca do volume circulante, do status osmótico do indivíduo e sinais detectados pelos barorreceptores. Já foi demonstrado que neurônios do NTS apresentam um aumento de sua atividade quando animais depletados de sódio têm acesso a solução salina hipertônica (fase consumatória ou de saciedade do apetite ao sódio), mas não são ativados durante a fase apetitiva ao íon. Desta forma, o NTS parece ser uma importante região para a integração da homeostase cardiovascular e hidroeletrolítica. A partir de onde, a informação gerada pode ser transmitida para diversas regiões do SNC, dentre elas, estruturas bulbares envolvidas na homeostase cardiovascular como as regiões do RVLM e CVLM do bulbo, e estruturas envolvidas na regulação do apetite ao sódio, como o LPBN e DRN e outras áreas relacionadas a homeostase hidroeletrolítica como SON e PVN e a região AV3V. (ANDRESEN & KUNZE, 1994; SAWCHENKO & SWANSON, 1981). De forma semelhante, a região AV3V contém neurônios que também enviam projeções de forma direta ou indireta para áreas relacionadas ao controle da pressão arterial como o NTS e RVLM.

Dentre as áreas importantes para esta integração podemos destacar ainda o OSF, que além de receber diversos estímulos como outros OCVs, se comunica também com outras áreas que compõem circuitos essenciais à homeostase hidroeletrolítica e cardiovascular como os sistemas serotoninérgico, vasopressinérgico, ocitocinérgico e angiotensinérgico. Sendo que este último é um dos principais sistemas relacionados a alterações na homeostase cardiovascular que culminam com diversas doenças como a hipertensão arterial. O principal produto do SRA, a ANG-II está relacionada tanto ao controle da função cardiovascular quanto dos fluidos corporais, agindo sobre os vasos sanguíneos, hemodinâmica renal e sistema endócrino. De forma semelhante, seu receptor AT_1 é o responsável por seus efeitos fisiológicos mais relevantes, ou seja, o aumento da pressão arterial e a gênese do comportamento dipsogênico. Contudo, outros componentes não clássicos de SRA como a ANG-(1-7) e seu receptor MAS parecem estar envolvidos também na regulação da homeostase cardíaca e hidroeletrolítica (SANTOS *et al.* 2008). Embora ainda seja difícil chegar a um consenso acerca das alterações cardiovasculares induzidas pelo aumento do consumo de sódio, os componentes do SRA parecem ser fortes candidatos na conexão entre as alterações da homeostase hidroeletrolítica e cardiovascular (BATUMAN, 2012; LIMA *et al.* 2007; SANADA *et al.* 2011)

3 JUSTIFICATIVA

O apetite ao sódio representa um comportamento essencial à sobrevivência dos mamíferos. Contudo, nos últimos anos diversos trabalhos têm discutido a relação entre o alto consumo de sódio e alterações deletérias ao indivíduo como a hipertensão arterial (BATUMAN, 2012; DAHL, 2005; JACKSON, 1991). Apesar de ser uma área intensamente estudada, pouco ainda se sabe acerca da ligação real entre o consumo de sódio elevado e alterações na homeostase cardiovascular. Além disto, descobertas recentes acerca da dinâmica do balanço do sódio em roedores e no homem tornam necessário que se analise certos achados sob uma nova perspectiva (HOFMEISTER *et al.* 2015b; KOPP *et al.* 2013; SCHAFFLHUBER *et al.* 2007; TITZE, 2015; TITZE *et al.*, 2004). Desta forma, neste trabalho submetemos os animais a diferentes condições que desafiam a homeostase do sódio a fim de analisar mais detalhadamente as alterações geradas e a possível ligação entre elas.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Neste projeto pretendemos estudar o perfil funcional das alterações induzidas por diferentes protocolos experimentais que desafiam a homeostase do sódio.

4.2 Objetivo Específico

Especificamente, ratos Wistar machos e randomicamente subdivididos em 4 grupos experimentais (i) controle (CTRL); ii) dieta pobre em sódio (DP); iii) dieta hipossódica associada à depleção de sódio com furosemida (FURO); iv) sobrecarga salina (SS), foram estudados para:

- a) Verificar o comportamento de sede e apetite ao sódio verificados através da ingestão de fluidos;
- b) Investigar as alterações eletrolíticas (osmolalidade, Na^+ e K^+ urinário e plasmático e hematócrito) nos diferentes modelos;
- c) Traçar o perfil das alterações hemodinâmicas e autonômicas causadas pelos quatro dias de tratamento;
- d) Determinar as alterações moleculares ocorridas em áreas encefálicas envolvidas com o equilíbrio hidroeletrolítico

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Apreciação Bioética Da Experimentação Animal

Antes de qualquer procedimento experimental, este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFRRJ (sob número 005-2015), sendo assim adaptados às recomendações do mesmo, encontrando-se em consonância com a legislação vigente. Foram utilizados ratos Wistar machos adultos (90 dias de vida) provenientes do Biotério setorial do DCFis UFRRJ, mantidos em caixas coletivas (contendo quatro animais por caixa), em ambiente com temperatura controlada de $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$, sob ciclo claro-escuro de 12/12 horas, com livre acesso à água e ração.

5.2 Grupos Experimentais

Em todos os experimentos foram estudados quatro grupos experimentais:

Grupo controle (CTRL): Animais com livre acesso à ração normossódica (0,4% Na^+), água filtrada e solução de NaCl 1,8% (0,3 M). Este grupo possui livre escolha entre beber água ou salina hipertônica.

Dieta pobre em sódio (DP): Animais com livre acesso à ração hipossódica (0,03% Na^+) e água destilada durante 4 dias. Este grupo tem o objetivo de induzir o apetite ao Na^+ sem causar hiponatremia, como demonstrado por MECAWI *et al.* (2013)

Furosemida (FURO): Animais com livre acesso à ração hipossódica (0,03% Na^+) e água com furosemida (20mg/kg/dia) durante 4 dias. A furosemida é uma potente substância diurética/natriurética que atua no ramo ascendente espesso da alça de Henle, inibindo o cotransportador de sódio potássio e cloreto ($\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ -NKCC) localizado na membrana luminal. Com isso, este grupo tem o objetivo de induzir o apetite ao Na^+ e hiponatremia como demonstrado por BADAUÊ-PASSOS *et al.* (2007).

Sobrecarga salina (SS): Animais com livre acesso à ração normossódica (0,4% Na^+) e solução de NaCl 1,8% durante 4 dias. Este grupo tem o objetivo de causar aversão ao Na^+ como demonstrado por VENTURA *et al.* (2005)

5.3 Protocolos Experimentais

5.3.1 Avaliação em gaiola metabólica

Os animais foram alocados em gaiolas metabólicas para adaptação durante dois dias (com acesso à água filtrada, salina 1,8% e ração padrão). No dia seguinte iniciou-se avaliação diária por um período total de cinco dias. Foram avaliados a ingestão de ração e fluidos, ganho de peso e excreção urinária durante os cinco dias. Ao término do quarto dia foram oferecidos dois bebedouros graduados (contendo água e salina 1,8%) para o teste de livre escolha com o objetivo de avaliar as respostas de apetite, aversão e preferência pelo sal como descrito por (MECAWI *et al.*, 2013). As avaliações foram realizadas de 30 min a 4 horas. O índice de preferência foi calculado a partir da razão entre o volume ingerido de salina e o volume total ingerido [salina / (água + salina)]. Ao final do experimento cada grupo totalizou um número de

5.3.4 Registro dos parâmetros cardiovasculares

A cânula posicionada na artéria foi utilizada para registro da pressão arterial pulsátil e frequência cardíaca através de sistema de aquisição de dados (modelo AECAD, AVS projetos, São Carlos, SP, Brasil). A cânula posicionada na veia femoral foi utilizada para administração de substâncias com efeitos conhecidos sobre a pressão arterial (fenilefrina - agonista α -adrenérgico e nitroprussiato de sódio – doador de óxido nítrico, ambos nas concentrações de 2, 10 e 50 $\mu\text{g/mL}$; sendo administrado 0,1 mL por animal), a fim de verificar a resposta barorreflexa. Finalmente, foi feita administração de solução hiperosmótica (NaCl 18%, 0,18 mL/100 g peso corporal), a fim de verificar as respostas cardiovasculares induzidas por hipernatremia aguda (PEDRINO et al., 2006).

5.4 Técnicas Para Análise De Amostras E Tecidos

5.4.1 Osmolaridade

Para analisar a osmolaridade plasmática e urinária foram utilizadas alíquotas de 10 μl de plasma ou urina analisados em osmômetro de bancada (O S M E T T E IITM, modelo 5005© Precision Systems Inc.). O funcionamento do aparelho se baseia na depressão do ponto de congelamento, que é alterado pela concentração de solutos presente em determinada solução. Após a calibração do aparelho com as soluções padrão a amostra é inserida e a leitura se dá de forma automática em mOsm/Kg de água

5.4.2 Sódio e potássio

A análise de sódio e potássio foi realizada através de fotometria de chama com o fotômetro de chama (modelo MICRONAL b262). A fotometria de chama consiste numa técnica de espectroscopia atômica, onde a amostra a ser analisada é aquecida por uma chama, e ao receber esta energia, os elementos ali presentes se excitam, liberando energia, que será lida pelo aparelho de acordo com o comprimento de onda. Quando as amostras são ricas em potássio, o aparelho emite uma cor azulada, e quando ricas em sódio, a chama se torna amarelada. O plasma foi diluído na proporção de 1:100 e a urina na proporção de 1:200 quando necessário.

5.4.3 PCR em tempo real (q-PCR)

Para realização do RT-qPCR os encéfalos foram cortados em criostato em seções de 60 μm (Leica Biosystems, CM1520) e utilizando uma agulha de aço inoxidável (1mm de diâmetro) foram feitos “punches” seriados do núcleo PVN. Os “punches” foram então armazenados em tubos eppendorf contendo 1 mL do reagente QIAzol® (QIAzol®, QIAGEN Cat N° 79306). As amostras foram armazenadas em -80°C até a extração do RNA. O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as instruções do fabricante. A quantificação foi realizada através de um espectrofotômetro NanoDrop 2000c (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). A qualidade e integridade do RNA isolado foi confirmada por eletroforese em gel de agarose (1,2%) com o corante GelRed (Uniscience, São Paulo, Brazil). A síntese de cDNA foi feita a partir de 500ng do RNA total, utilizando o kit “high-capacity cDNA reverse transcription” (Applied Biosystems, USA, Foster City, CA). O RT-qPCR foi realizado com o equipamento “Applied Biosystems 7500 real-time PCR” com desnaturação a 95°C por 10 min durante o primeiro estágio, seguida pelos processos de desnaturação (95°C por 15s) e anelamento/extensão (60°C por 1min) para 40 ciclos de

amplificação no segundo estágio. Para amplificar os transcritos gênicos utilizamos primers Taqman pré-sintetizados para cada gene (Applied Biosystems). Água foi utilizada em vez de cDNA como controle negativo e β -actina foi utilizada como gene controle para normalizar as reações. A quantificação relativa foi determinada pelo método $\Delta\Delta C_t$. Para cada amostra, o ciclo limiar (threshold cycle - C_t) foi determinado e normalizado pelo controle interno ($\Delta C_t = C_t$ desconhecido - C_t gene referência). Para calcular a razão relativa da abundância dos transcritos de cada gene em relação à abundância de transcritos na amostra de referência foi aplicada a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$, ($\Delta C_t = C_t$ desconhecido - C_t controle) que parte do princípio que a cada ciclo da PCR a quantidade de produto dobra, sendo então necessário contemplar que o ganho de cada ciclo (2 vezes) seja elevado à potência do inverso de $\Delta\Delta C_t$.

5.5 Análise Estatística

Foi utilizada a análise de variância de uma (one-way ANOVA) ou de duas vias (two-way ANOVA) e o pós-teste de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0.05$. Todas as análises foram feitas através do software *Graphpad Prism*, v.6.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os dados abaixo relacionados estão descritos como média \pm erro padrão da média. Foram considerados significativos os valores de p menores que 0,05.

6.1 Gaiola Metabólica

6.1.1 Análises diárias da ingestão de fluidos, ração e ganho de peso corporal

O gráfico abaixo representa a ingestão de fluidos durante o período de cinco dias. No primeiro dia todos os grupos tiveram acesso a ração normossódica e dois bebedouros graduados, um contendo água e outro, salina 1,8%. A partir do segundo dia os animais tiveram acesso a diferentes rações e soluções de acordo com o grupo experimental (controle – acesso à água e salina 1,8%; dieta pobre - acesso à água destilada; furosemida – solução de furosemida em água destilada; e sobrecarga salina – acesso somente à salina 1,8%). A ingestão de água pelo grupo furo foi significativamente maior do que a do grupo controle no último dia de avaliação (Furo $22,3 \pm 3,1$ vs. Ctrl $8,8 \pm 0,6$ mL/100g de peso corporal).

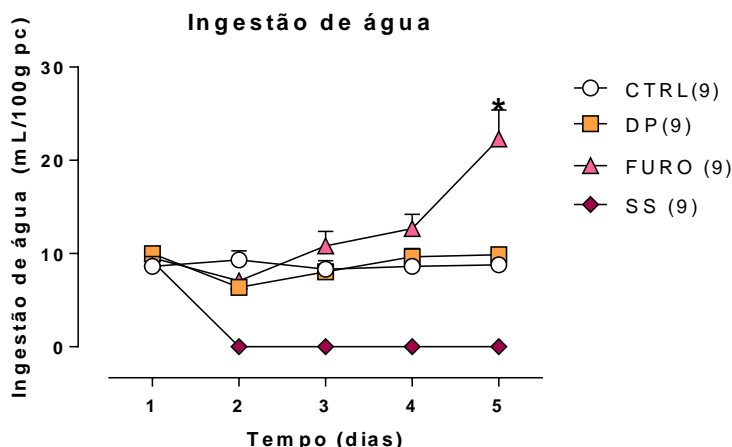


Figura 3. Ingestão diária de fluidos. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * p <0,05 quando em comparação ao Controle.

O gráfico abaixo representa a ingestão diária de salina 1,8% durante os cinco dias de experimento. No primeiro dia todos os animais tiveram acesso à salina hipertônica. A partir do segundo dia somente os grupos controle e sobrecarga salina tiveram acesso à solução salina, por este motivo, os outros grupos não foram considerados na análise estatística. Durante os quatro dias subsequentes a ingestão de salina pelo grupo SS foi significativamente maior que do controle (D1= SS $23,9 \pm 2,3$ vs. Ctrl $2,9 \pm 0,9$; D2= SS $22,6 \pm 2,8$ vs. Ctrl $2,3 \pm 1,4$; D3= SS $26,4 \pm 2,1$ vs. Ctrl $2,5 \pm 0,9$; D4= SS $26,2 \pm 3,2$ vs. Ctrl $2,3 \pm 0,9$ mL/100g pc).

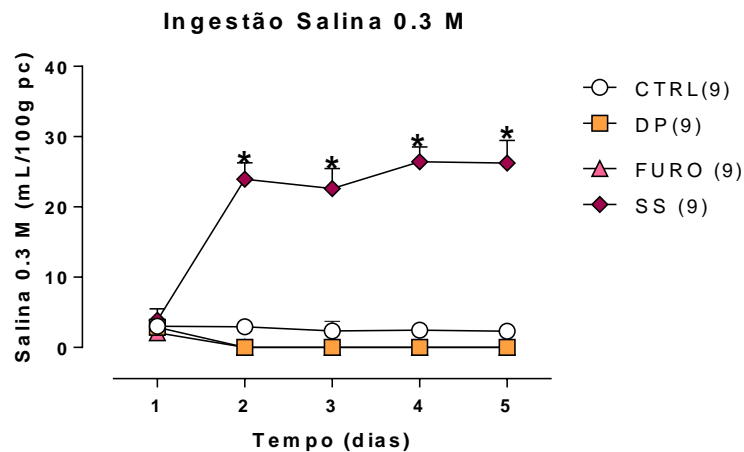


Figura 4. Ingestão diária de salina hipertônica. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao Controle.

Ao final do segundo dia foram separadas as dietas de acordo com o grupo experimental, ou seja, ração normossódica para os grupos controle e sobrecarga salina e ração hipossódica para os grupos dieta pobre e furosemida. A figura 5 mostra a avaliação diária da ingestão de ração, onde, a ingestão do grupo sobrecarga salina foi significativamente menor do que do controle nos últimos dois dias de avaliação (D4 = SS $6,0 \pm 0,3$ vs. Ctrl $9,0 \pm 0,3$; D5 = SS $5,3 \pm 0,8$ vs. $9,3 \pm 0,3$ g/100g pc).

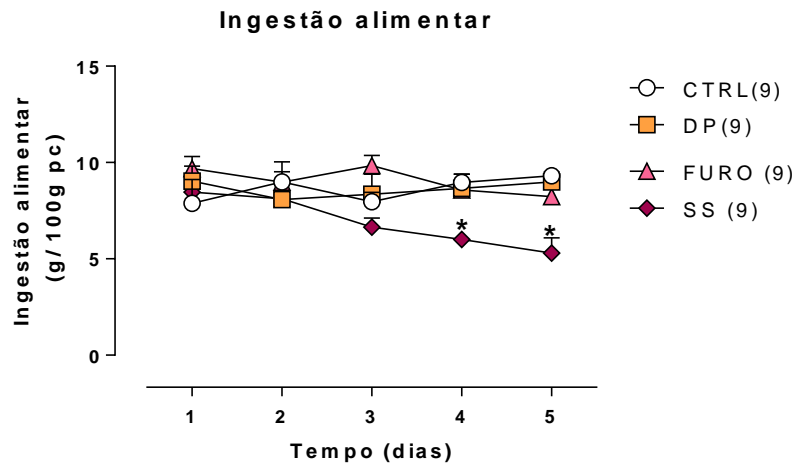


Figura 5. Ingestão diária de ração. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao Controle.

Neste contexto, o ganho de peso dos animais ao longo dos cinco dias de experimento é representado pela figura 6. No terceiro dia de experimento o ganho de peso foi significativamente menor somente no grupo sobrecarga salina quando comparado ao controle (SS $4,8 \pm 3,7$ vs. Ctrl $30,9 \pm 3,8$ g/dia). Após, todos os grupos apresentaram menor ganho de peso quando comparados ao controle, tanto do quarto (DP $21,0 \pm 5,8$; Furo $15,7 \pm 7,7$; SS $9,1$

$\pm 3,8$ vs. Ctrl $41,9 \pm 3,4$ g/dia), quanto no quinto dia (DP $28,9 \pm 5,2$; Furo $19,3 \pm 9,0$; SS $9,0 \pm 5,2$ vs. Ctrl $51,2 \pm 4,9$ g/dia).

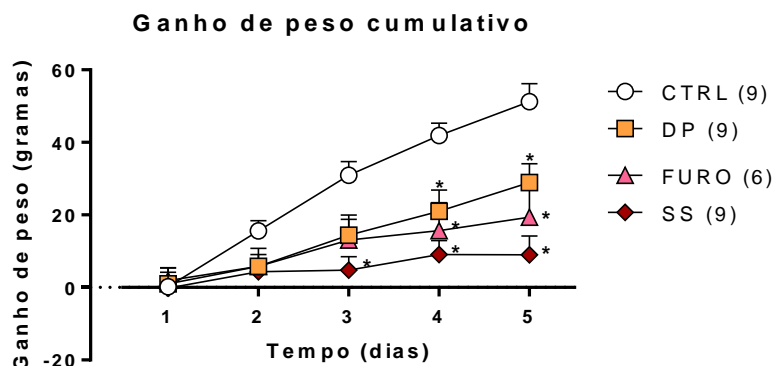


Figura 6. Ganho de peso corporal cumulativo. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao Controle.

Durante a manutenção dos animais em gaiola metabólica a ingestão diária de água (água filtrada, água destilada e água contendo furosemida) foi semelhante nos grupos controle e dieta pobre. Entretanto, no grupo furosemida esta ingestão se tornou maior ao longo dos dias, chegando a ser significativamente diferente do controle no último dia de experimento. Como a furosemida é um potente diurético de alça, causando intensa diurese/natriurese, como consequência o animal sofre uma depleção de sódio e de volume, fazendo com que o animal então passe a buscar sódio e água. Este aumento de ingestão de água no último dia se deve, provavelmente ao efeito farmacológico da furosemida, que somente no último dia chega ao efeito semelhante de quando se administra a droga via subcutânea. Desta forma, no quinto dia de experimentos os sistemas neuroendócrinos relacionados ao balanço hidroeletrólítico são intensamente ativados, de forma a tentar repor a osmolaridade e o déficit de volume circulantes. Com isso, os animais tratados com furosemida apresentariam um aumento da ativação do SRAA (SONKODI et al., 1982). Além disso, o uso de baixas doses de furosemida sem levar à depleção corpórea de íons sódio é capaz de levar ao aumento da liberação de renina (VANDER & CARLSON, 1969). O aumento da liberação de renina poderia então não só aumentar a formação de ANG II periférica, como também da ANG II central, ao aumentar a conversão de angiotensinogênio em ANG I. Como a ANG II tem forte capacidade dipsogênica, esta poderia ser uma das razões que levam os animais a ingerirem mais água mesmo diante do risco crescente de hiponatremia.

O grupo de animais submetidos à sobrecarga salina, apesar de representados graficamente, não foram avaliados neste parâmetro, uma vez que eles só possuíam acesso à solução salina hipertônica. Este grupo apresentou uma ingestão de solução salina 0,3 M muito superior ao seu controle, uma vez que a sobrecarga de sódio eleva a osmolaridade, e com isso induz a sede nestes animais. Como eles só têm acesso à solução salina hipertônica, acabam ingerindo grande volume, na tentativa de repor o déficit. Além disso, conhecidamente, o aumento da osmolaridade é capaz de inibir a ingestão de alimentos, por isso, a ingestão de ração pelo grupo Sobrecarga salina foi menor nos últimos dois dias de experimento (SCHWARTZBAUM. & WARD, 1958). De forma semelhante, o ganho de peso nestes animais também foi menor quando comparados ao controle, uma vez que ingeriram uma menor quantidade de alimento.

6.1.2 Análises do volume urinário, osmolalidade; e conteúdo de sódio e potássio na urina

A figura 6 representa o volume urinário coletado diariamente. A partir do segundo dia de avaliação o volume urinário foi significativamente maior no grupo Sobrecarga salina quando comparado ao controle (D2 = SS $19,6 \pm 2,2$ vs. Ctrl $5,6 \pm 0,6$; D3 = SS $20,1 \pm 2,3$ vs. Ctrl $3,9 \pm 0,4$; D4 = SS $21,3 \pm 2,2$ vs. Ctrl $4,8 \pm 0,5$; D5 = SS $21,4 \pm 2,6$ vs. $5,3 \pm 0,9$ mL/100g pc). O volume urinário do grupo furosemida foi significativamente maior que o controle somente no último dia de avaliação (Furo $17,9 \pm 2,7$ vs. $5,3 \pm 0,9$ mL/100g pc).

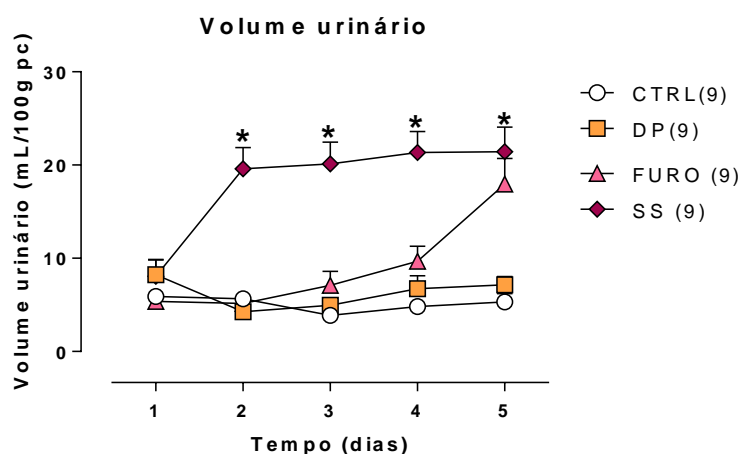


Figura 7. Volume urinário diário. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao Controle.

Ainda, a figura 8 representa a osmolalidade obtida a partir das amostras de urina coletadas diariamente. A partir do terceiro dia de experimento o grupo DP apresentou osmolalidade urinária significativamente menor que o controle, fenômeno que se manteve até o último dia de experimento (D3 = DP $419,5 \pm 63,0$ vs. Ctrl $795,8 \pm 109,3$; D4 = DP $311,11 \pm 17,9$ vs. Ctrl $830,2 \pm 76,3$; D5 = DP $301,8 \pm 38,4$ vs. Ctrl $758,1 \pm 90,9$ mOsm/Kg). De forma semelhante, o grupo Furosemida apresentou menor osmolalidade quando comparado ao controle nos dois últimos dias (D4 = Furo $309,3 \pm 68,2$ vs. Ctrl $830,2 \pm 76,3$; D5 = Furo $227,1 \pm 46,2$ vs. Ctrl $758,1 \pm 90,9$ mOsm/Kg).

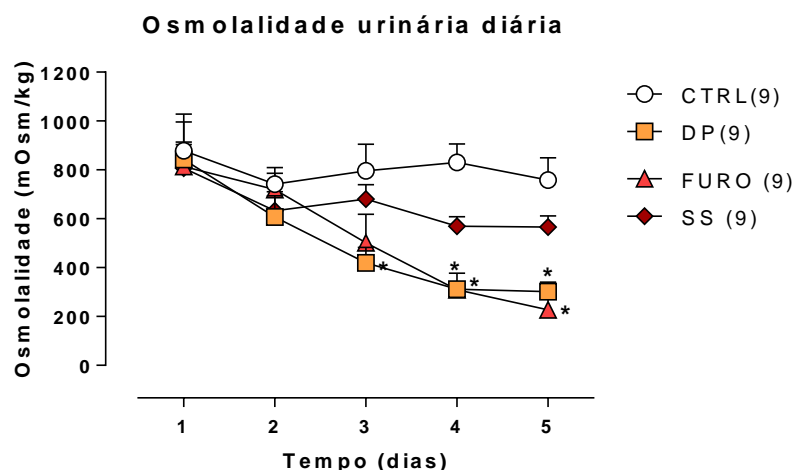


Figura 8. Osmolalidade urinária diária. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao Controle.

A excreção diária de sódio é representada pela figura 9. A excreção urinária de sódio foi semelhante nos grupos furosemida e dieta pobre, não diferindo significativamente do grupo controle ao longo do tratamento. Já o grupo sobrecarga salina apresentou excreção de sódio significativamente superior ao controle a partir do segundo dia ($6,2 \pm 0,9$ vs. $1,9 \pm 0,4$), mantendo este padrão até o último dia ($8,7 \pm 2,5$ vs. $1,7 \pm 0,5$).

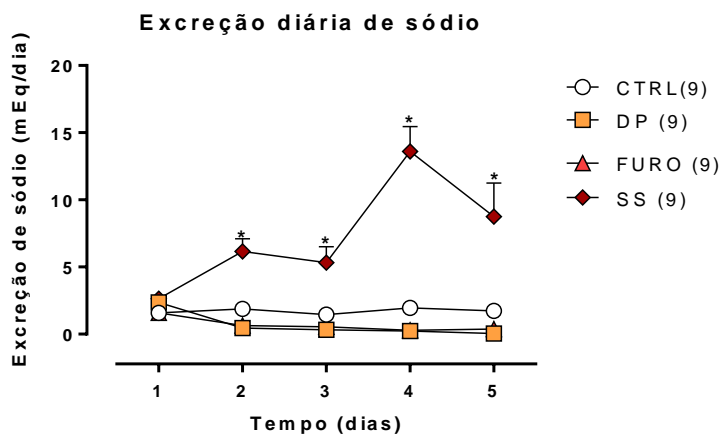


Figura 9. Excreção diária de sódio. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao Controle.

O gráfico seguinte representa a excreção diária de potássio na urina dos animais submetidos à alteração do conteúdo de sódio ingerido diariamente. Não observamos diferenças significativas entre os grupos experimentais (DP $0,6 \pm 0,05$; Furo $0,9 \pm 0,09$; SS $0,7 \pm 0,08$ vs. $0,6 \pm 0,1$).

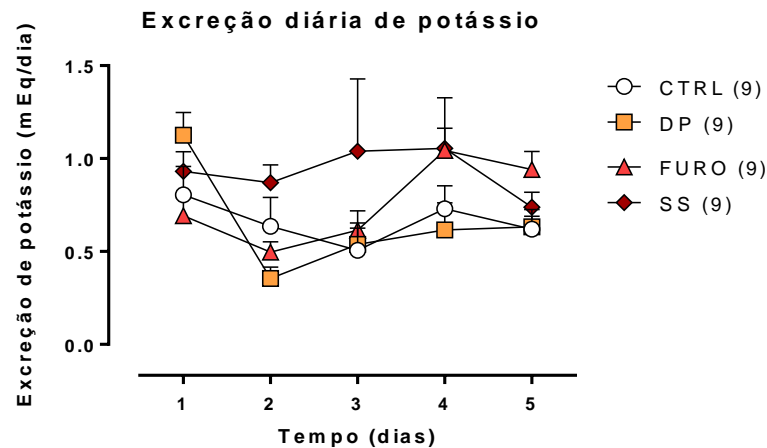


Figura 10. Excreção diária de potássio. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao Controle.

A sobrecarga salina foi capaz de aumentar o volume urinário de forma significativa quando comparado ao controle devido ao aumento da taxa de filtração glomerular causada pela expansão de volume. Este padrão se manteve durante os quatro dias de sobrecarga, devido ao elevado consumo de solução com alta concentração de sódio, alterando o padrão de funcionamento dos rins, o que a logo prazo pode levar ao prejuízo da função renal, principalmente em sujeitos sal-sensíveis (MATAVELLI *et al.* 2007). Enquanto o volume urinário do grupo dieta pobre foi muito semelhante ao controle durante todo o experimento, o grupo furosemida apresentou um aumento progressivo do volume urinário, chegando a diferir significativamente do controle somente no último dia, onde apresentou seu volume máximo. Isto se deve, provavelmente, pela inibição numa maior proporção de transportadores $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}$ devido à maior concentração da droga no sangue. No homem e no cão este processo parece estar bem definido, onde a redução da resistência vascular renal segue com aumento do fluxo plasmático, e conseqüentemente, intensifica a filtração glomerular. Contudo, em roedores os resultados se mostram controversos, podendo envolver a liberação de renina (OPPERMANN *et al.* 2007).

Ao analisarmos a osmolalidade urinária durante os cinco dias, verificamos uma queda progressiva neste parâmetro tanto no grupo Furosemida quanto no grupo Dieta pobre. Contudo, o grupo DP apresentou baixa excreção de sódio, não diferindo, entretanto, do grupo controle; o que vai de encontro a dados da literatura onde ratos wistar foram submetidos à dieta pobre em sódio durante o mesmo período de quatro dias (MECAWI *et al.* 2013). Já o grupo SS apresentou uma excreção de sódio significativamente maior do que o controle, o que já era esperado, uma vez que estes animais têm acesso somente a uma solução salina hipertônica. Além disso, a excreção urinária de potássio foi semelhante entre todos os grupos experimentais. Por outro lado, o grupo furosemida também não apresentou maior excreção de sódio. Possivelmente, isto ocorreu devido à baixa ingestão de sódio pelo grupo Furosemida, e a modulação de transportadores NKCC (NA *et al.*, 2003).

6.1.3 Avaliação da ingestão de fluidos e preferência ao sódio após reapresentação

A figura a seguir mostra a ingestão cumulativa de salina hipertônica (0,3 M) após a reapresentação de fluidos. A ingestão de salina hipertônica foi significativamente maior nos grupos furosemda e dieta pobre quando comparados ao controle nos primeiros 30 minutos (DP $2,2 \pm 0,3$ e Furo $2,1 \pm 0,8$ vs. Ctrl $0,04 \pm 0,03$ mL/100g pc) e 1 hora (DP $3,2 \pm 0,5$ e Furo $4,0 \pm 1,1$ vs. Ctrl $0,07 \pm 0,04$ mL/100g pc). O grupo Dieta pobre continuou apresentando ingestão superior ao controle nos tempos de 2 (DP $3,4 \pm 0,5$ vs. Ctrl $0,1 \pm 0,06$), 3 (DP $3,5 \pm 0,5$ vs. Ctrl $0,13 \pm 0,08$ mL/100g pc) e 4 horas (DP $4,1 \pm 0,8$ vs. Ctrl $0,15 \pm 0,08$ mL/100g pc). Já o grupo Furosemda apresentou ingestão significativamente maior do que o grupo controle (2h Furo $6,8 \pm 0,7$ vs. Ctrl $0,1 \pm 0,06$; 3h Furo $7,8 \pm 1,0$ vs. Ctrl $0,13 \pm 0,08$; 4h Furo $8,5 \pm 1,0$ vs. Ctrl $0,15 \pm 0,08$ mL/100g pc) e Dieta pobre nos mesmos tempos (2h Furo $6,8 \pm 0,7$ vs. DP $3,4 \pm 0,5$; 3h Furo $7,8 \pm 1,0$ vs. DP $3,5 \pm 0,5$; 4h Furo $8,5 \pm 1,0$ vs. DP $4,1 \pm 0,8$ mL/100g pc).

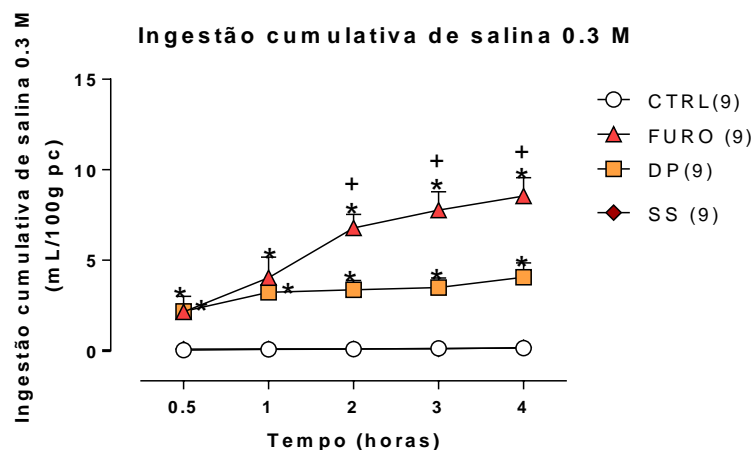


Figura 11. Ingestão cumulativa de salina 0,3 M. O número de animais por grupo encontra-se na figura entre parênteses. *p <0,05 quando em comparação ao Controle e +p <0,05 quando comparado a Dieta pobre.

A figura abaixo representa a ingestão cumulativa de água após a reapresentação de fluidos. O grupo Sobrecarga salina apresentou maior ingestão de água em todos os tempos quando comparado ao Controle (0,5h SS $5,6 \pm 0,52$ vs. Ctrl $0,5 \pm 0,03$; 1h SS $6,1 \pm 0,6$ vs. Ctrl $0,08 \pm 0,05$; 2h SS $6,2 \pm 0,6$ vs. Ctrl $0,2 \pm 0,1$; 3h SS $6,3 \pm 0,6$ vs. Ctrl $0,3 \pm 0,1$; 4h SS $6,5 \pm 0,6$ vs. Ctrl $0,3 \pm 0,1$ mL/100g pc). De forma semelhante, a ingestão de água foi maior nos grupos Furosemda e Dieta pobre nos tempos de 2 (Furo $2,5 \pm 0,8$ e DP $2,2 \pm 0,4$ vs. Ctrl $0,2 \pm 0,1$ mL/100g pc), 3 (Furo $3,0 \pm 0,7$ e DP $2,5 \pm 0,4$ vs. Ctrl $0,3 \pm 0,1$ mL/100g pc) e 4 horas (Furo $3,59 \pm 0,9$ e DP $2,7 \pm 0,4$ vs. Ctrl $0,3 \pm 0,1$ mL/100g pc) após a reapresentação de fluidos.

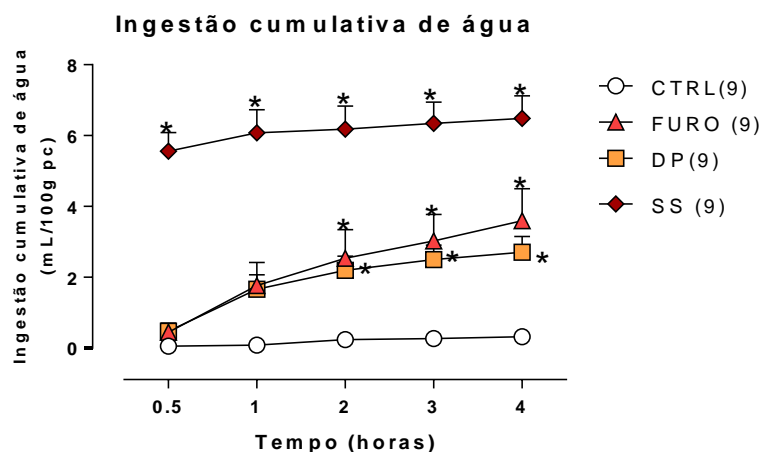


Figura 12. Ingestão cumulativa de água. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao Controle.

A figura 13 representa o índice de preferência por sódio, ou seja, a razão entre o volume de solução salina e o volume total ingerido. O grupo Dieta pobre apresentou preferência pelo sódio maior que o controle em todos os tempos de avaliação (0,5h = DP $75,7 \pm 10,7$ vs. Ctrl $11,1 \pm 7,3$; 1h = DP $67,2 \pm 4,9$ vs. Ctrl $22,2 \pm 12,1$; 2h DP $61,5 \pm 3,3$ vs. Ctrl $19,7 \pm 11,9$; 3h DP $59,1 \pm 2,6$ vs. Ctrl $28,1 \pm 12,1$; 4h DP $60,1 \pm 3,0$ vs. Ctrl $28,5 \pm 12,0$ %). Já o grupo furosemida apresentou preferência maior que do controle nos tempos 0,5 (Furo $44,1 \pm 14,7$ vs. Ctrl $11,1 \pm 7,3$ %); 2 (Furo $76,9 \pm 6,7$ vs. Ctrl $19,7 \pm 11,9$ %); 3 (Furo $72,9 \pm 6,7$ vs. Ctrl $28,1 \pm 12,1$ %) e 4 (Furo $71,9 \pm 5,85$ vs. Ctrl $28,5 \pm 12,0$ %).

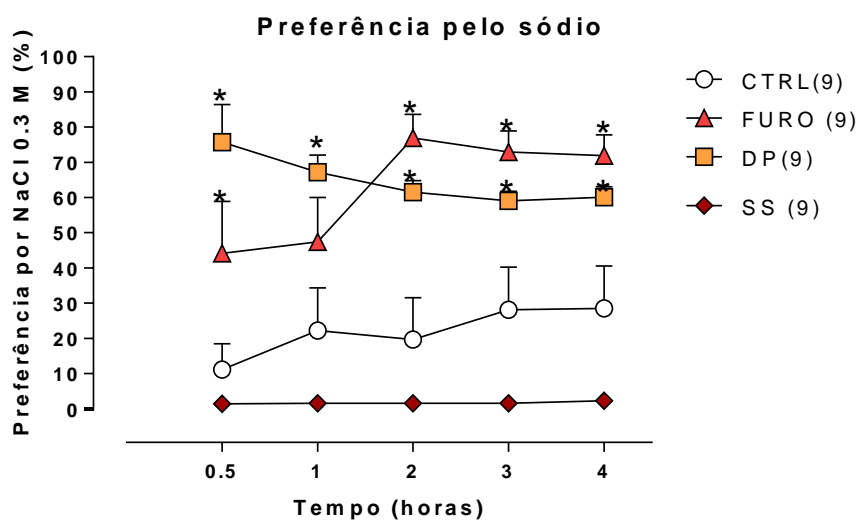


Figura 13. Índice de preferência por sódio. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao controle.

Após os cinco dias de avaliação, ração e bebedouros foram retirados dos animais para reapresentação de fluidos, onde cada animal recebeu um bebedouro graduado contendo água filtrada e outro contendo salina 1,8%. Como era esperado, a ingestão de salina hipertônica foi maior nos animais submetidos à dieta pobre e naqueles tratados com furosemida na água de beber, onde ambos os grupos apresentaram preferência ao sódio, uma vez que estas condições têm a capacidade de estimular específico a este íon (JALOWIEC, 1974; MECAWI *et al.* 2013). De forma similar, a ingestão de água nestes dois grupos foi superior ao controle, formando uma curva semelhante à ingestão de sódio. Uma vez que a osmolalidade precisa ser primeiramente corrigida para que depois possa se manter o volume circulante a ingestão de água se dá como consequência à ingestão inicial de sódio. Enquanto isso, o grupo de animais submetidos à sobrecarga salina apresentou uma ingestão de água muito superior ao controle somada a uma baixa ingestão de sódio. Estes animais provavelmente desenvolveram um comportamento aversivo ao sódio (GREENWOOD *et al.* 2014).

6.1.4 Avaliação da ingestão de fluidos e volume urinário, osmolalidade; e conteúdo de sódio e potássio na urina após reapresentação de fluidos

A imagem a seguir representa o volume urinário cumulativo nos tempos de duas e quatro horas. O volume urinário foi significativamente maior no grupo furosemida quando comparado ao controle (Furo $6,5 \pm 1,6$ vs. Ctrl $1,4 \pm 0,3$ mL/100g pc).

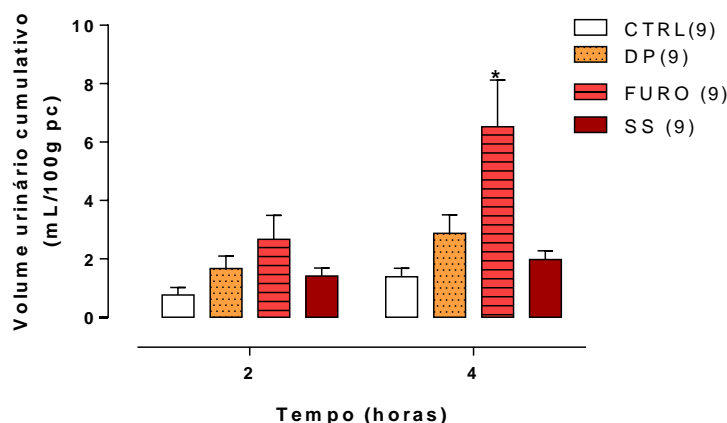


Figura 14. Volume urinário cumulativo. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação a todos os outros grupos.

O gráfico abaixo representa a osmolalidade obtida a partir das amostras de urina coletadas duas e 4 horas após a reapresentação de fluidos. Somente observamos diferenças significativas a partir da terceira hora, onde o grupo Sobrecarga salina apresentou uma menor osmolalidade urinária quando em comparação com o Controle (SS $170,7 \pm 41,3$ vs. Ctrl $384,9 \pm 58,9$ mOsm/Kg).

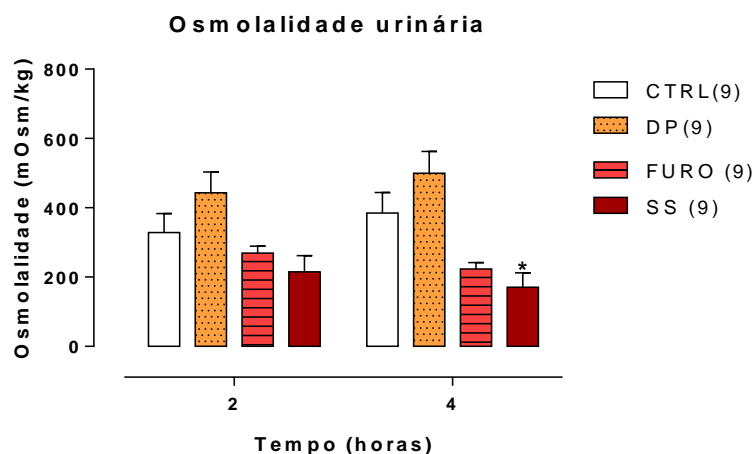


Figura 15. Osmolalidade urinária. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle.

A figura 15 representa a excreção urinária de sódio nos tempos de duas e quatro horas após a reapresentação de fluidos. Observamos diferenças significativas somente no tempo 4 horas no grupo Furo quando comparado ao controle ($1,2 \pm 0,3$ vs. $0,2 \pm 0,04$ mEq/dia).

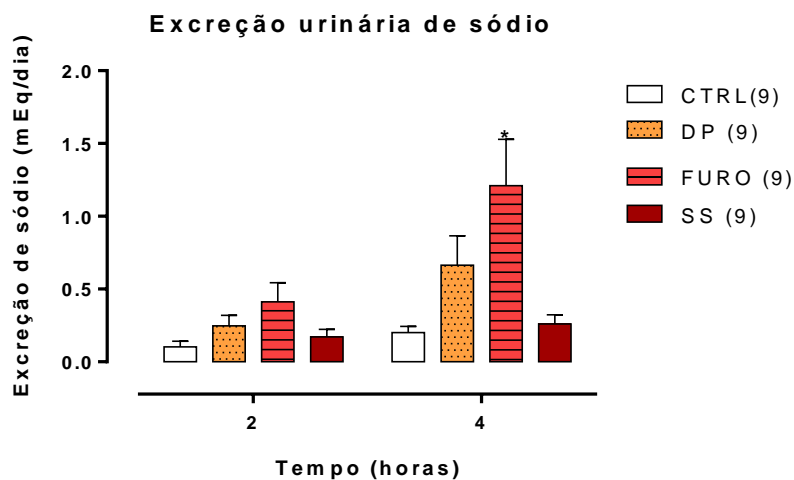


Figura 16. Excreção urinária de sódio após reapresentação de fluidos. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. $p > 0,05$.

O gráfico a seguir representa a excreção urinária de potássio nos tempos de duas e quatro horas após a reapresentação de fluidos. Observamos diferenças significativas somente no tempo de quatro horas nos grupos furosemida e dieta pobre quando comparados ao controle (DP $0,3 \pm 0,05$, Furo $0,3 \pm 0,05$ vs. $0,1 \pm 0,02$).

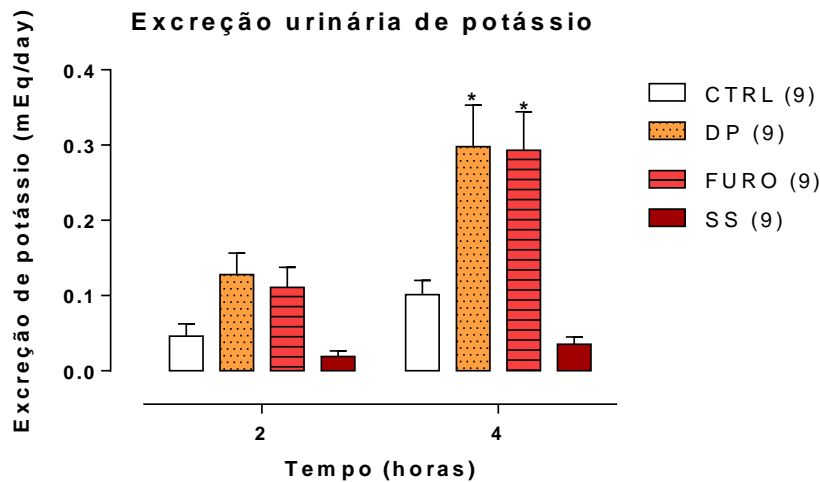


Figura 17. Excreção urinária de potássio após reapresentação de fluidos. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando em comparação ao Controle.

Ao avaliarmos o volume urinário dos animais após a reapresentação de fluidos, notamos diferenças significativas somente ao final das quatro horas de experimento no grupo furosemida quando comparado ao controle. Como os animais têm acesso à água contendo furosemida no início do dia da avaliação, o grande volume urinário provavelmente se deve ao efeito do diurético, somado à alta ingestão de sódio no momento do experimento. A osmolalidade urinária foi significativamente menor no grupo Sobrecarga salina somente na quarta hora de avaliação, não apresentando, entretanto, diferença significativa quando à excreção de sódio. Já no grupo furosemida, a excreção de sódio foi significativamente maior na última hora de avaliação, uma vez que este grupo ingeriu a maior quantidade de salina hipertônica ao longo do experimento. Contudo, a excreção de potássio foi superior ao controle tanto nos grupos furosemida como dieta pobre, provavelmente devido ao maior conteúdo tubular de sódio.

6.2 Parâmetros Plasmáticos Dos Animais Submetidos A Alterações No Conteúdo De Sódio Durante Quatro Dias

A figura 18 representa o hematócrito ao final dos quatro dias de tratamento. Não observamos diferenças significativas entre os grupos tratados e o Controle (DP $46,6 \pm 0,9$; Furo $48,6 \pm 1,2$ e SS $47,4 \pm 0,8$ vs. Ctrl $45,4 \pm 0,5$ %).

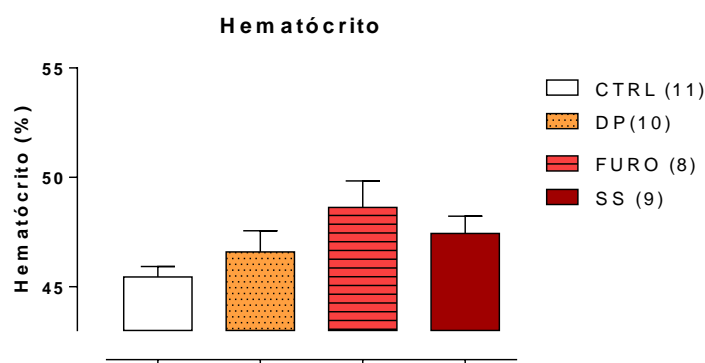


Figura 18. Hematócrito dos animais submetidos a alteração do conteúdo de sódio ingerido ao final de 4 dias de dieta. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ não observamos diferenças significativas.

Também foi avaliada a osmolalidade plasmática após os quatro dias de alteração no conteúdo de sódio da dieta, como pode ser observado na figura 19. Apenas o grupo Sobrecarga salina apresentou aumento significativo quando em comparação ao Controle (SS $293,5 \pm 2,9$ vs. Ctrl $262,3 \pm 2,3$ mOSm/Kg).

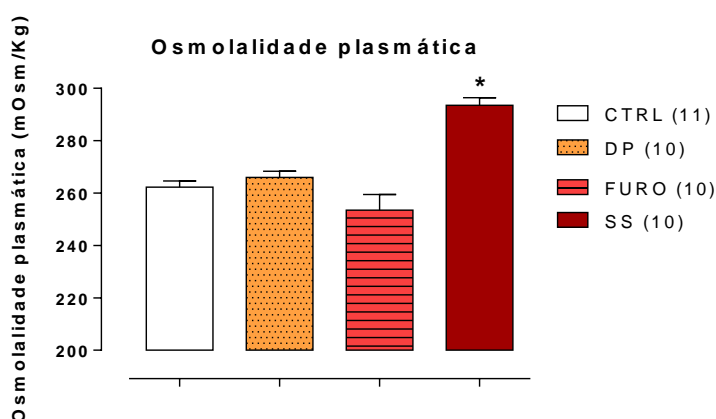


Figura 19. Osmolalidade plasmática. * $p < 0,05$ quando em comparação ao controle, à dieta pobre e ao grupo furosemida.

O conteúdo de sódio plasmático ao final dos quatro dias de tratamento se encontra representado na figura 10. A concentração plasmática de sódio foi significativamente maior nos grupos Sobrecarga salina (SS $163,7 \pm 1,6$ vs. Ctrl $143,2 \pm 0,7$ mEq/L) e Dieta pobre, quando comparados ao Controle (DP $148,7 \pm 1,8$ vs. Ctrl $143,2 \pm 0,7$ mEq/L).

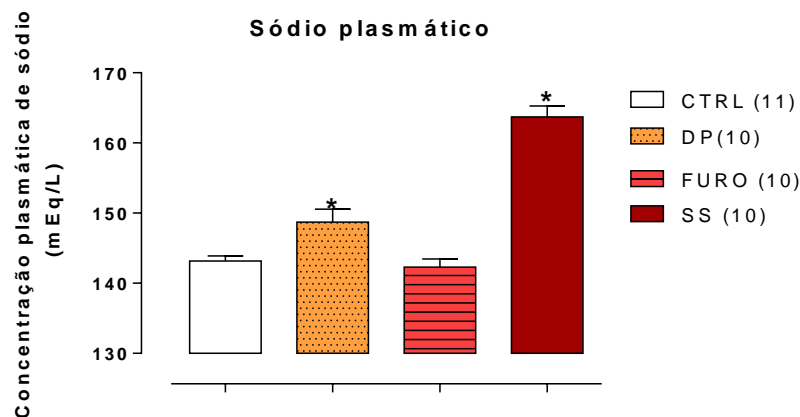


Figura 20. Concentração de sódio plasmático. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle.

Finalmente, a figura 21 representa o conteúdo de potássio plasmático ao final dos quatro dias de tratamento, onde não observamos diferenças estatísticas entre os grupos quando comparados ao controle (DP $11,4 \pm 0,7$; Furo $10,1 \pm 0,3$ e SS $11,7 \pm 0,5$ vs. Ctrl $10,7 \pm 0,3$ mEq/L).

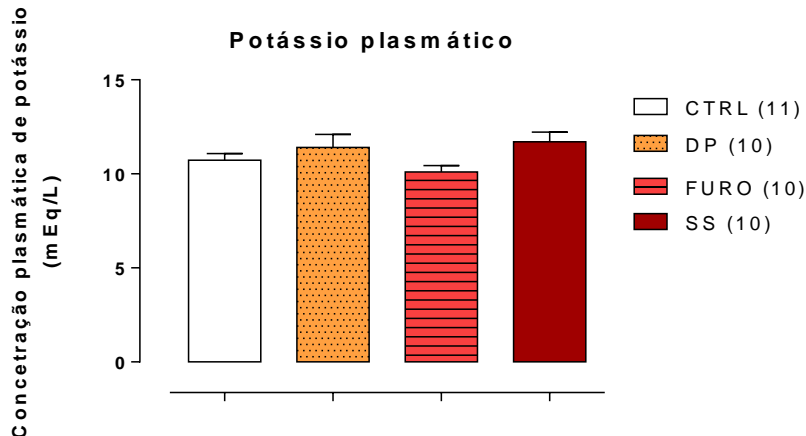


Figura 21. Concentração de potássio plasmático. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle.

Durante a avaliação dos parâmetros plasmáticos, não observamos diferenças significativas entre os grupos, entretanto, vale ressaltar que a diferença entre o número de animais em cada grupo experimental pode ter influenciado este parâmetro, uma vez que durante o processamento, algumas amostras ficaram inutilizadas, impossibilitando a avaliação. Todavia, ao avaliarmos a osmolalidade plasmática, verificamos um aumento significativo no grupo Sobrecarga salina condizente com o desafio ao qual este grupo foi submetido. Os resultados de sódio plasmático, confirmaram o aumento da osmolalidade em função do excesso deste íon no plasma. Entretanto, de forma surpreendente, observamos um maior conteúdo

plasmático de sódio também no grupo Dieta pobre. Uma vez que o volume urinário nestes animais se equipara aos do grupo Controle, aparentemente este resultado significativo não se deve somente ao aumento da retenção renal de sódio causada pela ativação do SRAA e outros mecanismos renais e endócrinos. É possível, que durante esse período de privação, parte do sódio presente no reservatório seja mobilizado, a fim de evitar intensa queda da osmolalidade pelo baixo conteúdo de sódio plasmático (SCHAFFLHUBER *et al.* 2007; TITZE, 2015). Além disso, a furosemida na água de beber durante este período não foi capaz de induzir a hiponatremia, talvez por motivo semelhante ao acima citado. Da mesma forma, as concentrações plasmáticas de potássio permaneceram semelhantes entre todos os grupos.

6.3 Parâmetros Cardíacos Dos Animais Submetidos A Alterações No Conteúdo De Sódio Durante Quatro Dias

O gráfico abaixo representa a pressão arterial média (PAM) obtida nos quatro grupos primeiramente em condições basais; num segundo momento após desafio ao barorreflexo e, finalmente, após desafio osmótico. O grupo furosemida apresentou PAM menor que o grupo controle após a administração de fenilefrina nas concentrações de 10 e 50 µg/mL (Phe10 = Furo 142,6 ± 19,1 vs. Ctrl 222,4 ± 14,2 ; Phe50 = Furo 261,0 ± 74,8 vs. Ctrl 190,9 ± 19,6 mmHg).

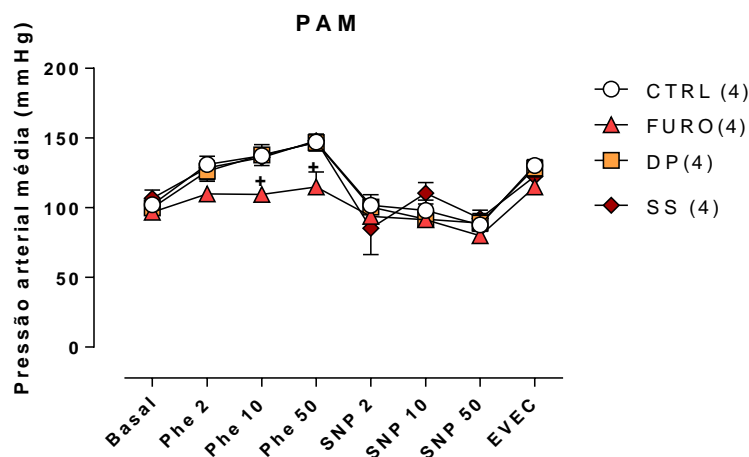


Figura 22. Pressão arterial média em resposta à fenilefrina, nitroprussiato de sódio e expansão de volume hipertônica. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle e outros grupos.

Tabela 1. Valores da frequência cardíaca dos grupos experimentais representados em Média ± EPM.

Frequência Cardíaca (FC) em bpm				
	Controle	Furosemida	Dieta Pobre	Sobrecarga salina
Basal	207,2 ± 7,1	214,5 ± 7,9	198,7 ± 11,1	219,6 ± 5,5
Phe 2	208,7 ± 24,7	156,4 ± 29,5	226,6 ± 28,9	156,8 ± 14,0

Phe 10	222,4 ± 14,2	142,6 ± 19,1	195,5 ± 21,1	162,1 ± 8,4
Phe 50	190,9 ± 19,6	261,0 ± 74,8	183, 3 ± 12,7	164,5 ± 7,7
SNP 2	230,4 ± 2,0	189,0 ± 20,4	217, 7 ± 19,5	202,4 ± 28,1
SNP 10	176,0 ± 12,3	219, 3 ± 28,7	245, 3 ± 16,5	200,0 ± 16,5
SNP 50	187,6 ± 32,3	201,5 ± 28,8	228,6 ± 22,2	254,2 ± 35,0
EVEC	227,1 ± 7,1	204,3 ± 31,4	201, 4 ± 24,8	227,8 ± 2,7

Quanto à avaliação dos parâmetros cardíacos, não observamos diferenças significativas na FC ou PAM entre os grupos sob condições basais. Contudo, sob condições de avaliação da integridade da resposta barorreflexa, o grupo furosemida apresentou uma menor resposta a doses de fenilefrina que conhecidamente elevam a pressão arterial (SMYTH *et al.* 1969). O aumento da pressão arterial pela fenilefrina levaria ao estímulo de pressorreceptores, ocasionando redução reflexa da frequência cardíaca. Todavia, no grupo furosemida isso não parece ocorrer, provavelmente devido à hipovolemia pela perda de fluidos. Contudo, a partir dos resultados observados, é possível que a hipovolemia causada por esta dose de furosemida na água não seja comparável àquela induzida pela administração subcutânea da droga em menor dose. Além disso, ao contrário do que era esperado, a sobrecarga salina neste período não foi capaz de aumentar significativamente a pressão arterial, o que nos leva a crer, que neste curto período, o recrutamento de mecanismos adaptativos é capaz de manter a homeostase do sistema cardiovascular. Isto pode ser inferido, uma vez que experimentos utilizando sobrecarga de sódio por períodos superiores ao deste estudo foram capazes de detectar alterações na PAM e FC e ratos wistar (SANTOS *et al.* 2006).

6.4 Quantificação de mRNA por qPCR

O gráfico abaixo representa a expressão de mRNA de AVP no PVN após os quatro dias de tratamento. A expressão de mRNA foi maior no grupo Sobrecarga salina (SS 2,61 ± 0,16 vs. Ctrl 1,04 ± 0,04 a.u.) e menor no grupo Dieta pobre (DP 0,65 ± 0,07 vs. Ctrl 1,04 ± 0,04 a.u.) quando comparados ao controle.

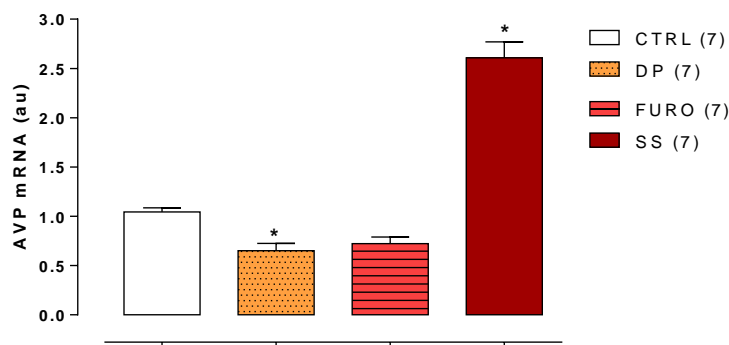


Figura 23. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de AVP. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle.

A figura 24 representa a expressão de mRNA de OT no PVN após os quatro dias de tratamento. De forma semelhante ao resultado anterior, a expressão de mRNA foi maior no grupo Sobrecarga salina (SS $1,52 \pm 0,12$ vs. Ctrl $1,01 \pm 0,05$ a.u.) e menor no grupo Dieta pobre (DP $0,65 \pm 0,06$ vs. Ctrl $1,01 \pm 0,05$ a.u.) quando comparados ao controle.

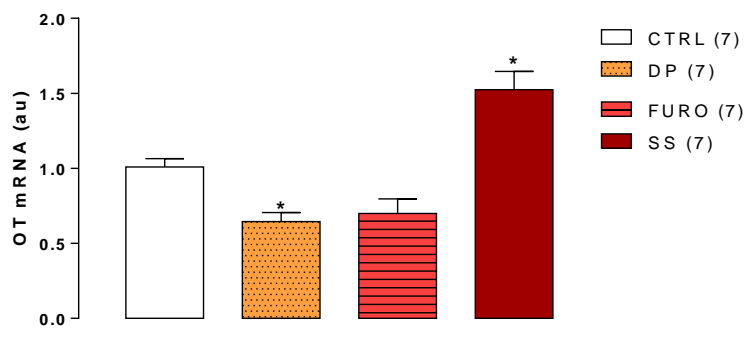


Figura 24. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de OT. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. * $p < 0,05$ quando comparados ao controle.

O gráfico abaixo representa a expressão de mRNA do receptor AT_1 no PVN após os quatro dias de tratamento. A expressão de mRNA foi maior no grupo Sobrecarga salina (SS $2,94 \pm 0,26$ vs. Ctrl $1,14 \pm 0,25$ a.u.) e no grupo Furosemida (Furo $3,08 \pm 0,51$ vs. Ctrl $1,14 \pm 0,25$ a.u.) quando comparados ao controle.

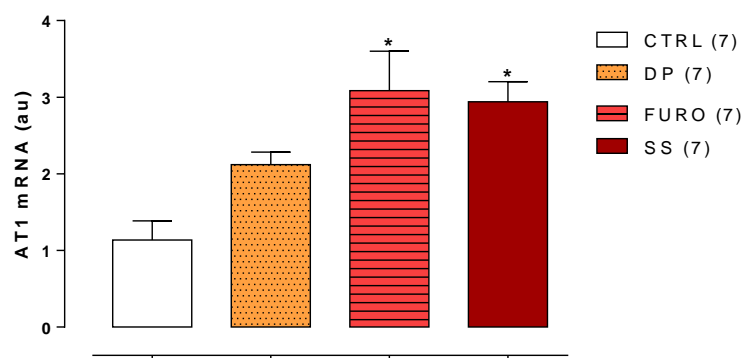


Figura 25. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de AT₁ no PVN. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. *p<0,05 quando comparados ao controle.

A figura abaixo representa a expressão de mRNA do receptor AT₂ no PVN após os quatro dias de tratamento. A expressão de mRNA não apresentou diferenças significativas entre os grupos quando comparados ao Controle (DP 1,75 ± 0,25; Furo 1,30 ± 0,19 e SS 1,58 ± 0,1 vs. Ctrl 1,08 ± 0,2 a.u.).

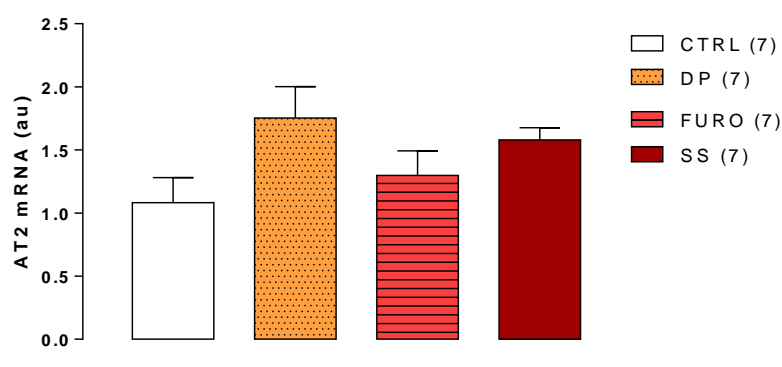


Figura 26. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de AT₂ no PVN. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. p > 0,05.

O gráfico abaixo representa a expressão de mRNA do receptor MAS no PVN após os quatro dias de tratamento. A expressão de mRNA não apresentou diferenças significativas entre os grupos quando comparados ao Controle (DP 0,94 ± 0,04; Furo 1,31 ± 0,10 e SS 1,21 ± 0,10 vs. Ctrl 1,07 ± 0,15 a.u.).

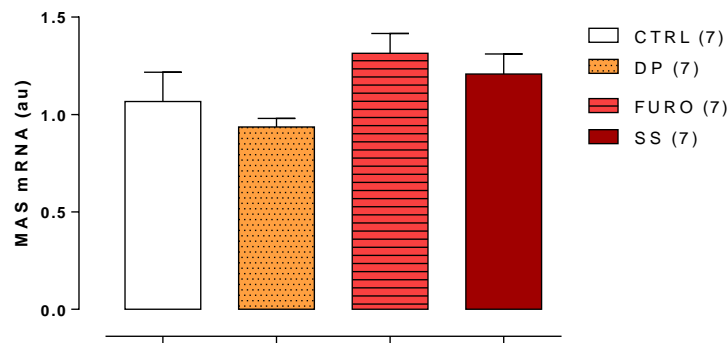


Figura 27. Efeitos da alteração de conteúdo de sódio na dieta por quatro dias sobre a expressão de mRNA de AT_1 no PVN. O número de animais por grupo está escrito na figura entre parênteses. $p > 0,05$.

Por fim, analisamos a expressão de mRNA no NPV dos grupos experimentais e verificamos que a sobrecarga salina foi capaz de elevar significativamente os níveis de mRNA para AVP e OT, o que condiz com dados da literatura, onde o aumento da osmolalidade é capaz de aumentar a liberação e o mRNA de AVP e OT (BALMENT *et al.* 1980; DUNN *et al.* 1973; VENTURA *et al.* 2005). Como os animais submetidos à sobrecarga apresentaram hipernatremia, este estímulo foi suficiente para estimular a liberação e secreção de AVP e OT a fim de aumentar a retenção de água e excreção de sódio. O aumento do mRNA da OT é também um possível mecanismo que envolve a redução da ingestão alimentar e aversão ao sódio (VERBALIS *et al.* 1993).

Por outro lado, a dieta pobre por quatro dias levou a redução da expressão de mRNA de AVP e OT. Neste caso, apesar dos animais submetidos à dieta pobre não apresentarem redução significativa na osmolalidade plasmática a ponto de inibir a secreção de AVP e OT, sua reduzida expressão de mRNA pode espelhar as baixas concentrações de sódio detectadas em algum outro momento pelos sensores para sódio no OSF, levando à inibição de células magnocelulares com objetivo de reduzir a retenção de água, excreção de sódio e talvez, aumentar a mobilização do íon de seu reservatório.

De forma interessante, tanto o grupo Furosemida, quanto o grupo Sobrecarga salina apresentaram um aumento do mRNA para AT_1 , mas não para AT_2 ou MAS. Isto ressalta a importância do SRA central nestes grupos experimentais. De fato, a depleção causada pela furosemida leva ao aumento da produção da ANG II e aldosterona periféricamente. Concomitantemente ocorre aumento da atividade de neurônios do OSF, OVLT, MnPO, NSO e NPV e por fim, aumento da expressão do mRNA para AT_1 (CHARRON *et al.* 2002). Porém, o aumento da expressão do receptor nos animais submetidos à sobrecarga de íons sódio parece controverso, uma vez que a ativação desses receptores pela ANG II está relacionada tanto à ingestão de água e apetite ao sódio. Entretanto, a literatura apresenta dados variados acerca do possível papel do AT_1 sobre a sensibilidade aos níveis de sódio (ENDO *et al.* 2009), de forma que o aumento da expressão destes receptores poderia representar o início de respostas maladaptativas à sobrecarga de sódio, uma vez que neurônios deste núcleo também se projetam para o RVLM (CATO; TONEY, 2005; TAGAWA; DAMPNEY, 1999).

7 CONCLUSÕES

Embora muito se tenha avançado nos últimos anos na área do equilíbrio hidroeletrolítico, muito ainda necessita ser elucidado. Principalmente no que diz respeito à regulação/desregulação do apetite ao sódio e a possível ligação aos casos de hipertensão arterial. Os resultados variados da literatura científica se devem em grande parte ao uso de diferentes linhagens de animais, ao passo que algumas apresentam um padrão sal sensível, outras parecem apresentar resistência à manifestação do fenótipo. Contudo, um ponto em comum parece sobressair em grande parte das pesquisas; assim como verificamos neste trabalho, o envolvimento de sistemas neuroendócrinos como o SRA central e periférico parecem ser pontos chave para a instalação de alterações homeostáticas. Desta forma, o estudo dos componentes destas vias centrais, bem como sua regulação gênica parecem despontar como caminho promissor a fim de responder dúvidas ainda existentes acerca da ligação entre os desequilíbrios da homeostase hidroeletrolítica e alterações cardiovasculares.



FEDERAL RURAL UNIVERSITY OF RIO DE JANEIRO

INSTITUTE OF BIOLOGICAL AND HEALTH SCIENCES
GRADUATE PROGRAM IN PHYSIOLOGICAL SCIENCES

SODIUM APPETITE CHALLENGING PROTOCOLS: HYDROELECTROLYTIC, CARDIOVASCULAR AND MOLECULAR ALTERATIONS

LÍVIA DA ROCHA NATALINO MONTEIRO

Under the supervision of Professor

Luís Carlos Reis

Dissertation submitted in partial fulfilment of the requirements for the degree of Master of Science in *Graduate Program in Physiological Sciences*, Concentration Area in Physiology.

Seropédica, RJ

February 2016

ABSTRACT

MONTEIRO, Livia da Rocha Natalino. **SODIUM APPETITE CHALLENGING PROTOCOLS: HYDROELECTROLITIC, CARDIOVASCULAR AND MOLECULAR ALTERATIONS**. 2016. Dissertation (MS in Physiological Sciences. Institute of Biological and Health Sciences, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropedica, RJ, 2016.

The constant regulation of sodium and water balance is essential for the maintenance of life. From the simplest to the most complex organisms, conservation of such elements at appropriate levels is a vital issue for the homeostasis of the individual. In order to maintain this balance, organisms resort a set of neurohumoral mechanisms that constantly regulate the content of bodily water and sodium. In recent decades, studies of neural mechanisms involved in the regulation of sodium appetite have gained ground since the excessive intake of sodium chloride has been directly related to functional changes which can lead to diseases such as hypertension. Besides the high daily consumption of sodium chloride by occidental societies, there is also a growing number cases of hypertension, particularly the so-called “salt-sensitive”. Therefore, it is necessary that the mechanisms involved in these changes are intensively studied in scientific models. Thus, through the use of an animal model, we investigated in this study the functional changes arising from the modification of this sodium content in the diet of animals. Wistar male rats were randomly divided into 4 groups: i) control (CTRL); ii) low-sodium diet (LSD); iii) furosemide (FURO); iv) sodium overload (SO). From this division, we draw the hydroelectrolytic, cardiovascular and molecular profiles of these paradigms four days after the protocols beginning. We found that low-sodium diet and furosemide were able to induce a sustained sodium appetite 4 hours after reintroduction of fluids when compared to control group (LSD: 4.1 ± 0.8 and FURO: 8.5 ± 1.0 vs. CTRL 0.15 ± 0.08 mL/100g body weight, $p < 0.05$, respectively). Besides we have confirmed the occurrence of hypernatremia in SO group (163.7 ± 1.6 vs. 143.2 ± 0.7 mEq/L, $p < 0.05$) we surprisingly have found higher plasma sodium levels in LSD (148.7 ± 1.0 vs. 143.2 ± 0.7 mEq/L, $p < 0.05$) when compared to control group. During the assessment of cardiac parameters, only the FURO group showed smaller mean arterial pressure than control after administration of phenylephrine at both 10 and 50 $\mu\text{g/mL}$ concentrations (Phe10: 142.6 ± 19.1 vs. 222.4 ± 14 bpm, $p < 0.05$; Phe50: 261.0 ± 74.8 vs. 190.9 ± 19.6 bpm, $p < 0.05$, respectively), probably due to hypovolemia, a factor which could also explain the absence of hyponatremia in these animals. Concerning the molecular parameters, n PVN SO group showed an increased mRNA expression of AVP (2.61 ± 0.16 vs. 1.04 ± 0.04 a.u., $p < 0.05$) and OT (1.52 ± 0.12 vs. 1.01 ± 0.05 a.u., $p < 0.05$), while in the LSD group, these parameters are reduced (AVP: 0.65 ± 0.07 vs. 1.04 ± 0.04 a.u., $p < 0.05$; OT: 0.65 ± 0.06 vs. 1.01 ± 0.05 a.u., $p < 0.05$), when compared to control group, respectively. Finally, we found increased levels of AT1 mRNA in PVN from SO (2.94 ± 0.26 vs. 1.14 ± 0.25 a.u., $p < 0.05$) and FURO (3.08 ± 0.51 vs. 1.14 ± 0.25 a.u., $p < 0.05$) compared to control group, respectively. Thus, these results underscore the central role in the modulation of neuroendocrine systems electrolyte and cardiovascular homeostasis.

Key-words: Hydroelectrolitic balance. Sodium appetite. Cardiovascular alterations.

LIST OF FIGURES

Figure 1. Representative scheme of the neural circuitry involved in the regulation of fluid and hydroelectrolytic balance.....	43
Figure 2. Timeline showing the experimental design of metabolic cage evaluation.....	50
Figure 3. Daily water intake.. ..	53
Figure 4. Daily hypertonic saline intake.....	54
Figure 5. Daily food intake.....	54
Figure 6. Body weight gain.. ..	55
Figure 7. Daily urinary volume.	56
Figure 8. Daily urinary osmolality.....	57
Figure 9. Daily sodium excretion.. ..	57
Figure 10. Daily potassium excretion.....	58
Figure 11. Cumulative intake saline 0.3 M	59
Figure 12. Cumulative water intake.....	60
Figure 13. Preference Index for sodium.	60
Figure 14. Cumulative urinary volume.....	61
Figure 15. Cumulative urinary osmolality.....	62
Figure 16. Urinary sodium excretion after fluid presentation.	62
Figure 17. Urinary potassium excretion after fluid presentation.....	63
Figure 18. Haematocrit	63
Figure 19. Plasma osmolality	64
Figure 20. Plasma sodium concentration.....	64
Figure 21. Plasma potassium concentration.	65
Figure 22. Mean arterial pressure in response to phenylephrine, sodium nitroprusside and expansion of hypertonic volume.....	66
Figure 23. Effect of dietary sodium content over AVP mRNA expression.	67
Figure 24. Effect of dietary sodium content over the OT mRNA expression	67
Figure 25. Effect of dietary sodium content on AT1 mRNA expression in the PVN.	68
Figure 26. Effect of dietary sodium content on AT2 mRNA expression in PVN.....	68
Figure 27. Sodium content change effects in the diet for four days on the AT1 mRNA expression in the PVN.	69

ABBREVIATIONS LIST

5-HT	5-hidroxitriptamin (serotonin)
5-HT _{2A/2C}	Serotonin receptors type 2a and 2 c
ANG-(1-7)	Angiotensin (1-7)
ANG I	Angiotensin I
ANG II	Angiotensin II
AP	Area postrema
AT ₁	Angiotensin receptor type 1
AT ₂	angiotensin receptor type 2
AVP	Arginine vasopressin
AV3V	Anteroventral region of third ventricle
CNS	Central nervous system
CVLM	Circunventricular organs
CVOs	Caudoventrolateral medulla
ACE	Angiotensin-converting enzyme
ACE ₂	Angiotensin-converting enzyme type 2
DRN	Dorsal raphe nucleus
ICV	Intracerebroventricular
CSF	Cerebrospinal fluid
ICF	Intracellular fluid
ECF	Extracellular fluid
LHA	Lateral hypothalamic area
MAS	Ang-(1-7) receptor
MnPO	Median preoptic nucleus

NTS	Nucleus of solitary tract
PBLN	Parabrachial lateral nucleus
PVN	Paraventricular nucleus
SON	Supraoptic nucleus
SFO	Subfornicial organ
OT	Oxytocin
OVLN	Organum vasculosum laminae terminalis
RAAS	Renin angiotensin aldosterone system
RAS	Renin angiotensin system
RVLM	Rostraventralateral medulla
TRPV	Transient receptor potential vanilloid
V1	Type 1 vasopressin receptor
V2	Type 2 vasopressin receptor

TABLE OF CONTENTS

1 INTRODUCTION.....	36
2 LITERATURE REVIEW	38
3 JUSTIFICATION	47
4 OBJECTIVES.....	48
4.1 General.....	48
4.2 Specific Objectives	48
5 MATERIAL E METHODS.....	49
5.1 Bioethics On Animal Experimentation	49
5.2 Experimental Groups.....	49
5.3 Experimental Protocols	49
5.4 Techniques For Analysis Of Samples And Tissues	51
5.5 Statistical Analysis	52
6 RESULTS AND DISCUSSION.....	53
6.1 Metabolic Cage	53
6.2 Plasma Parameters.....	63
6.3 cardiac parameters of the animals subjected to sodium content changes ingested at the end of four days.....	65
6.4 Quantification of mRNA by qPCR	67
7 CONCLUSIONS	70
8 REFERENCES	71

1 INTRODUCTION

Sodium is the major extracellular solute and also primarily responsible for maintaining of the osmotic gradient, allowing the movement of water through the intra- and extracellular compartments. Therefore, this ion is crucial for fluid and electrolyte homeostasis, allowing the regulation of volume and osmolality. The latter constitute pivotal points to be controlled, since deviations from their optimum ranges may lead to death of the individual. Thus, organisms have developed refined mechanisms for controlling this balance which enable the maintenance of life even in adverse environments.

For this reason, hydroelectrolytic balance is under a highly sensitive and rapidly executable control, consisting of systemic and neuroendocrine components which constantly receive information about the individual osmotic and volemic status, allowing the modulation of all driving mechanisms which will correct possible deviations. In this context, the central control of these parameters is performed by specialized neurons and glial cells that detect changes in osmotic pressure and extracellular sodium concentration. These cells are located in the circumventricular organs (CVO), areas which lack blood-brain barrier (BBB), such as the subfornical organ (SFO), vascular organ of the lamina terminalis (OVLT) and area postrema (AP). These regions in turn send projections to other brain regions related to hydroelectrolytic balance and cardiovascular regulation.

The CVO cell populations are susceptible to angiotensin II (ANG II), a major component of the renin - angiotensin system - Aldosterone System (RAAS). Systemically, ANG II causes intense vasoconstriction and aldosterone secretion, increasing renal sodium reabsorption and potassium excretion, thus enhancing circulating volume. On the other hand, ANG II also acts centrally, stimulating thirst and sodium appetite, which also increase in blood pressure/volume, thereby representing an important interface between the hydroelectrolytic balance and cardiovascular homeostasis.

Among all the brain areas which CVO neuronal population send projections we highlight the hypothalamic supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nuclei, whose neurons are responsible for the vasopressin (AVP) and oxytocin (OT) synthesis and secretion in response to hyperosmolarity and hypovolemia. Also, such CVO neuronal populations still send projections to the dorsal raphe (DRN) and lateral parabrachial (LPBN) nuclei, which are involved in the modulation of sodium appetite. Therefore, the stimulation of neurons within the CVOs lead to the activation of a complex circuit, culminating with sympathetic, endocrine and behavioral responses.

Indeed, the serotonergic system arising from raphe midbrain has a strong role over the inhibition of sodium appetite. Populations of serotonergic neurons send projections to several brain areas related to fluid and electrolyte balance, neuroendocrine and cardiovascular control. The DRN contains the main population of serotonergic neurons responsible for sodium satiety signalling, as body sodium depletion mechanism decrease its activity. Furthermore, submitting a subject under a sodium overload condition leads to an increased activity of these neurons.

Both the brain areas responsible for the stimulation of the sodium appetite (angiotensinergic) as those related to its inhibition (serotonergic) have connections with each other, composing a complex circuit that combines the information obtained from both systems. Thus, during hyponatremia, changes in osmotic pressure and cerebrospinal fluid (CSF) sodium content are detected by the CVOs where ANG II will also act on their AT1, generating the motivated behaviours of thirst and sodium appetite, while the inhibitory serotonergic mechanisms must be inhibited in order to facilitate the sodium appetite.

Given the close integration between these systems, this study analyses the functional changes observed in the hydroelectrolytic, cardiovascular and molecular parameters from animals undergoing both sodium overload as sodium deficit situations. Thus enabling us to compare the alterations when there is inhibition or stimulation of circuits that modulate the sodium appetite.

2 LITERATURE REVIEW

2.1 Historical And Biological Importance Of Sodium

The use of sodium chloride by humanity dates back thousands of years. While animals migrate in search of salt sources, the man seems to have done something similar, thus building routes and villages around such sources. Some of these routes crossed the globe and allowed the salt to become a bargaining chip from Morocco to Rome. From the very beginning, salt was widely used by ancient societies, serving to enhance the flavour of food, to increase shelf life, and even for antiseptic purposes. Such was the importance of this mineral that cities were named due to salt sources, wars were fought to decide its control, and it was used as payment to soldiers in Rome, being called *salarium*, Latin word that gave rise to the term salary, widely used. (CIRILLO *et al.* 1994).

In ancient Greece, it also had an important role and its consumption was surrounded by mysticism, since it was linked to Aphrodite myth, the goddess of love and fertility, whom in one of the myth versions, would have been born from the sea salt foam. Thus, Greeks believed that salt consumption was linked to increased fertility in both men and other animals, and its deficiency would lead to reproductive disturbances. (MOINIER AND DRÜEKE 2008). In this context, Aristotle reported supplementation of mineral salt in order to increase reproduction and lactation in sheep. In fact, this supplementation takes place currently in farm animals in order to prevent changes such as decreased milk production and weight loss, among other more serious disturbances. It is well known that in natural conditions, sodium deficiency occurs but the animals tend to migrate in search of mineral sources to replenish the deficit. Interestingly, farm animals such as sheep and calves, when subjected to a low-sodium diet, have behavioural changes that compel them to seek and ingest salt, which is in line with what is also observed in other herbivores in nature (DENTON AND SABINE 1961; BELL 1972). Behavioural changes that lead these animals to seek the sodium chloride is a remarkable sign of this element's importance for the maintenance of life.

Although potassium represents the major intracellular ion, sodium and chloride respectively represent the major cation and anion of the extracellular fluid where sodium emerges as a major constituent. Although the appropriate concentration of these elements is essential for the maintenance of cellular functions, regulation of sodium transport appears to interfere in the global concentrations of the other elements. Thus, sodium is a key element for the maintenance of the internal environment. In fact, its movement through body compartments is what allows osmoregulation and thus enables the maintenance of life against adverse environments. (GEERLING; LOEWY, 2008)

Thus, the sodium *per se* is presented as an essential element for the maintenance of life, and is involved in all biological functions: from the cellular compartment to the complex functioning of organs and systems. Its movement through the cell is involved in a myriad of physiological functions, such as nutrient transport, conduction of nerve impulses and maintenance of acid-base balance. Sodium is essential for the functioning of cell itself, allowing maintenance of the transmembrane potential, enabling cellular excitability and propagation of nerve impulses (MICHELL AR, 1995).

For this, sodium gradient is maintained through the operation of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ transporter, which also allows the action of other transport systems (In fact, the transport through the pump keeps the higher concentration of potassium in the intracellular compartment). The sodium gradient also: i) allows urine's dilution processes in the Henle loop as well as its concentration at the collector duct from nephron; ii) by enteric cotransport the sodium gradient facilitates uptake and renal reabsorption of solutes such as glucose and amino acids; and iii) participates in the maintenance of blood volume and osmotic pressure, so that the intracellular and extracellular water content depends mainly of the total content of sodium available in the extracellular compartment as it is the main constituent. Moreover, by influencing the activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ transporter which consumes high concentrations of adenosine triphosphate (ATP), sodium transport rates can affect many metabolic pathways (MICHELL AR, 1995).

2.2 Sodium Role On Hydroelectrolytic Balance

Sodium, as the most abundant ion of extracellular fluid (ECF) is able to exert significant osmotic pressure, where the change on its concentration causes the movement of water through cell membrane. As this cation does not freely cross the cellular barriers, being membrane carriers required), its transport is a limiting factor for ECF volume and distribution of water through the body compartments. All bodily fluids (ECF - represented by the plasma and the interstitial fluid and the intracellular fluid - ICF) are in relative osmotic equilibrium, so that changes in plasma sodium content will not only affect the plasma volume and blood pressure, but also the intracellular compartment and the interstitial fluid. Thus, water and sodium represent the primary variables of hydroelectrolytic balance which relates to each interdependently, so that variations in one of the factors cause changes to the same system whose values must meet a narrow range of variation compatible with life. Therefore, it is necessary to perform fine control of these values. In mammals it is made by recruiting renal and neuroendocrine mechanisms which every moment asses and control changes in ICF and ECF. Renal excretion/reabsorption and water and electrolytes intake are the main forms of controlling volume and osmolarity. A reduction of about 10% of plasma volume is able to generate thirst, likewise an increase of about 1 to 2% in the plasma osmolarity is able to generate the same behaviour in a much more potent way (ANTUNES-RODRIGUES ET AL. 2004). The sodium and plasma osmolarity values must orbit around 145 mmol and 290 mOsmol / L respectively so that large deviations from these values can lead to loss of the primary physiological functions such as tissue perfusion and can lead to death of the animal if not corrected in time. To this end, the control systems are recruited in accordance with the altered parameter. The ECF osmolarity is basically controlled by adjusting the intake and excretion of water, while the volume of the compartment depends primarily on sodium content (VERBALIS 2003). Thereby, the total volume of the LEC, as seen previously, depends directly on the sodium content, around which float the water content in order to finely control the osmotic pressure. This system organization is necessary so that the sodium is consumed or excreted/retained in order to reduce or increase plasma volume.

During normal metabolic activity individuals lose water and electrolytes. Although common, dehydration can be accentuated in certain pathological situations or physiological challenges where it may represent a high risk to the subject. In a didactic way, we can separate the dehydration in two main forms, intracellular and extracellular dehydration which generate corresponding types of thirst. The first, or intracellular dehydration occurs when water loss exceeds sodium loss, that happens for example during moderate perspiration and water deprivation. With the loss of water, ECF volume decreases and osmolality increases turning the ECF hypertonic, the cells lose water and shrink, which stimulate the ingestion and elimination of water. During extracellular dehydration occur similar losses of both water and sodium (diarrhea and haemorrhage), leading to the a more pronounced reduction of ECF volume, while its osmolality may increase or remain the same, so water intake is not sufficient to restore the deficit. The water intake *per se* is sufficient to replace volume deficit only when water loss is higher than sodium loss. In these cases, hyponatremia functions as a stimulating factor of thirst sensation and AVP secretion, leading to water intake and renal reabsorption. However, when fluid losses also involve great loss of sodium (as in haemorrhages) water intake is not sufficient to repair the deficit. In this particular case, the intake of water alone will lead to hyponatremia, which has the ability to inhibit the resorption of fluid intake (MCKINLEY AND JOHNSON 2004).

In sodium depletion situations, initially the plasma ion concentration remain practically unaltered since the AVP secretion is promptly reduced, thus causing increased excretion of water. But this adjustment causes hypovolemia, and if it gets worse, the stimuli for thirst and AVP secretion is increased enough to overcome the osmolality as the dominant stimulus, thereby increasing water retention to volume maintenance at the expense of the sodium concentration. Thus, the individual develops hyponatremia and maintain the hypovolemia if sodium is not replenished. Following this linear thinking, where volume and body sodium content are closely related, changes in sodium intake content would then lead to changes in blood volume, with due circulatory adjustments in order to maintain tissue perfusion and consequent increase or reduction of renal water and sodium excretion. Thus, most of the sodium intake, would be readily eliminated in the urine, maintaining a certain constancy in sodium content and body volume. However, a study conducted during space flight simulations lasting more than one hundred days questioned these assertions. In the research conducted with humans, the amount of sodium intake was controlled and evaluated by the amount of the ion excreted in urine. It has shown that excretion and sodium retention showed up rhythmically and regardless of blood pressure or body weight. (RAKOVA *et al.* 2013). These findings reinforce the hypothesis of the sodium reservoir, debated for more than 100 years ago by Cannon and subsequently used in order to justify the delay in the appearance of sodium appetite in depleted animals (as compared with the appearance of the thirst which occurs almost immediately the depletion of the ECF). One of the sites that would function as a reservoir are glycosaminoglycans present in the skin. It was initially analysed in animal model (TITZE *et al.* 2004) and subsequently in humans through the development of image techniques, which demonstrated that the accumulation of sodium in "reservoir" of the skin increases with age in both sex but in males this content is higher than in women, and even higher in patients with hypertension compared to healthy people (KOPP *et al.* 2013). These recent discoveries have proven that changes in the current paradigms about the dynamics of water and sodium balance are necessary (TITZE 2014; HOFMEISTER *et al.* 2015).

2.3 Renin Angiotensin Aldosterone System

The depletion of extracellular fluid volume is an important stimulus that has the capacity of triggering sympathetic and neuroendocrine responses. Experimentally, it can be done through the usage of inert colloid substances (STRICKER and JALOWIEC, 1970), peritoneal dialysis (FALK and LIPTON, 1967) or isolated use of diuretics such as furosemide (SUSAN *et al.* 1981; SMITH *et al.* 2007) or in association with low sodium diet (JALOWIEC, 1974). All these approaches produce a sodium deficit that leads to the depletion of the ECF (hypovolemia). When this occurs, there is a reduction in circulating blood volume, with subsequent pressure drop, that leads to decreased activity of the cardiopulmonary receptors and baroreceptors located in the aortic arch and carotid sinus. This information is then carried to the central nervous system (CNS), causing increased sympathetic tone and stimulating the release of vasopressin by the neurohypophysis (COWLEY *et al.* 1983). Vasopressin in turn will act on V₂ receptors present in renal collecting ducts, leading to a higher insertion of aquaporin 2 within the apical membrane, causing thus a higher water reabsorption. On the other hand, it binds to V₁ receptors within vascular smooth muscle causing vasoconstriction. The reduced blood volume and increased sympathetic tone also will act synergistically on the kidneys, increasing the release of the enzyme renin by the juxtaglomerular apparatus. Renin has proteolytic function, thus enabling the cleavage of angiotensinogen in Angiotensin I. It is in turn converted into the octapeptide ANG II by the action of angiotensin converting enzyme (ACE), present in high concentrations in the lungs. ANG II features a variety of biological functions, acting both on the periphery and in the CNS, being related to the regulation of blood pressure, thirst and sodium appetite modulation, among others (FITZSIMONS and SIMONS 1969; EPSTEIN, FITZSIMONS, and ROLLS 1970; RUIZ-ORTEGA *et al.* 2001). Peripherally, the most pronounced actions of ANG II are the intense vasoconstriction in vascular beds and on the AT₁ receptors in the glomerular zone of the adrenal cortex leading to the release of aldosterone (GANONG *et al.* 1962; WANG *et al.* 1997). In addition to the ANG II, other factors can stimulate its synthesis and release, as ACTH and the concentration of ion potassium (AGARWAL and MIRSHAHI 1999). Once released, the mineralocorticoid aldosterone acts on its receptors in the nephron, leading to increased excretion of potassium and sodium reabsorption. Furthermore, as ANG II, aldosterone also has natriorexigenic properties, so that the action of both seems to converge in order to increase the intake of sodium. (J. T. FITZSIMONS *et al.* 1998).

In addition to the classic components of this system, more recently several new mediators were discovered, among which ANG (1-7) and the receptor for angiotensin type II (AT₂), which are considered RAS' functional antagonists in several classic situations (FERRARIO *et al.*, 2014). The Ang- (1-7) is formed from the action of ACE2 enzyme, but may also be formed by the action of ACE or endopeptidases over ANG-(1-9). Despite the possible counter-regulatory role of this peptide in some situations it has been shown that ANG- (1-7) may exhibit central activity similar to ANG-II (ALZAMORA *et al.* 2002; CHENG *et al.* 2012; SANTOS *et al.* 2003). The ANG- (1-7) has the ability to bind to the MAS receptor that is widely distributed in the CNS, and have been located in rostraventrrolateral (RVLM), caudoventrolateral medulla (CVLM), nucleus of the solitary tract (NTS) and PVN, among others (BECKER *et al.* 2007). The peripheral actions of ANG- (1-7) in the literature range from improvement in cardiac function, reduction of angiogenesis and vasodilation to increase in renal blood flow and natriuresis. Among the key actions, it seems to be involved in the release of vasopressin and facilitation of baroreflex. (SANTOS *et al.* 2008). So that together with the components of the classical RAS seems to function as an important component of cardiovascular and hydroelectrolytic homeostasis integration.

2.4 Thirst And Sodium Appetite

Thirst can be defined as a subjective sensation and, therefore, could only be so called in man. However, dehydration is a physiological phenomenon observed both in man and other mammals, so that all of them respond similarly to thirst, intensely seeking and consuming fluid. (STRICKER and VERBALIS, 1988). Similarly, sodium appetite is also a motivated behaviour and was observed experimentally for the first time in the 30s by Curt Richter after adrenalectomy surgery where the animals did not only presented sodium appetite, as required greater amount of its intake to survive (STELLAR 1993; SAKAI 2007). These appetitive behaviours of water and sodium seem to be highly conserved phylogenetically, so that different species respond similarly to the administration of substances which evoke these behaviours such as ANG II (FITZSIMONS, 1998). However, for the generation of these patterns it is indispensable an intense integration of peripheral and central signals in order to evoke the necessary answers according to the challenge. To this, the CNS must receive information about the ECF osmolarity, sodium concentration, gustatory sensation, volume and pressure, which will be sent to other brain areas related to the processing and execution of sympathetic, neuroendocrine and behavioural responses necessary for homeostasis maintenance. Some of these areas are seen in the figure below.

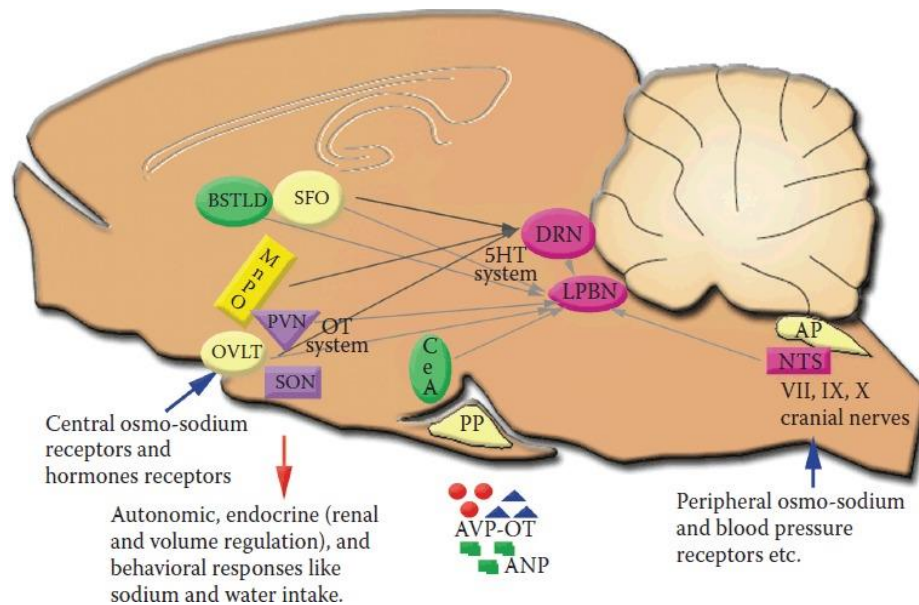


Figure 1. Representative scheme of the neural circuitry involved in the regulation of fluid and hydroelectrolytic balance (VIVAS et al. 2014).

Experimentally, increases in plasma osmolality can be induced by administration of substances that do not freely cross the cell membrane, such as sodium chloride. The cellular dehydration caused by elevated osmolality is able to activate central mechanisms which provokes the behaviour of seeking and intaking water. Such mechanisms depend directly on signals detected by structures called osmoreceptors, a term coined in the 40s, being initially related to vasopressin secretion (VERNEY, 1947). Later, experimental evidences led to the conclusion that such structures would be located in the anteroventral region of the third cerebral ventricle (AV3V), which would be affected by the CSF tonicity and especially its sodium content (ANDERSSON, 1978). Further studies using techniques of tissue injury, electrophysiological studies and c-fos expression confirmed that osmoreceptors would be located in the circumventricular organs, the two structures of *lamina terminalis* OVL and SFO, and AP, a medullary structure. The osmoreceptors are cells capable of detecting changes in osmotic pressure and translate them into signals that are sent to the central regions, responsible for the osmotic balance. Peripherally, there are cells with osmoreception function located in the hepatic portal vein, one of the initial places where arrives information about the osmotic impact of food and fluids intake (BOURQUE, *et al.* 1994). Following the proposed concept that characterizes osmoreceptors, other core structures beyond the CVOs could be part of this classification, including the median preoptic nucleus (MnPO), which although is not a structure lacking BBB is also strongly activated by osmotic stimuli as well as other regions that comprise the *lamina terminalis*. Similarly, electrophysiological studies demonstrated that the magnocellular secretory SON cells are excited by hyperosmotic stimulation, and inhibited by hypo-osmotic stimuli. In recent years, it was possible to identify part of the mechanism related to osmoreception in some of these areas and, apparently, the family of the transient receptor potential vanilloid (TRPV) is involved in the transduction of signals in magnocellular neurons of the SON (SHARIF NAEINI *et al.* 2006), OVL (CIURA & BOURQUE 2006), and in hepatic circulation (LECHNER *et al.* 2011). Neurons within the OVL still send projections to the SON in order to stimulate the secretion of AVP by magnocellular cells in response to homeostatic challenges as dehydration (MCKINLEY, HARDS, & OLDFIELD, 1994).

As discussed earlier, the ANG II has a strong dipsogenic capacity, which is linked mainly to its action in the CNS rather than the periphery (FITZSIMONS and SIMONS 1969; EPSTEIN, FITZSIMONS, and ROLLS, 1970; SHARPE and SWANSON, 1974). The MnPO has a high density of AT₁ receptors despite not being subject to the circulating levels of ANG II, since it does not maintain contact with the CSF; therefore, this would be a possible component of a central angiotensinergic system. This hypothesis is strengthened by the fact that pharmacological blockade with angiotensinergic antagonists administered intracerebroventricular (ICV) can inhibit water intake. In addition, by receiving inputs from SFO and OVLT, the MnPO could act as an integrative area of information coming from osmoreceptors and visceral information coming from the periphery via the brain stem. Although much has been advanced in recent decades, some essential questions still remain about the genesis of drinking behavior. For being a highly preserved component on the evolutionary scale, the circuit may involve several other areas less debated. Indeed, the region of the *lamina terminalis* has a prominent role, but the neurons that within project to other nuclei such as PVN, the lateral hypothalamic area (LHA), and periaqueductal grey, which may represent an important integration between the fluid and electrolyte balance and other functions essential to survival.

In a convergent way, the *lamina terminalis* structures are involved in the genesis of sodium appetite (MnPO, SFO and OVLT). Besides the ability to detect differences in osmotic pressure those cells can also detect specific changes in extracellular sodium content. They contain a special type of sodium channel, capable of detecting changes in sodium content (Nax channels), they appear to be distributed in restricted areas in the CNS, among them stand out SFO and OVLT, where the first, seems to be primary responsible for the detection of sodium content (WATANABE *et al.* 2000; WATANABE *et al.* 2002; NODA and HIYAMA, 2005).

As mentioned before, these areas also have a significant density of receptors for ANG II. The SFO in particular, has a high density of AT₁ receptors. Thus, about 70% of the neurons in this area serve as target cells of circulating ANG II. Later, it was shown that AT₁ receptor mRNA expression is significantly increased in rats subjected to a low sodium diet for four days (MECAWI *et al.* 2013). Furthermore, pharmacological blockade of ACE in different models demonstrated the role of central but not peripheral ANG II in the genesis of sodium appetitive behaviour. While peripheral high doses of captopril (ACE blocker) were able to inhibit the sodium appetite, low doses of the drug generated appetitive behaviours to sodium and water. It was then proposed that in low doses, only occurred peripheral ACE inhibition by increasing ANG I levels which would reach the CNS and then converted into ANG II (MOE *et al.* 1984). In more recent research, it was shown that CVOs' cells have the ability to capture the ANG I and convert it into ANG II (FRY and FERGUSON, 2007).

The SFO also has several connections with other brain areas, among them the DRN, an important structure involved in sodium appetite. Neuroanatomical studies have suggested the existence of angiotensinergic projections originating in the SFO aimed to DRN (LIND *et al.* 1984). Later, it was shown that most of the SFO neurons that respond to ANG II administered centrally, in fact, project to the DRN (TANAKA *et al.* 1998). The excitatory role that ANG II presents in water or sodium deprivation models could involve the serotonergic system, represented by both the DRN, as the LPBN as suggested by experimental evidence (BADAUÊ-PASSOS *et al.* 2007; COLOMBARI *et al.* 1996; FRANCHINI *et al.* 2002). Thus, when an individual is subjected to a sodium overload or when after a depletion occurs induced sodium intake, information regarding the volume change and sodium levels reach the DRN, which in turn releases 5-HT (5-hydroxitriptamin - serotonin) in LPBN generating inhibitory signals to cease the

consumption of sodium in order to avoid significant changes in the extracellular compartment. (FRANCHINI *et al.* 2002; GODINO *et al.* 2007).

Serotonergic neurons within the midbrain raphe nuclei emit and also receive specific projections of other CNS areas related to neuroendocrine, electrolytic and cardiovascular control (AZMITIA & SEGAL, 1978; DOROCIC *et al.* 2014). In this context, rats subjected to administration of drugs that stimulate serotonergic neurotransmission (agonists 5-HT 2A / 2C, serotonin releasing agents or re-uptake inhibitors) produce selective inhibition of sodium appetite (NEILL & COOPER, 1989). Still sodium depleted females or control when treated with serotonin releasing agents exhibit a dramatic reduction of hypertonic saline intake (ROUAH-ROSILIO *et al.* 1994). These data reinforce the hypothesis that serotonergic transmission exerts a tonic inhibition of sodium intake. Regarding the serotonergic system, our studies have examined the hypothesis that this system, within DRN would be one of main mechanisms responsible for signalling satiety of sodium appetite. Experimental evidences obtained in these studies support this hypothesis, since rats with DRN injury (electrolytic or ibotenic acid) presented an excessive consumption of hypertonic saline solution (OLIVARES *et al.* 2003; CAVALCANTE-LIMA *et al.* 2005a, 2005b;). Additionally, other studies indicate that sodium depletion decreases the activity of serotonergic neurons present in the DRN – highlighted by immunohistochemical staining of nuclear protein Fos (Fos-ir) - while its induced consumption increases the activity of these neuronal groups (FRANCHINI *et al.* 2002; GODINO *et al.* 2007). Further, electrophysiological studies *in vivo* utilizing body sodium overload (2 M NaCl, subcutaneously) showed that the frequency of firing of the DRN neurons increases significantly during this challenge when compared to animals infused with isotonic saline solution (GODINO *et al.* 2013). Thus, the activity of the serotonergic system within DNR would be modulated by subject's natremia, decreasing during sodium deficiency states and increasing while its levels are restored or in a sodium overload, which enhances the inhibitory role of serotonergic system over sodium appetite.

2.5 Sodium And Cardiovascular Regulation

As already mentioned, sodium is very important also for cardiovascular regulation, through maintenance of circulating blood volume, allowing adequate tissue perfusion, among other functions. Thus, the central areas related to the control of cardiovascular homeostasis should connect to the ones that control sodium/body fluids homeostasis. In this context, the nucleus of the solitary tract (NTS) is an important region where, through the cranial nerves arrives information about the current volume, osmotic status of the subject and signals detected by baroreceptors. It has been shown that NTS neurons showed an increase of its activity when animals depleted of sodium have access to hypertonic saline (consummatory or the sodium appetite satiety phase), but are not activated during the appetitive phase ion. Therefore, the NTS seems to be an important region for the integration of cardiovascular and electrolyte homeostasis. Where the information generated could be transmitted to different regions of the CNS, among them, medullary structures involved in cardiovascular homeostasis like RVLM and CVLM; and structures involved in the regulation of sodium appetite, as LPBN and DRN and even other areas related to fluid and electrolyte homeostasis as SON and PVN and AV3V region. (ANDRESEN & KUNZE, 1994; SAWCHENKO & SWANSON, 1981). Similarly, the AV3V region contains neurons that send projections also directly or indirectly to areas related to the control blood pressure as the NTS and RVLM.

Among the important areas for this integration we can still highlight the SFO, which in addition to receiving various stimuli as other CVOs, also communicates with

other areas that compose essential circuits to electrolyte and cardiovascular homeostasis as serotonergic vasopresinergic, oxytocinergic and angiotensinergic systems. The latter is one of the main systems related to changes in cardiovascular homeostasis culminating in several diseases such as hypertension. The main product of the RAS, ANG-II is related both to the control of cardiovascular function as body fluid, acting on the blood vessels, renal hemodynamic and endocrine system. Similarly, its AT₁ receptor is responsible for its most important physiological effects, i.e., increased blood pressure and the genesis of thirst. However, other non-classical components of the SRA like the ANG (1-7) and its receptor MAS also appear to be involved in regulating heart and electrolyte homeostasis (SANTOS *et al.* 2008). Although it is still difficult to reach a consensus on the cardiovascular changes induced by the increase on sodium intake, the RAS components could be strong candidates in the connection between changes in hydroelectrolytic and cardiovascular homeostasis (BATUMAN, 2012; LIMA *et al.* 2007; SANADA *et al.* 2011).

3 JUSTIFICATION

Sodium appetite is a key behaviour to the survival of mammals. However, in recent years several studies have discussed the relationship between high sodium intake and harmful changes to individual such as hypertension ((BATUMAN, 2012; DAHL, 2005; JACKSON, 1991). Despite being an intensely studied field, little is known about the real link between high sodium consumption and changes in cardiovascular homeostasis. In addition, recent discoveries about the sodium dynamics in rodents and humans made necessary to analyse certain findings from a new perspective (HOFMEISTER *et al.* 2015b; KOPP *et al.* 2013; SCHAFFLHUBER *et al.* 2007; TITZE, 2015; TITZE *et al.*, 2004). Thus, in this study the animals were submitted to different conditions that challenge sodium homeostasis in order to further analyse the homeostatic changes and the possible link between them.

4 OBJECTIVES

4.1 General

This project aimed to study the functional and molecular profile of the changes induced by different experimental protocols that challenge sodium homeostasis.

4.2 Specific Objectives

Specifically, male Wistar rats randomly divided into 4 experimental groups (i) control (CTRL); ii) low-sodium diet (LSD); iii) low-sodium diet associated with sodium depletion (furosemide - FURO); iv) saline overload (SS), were studied for:

- a) Check the thirst behaviour and sodium appetite verified by fluid intake;
- b) Investigate the electrolyte abnormalities (osmolality, Na⁺ and K⁺ urinary and plasma and haematocrit) in the different models;
- c) Trace profile of hemodynamic and autonomic changes caused by four days of treatment;
- d) Determine the molecular changes in brain areas involved with the electrolyte balance.

5 MATERIAL E METHODS

5.1 Bioethics On Animal Experimentation

Before any experimental procedure, this project was submitted to the Ethics Committee on Animal Experiments of Federal Rural University of Rio de Janeiro - UFRRJ (Case No. 005-2015) and was adapted to its recommendations, lying in line with current legislation. Adult male Wistar rats (90 days) from the Animal Facility from Department of Physiological Sciences – DCFis/UFRRJ, were kept in collective boxes (containing four animals per cage) under controlled temperature of $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ and light-dark cycle of 12 / 12 hours, with free access to water and feed.

5.2 Experimental Groups

In all experiments were studied four groups:

Control group (CTRL): Animals had free access to normosodic feed (0.4% Na^+), filtered water and 1.8% NaCl (0.3 M). This group has a free choice between drinking water or hypertonic saline.

Low-sodium diet group (LSD): Animals had free access to a low sodium diet (0.03% Na^+) and distilled water for four days. This group aims to induce appetite Na^+ without causing hyponatremia, as demonstrated by MECAWI *et al.* (2013).

Furosemide group (FURO): Animals had free access to low salt diet (0.03% Na^+) and water with furosemide (0.24 mg / mL) during 4 consecutive days (20 mg / kg / day). Furosemide is a potent diuretic/natriuretic substance which operates in the thick ascending limb of Henle's loop, inhibiting sodium/potassium/chloride cotransporter ($\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ -NKCC). Therefore, this group aims to induce appetite Na^+ and hyponatremia as demonstrated by BADAUÊ-PASSOS *et al.* (2007).

Salt overload group (SO): Animals had free access to normosodic chow (0.4% Na) and 1.8% NaCl solution for 4 days. This group aims to cause aversion to sodium as shown by VENTURA *et al.* (2005).

5.3 Experimental Protocols

5.3.1 Evaluation in metabolic cage

The animals were placed in metabolic cages during two days for adaptation with access to a standard feed, filtered water and hypertonic saline solution (0.3 M NaCl). After the adaptation period, in the first day (day 1) the animals were submitted to one basal evaluation of food and fluids intake, body weight and urinary excretion, which was also daily performed during the next 4 days of experimental protocol. At the end of the day 1, the chow and fluids were offered to animals according to the experimental group and the evaluations cited before were performed till the day 5. At the end of the fifth day of evaluations, two graduate bottles (containing water and 1.8% saline solution) were offered to animals in order to performs the free-choice test (from 30 minutes to 4 hours after the fluids offer), to assess sodium preference. The sodium preference was calculated from the ratio of the saline volume consumed and the total volume ingested [saline / (water + salt)], as previously described (MECAWI *et al.*, 2013). At the end of the

experiments we had 9 animals per group. PS.: Due to the days of adaptation and the basal evaluation the animals spent 7 days in metabolic cages and the experiment took 5 days instead of 4 like the next ones.

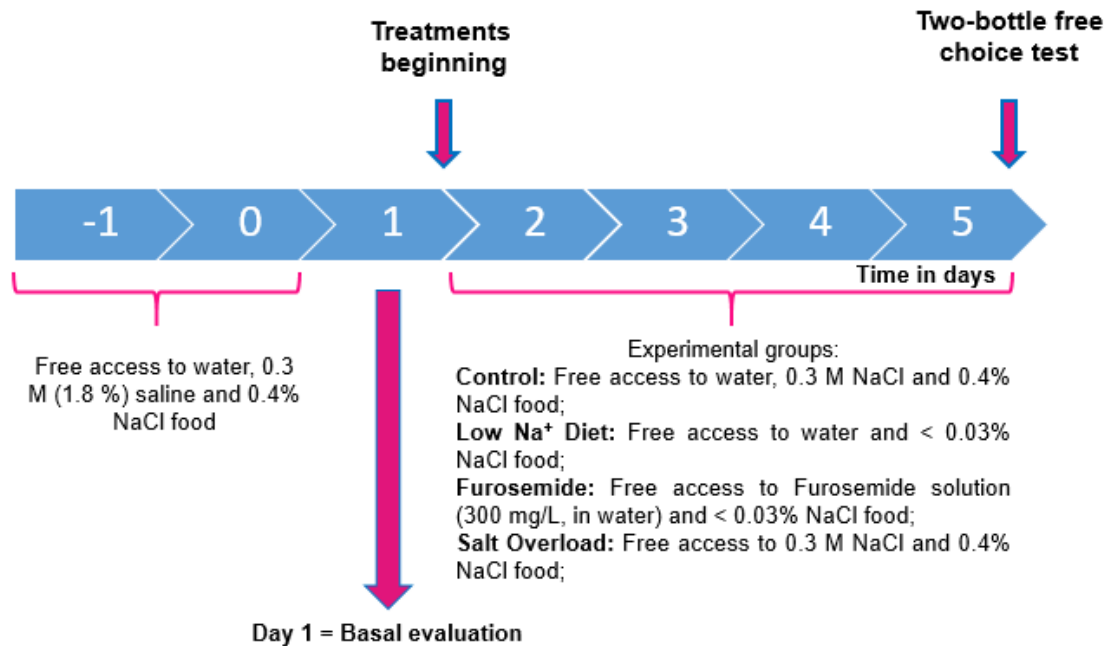


Figure 2. Timeline showing the experimental design of metabolic cage evaluation.

5.3.2 Tissue collection

At the end of the fourth day of sodium alterations in diets a set of experimental groups were decapitated for trunk blood collection in order to assess the osmolality, haematocrit and sodium plasma concentrations. The same animals had their brains collected and stored at -80 ° C in RNase free conditions for subsequent microdissection procedure of PVN nucleus (MECAWI et al., 2013). In this protocol we used 10 animals per groups, except for the control group, which had 11 animals.

5.3.3 Femoral artery and vein cannulation

At the end of the fourth day a group of animals underwent artery and femoral vein cannulation. The cannulas were made with PE-10 polyethylene tube with a length of 2.5 to 3.5 cm, welded to another tube (PE-50) length between 12 and 16 cm. Prior to cannulation, the cannula was filled with saline solution and the free ends were clogged with metal pins. The animals were anesthetized with ketamine and xylazine (75 and 25mg / kg, respectively, intraperitoneally) and then went under surgery procedure. This consisted of an incision in the ventral surface of the right hind leg, exposing vessels and nerves in the region. The femoral artery and vein were cannulated using PE-10 end, which has reached the abdominal aorta and inferior vena cava respectively. The portions of the PE-50 cannula, were transfixed beneath the back skin to the neck, where the ends of these cannulas were secured by sutures. After surgery the animals received prophylactic doses of pentabiotic (Fort Dodge Animal Health, 0.1ml / 100g, intramuscularly) and ketoprofen for analgesia (3 mg / kg, subcutaneous). The animals were then placed in individual cages during the next 24 hours for recovery. At the end of experiments, it was totalized a number of four animals per group.

5.3.4 Registration of cardiovascular parameters

The cannula positioned in the artery was used to record the pulsatile blood pressure and heart rate through data acquisition system (AECAD model, AVS projects, São Carlos, SP, Brazil). On the other hand, the cannula placed in the femoral vein was used for administration of substances with known effects on blood pressure (phenylephrine - α -adrenergic agonist and sodium nitroprusside - donor of nitric oxide, both in concentrations of 2, 10 and 50 $\mu\text{g} / \text{ml}$) to verify baroreflex response as well as to perform hypertonic solution administration (18% NaCl, 0.18 ml / 100 g body weight) in order to verify the cardiovascular responses induced by acute hypernatremia (PEDRINO et al., 2006).

5.4 Techniques For Analysis Of Samples And Tissues

5.4.1 Osmolality

To analyse plasma and urine osmolality aliquots of 10 μl of plasma or urine were used in an osmometer bench (S M E T E II TM, Model 5005 © Precision Systems Inc.). The operation of the device is based on the depression of the freezing point, which is changed by the concentration of solutes present in a given solution. After instrument calibration with standard solutions the sample was inserted individually and the measurement takes place automatically, in mOsm / kg of water.

5.4.2 Sodium and potassium concentrations

The sodium and potassium analysis was performed through flame photometry (Micronal B262 model). The flame photometry is a technique for atomic spectroscopy, where the sample to be analysed is heated by a flame, and by receiving this energy the present elements become excited, releasing energy that will be read by the apparatus according to the length of wave. For this, solutions with known concentration of sodium and potassium were used to performe a standard curve and, after this, the plasma (1:100) and urine (1:200) measurements were performed.

5.4.3 Real-time qPCR (RT-qPCR)

To perform the RT-qPCR analyses, the collected brains were cut in a cryostat into 60 μm sections (Leica Biosystems, CM1520) and using a stainless steel needle (1 mm diameter) were made serial punches of PVN nucleus (-0.9 and -2.1 from bregma, according to PAXINOS and WATSON, 2005). The "punches" were then stored in eppendorf tubes containing 1 mL of reagent QIAzol[®] (QIAzol[®] Qiagen Cat No. 79306). Samples were stored at -80 ° C until RNA extraction. Total RNA was extracted using Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. The quantification was performed using a spectrophotometer 2000c NanoDrop (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). The quality and integrity of the isolated RNA was confirmed by agarose gel electrophoresis (1.2%) with the dye GelRed (Uniscience, São Paulo, Brazil). The cDNA synthesis was made from 500 ng of total RNA using the kit "High-Capacity cDNA Reverse transcription" (Applied Biosystems, USA, Foster City, CA). RT-qPCR was performed with the equipment "Applied Biosystems 7500 Real-time PCR" with denaturation at 95 ° C for 10 min during the first

stage, followed by denaturation processes (95 ° C for 15 sec) and annealing / extension (60 ° C for 1 minute) to 40 cycles of amplification in the second stage. To amplify the gene transcripts synthesized were used Taqman primers for each gene (Applied Biosystems). Water was used instead of cDNA as a negative control and β -actin was used as housekeeping gene to normalize the reactions. The relative quantification was determined by the $\Delta\Delta C_t$ method. For each sample, the threshold cycle (C_t) was determined and normalized by the internal control ($\Delta C_t = C_t \text{ unknown} - C_t \text{ reference gene}$). To calculate the relative abundance ratio of each gene transcript relative abundance of the transcript in the reference sample was applied to $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ($\Delta C_t = C_t \text{ unknown} - C_t \text{ control}$) it is assumed that each cycle of PCR fold amount of product, being then necessary to consider the gain of each cycle (2 times) is raised to the power of the reverse $\Delta\Delta C_t$.

5.5 Statistical Analysis

The statistical analysis was performed by Analysis of variance (ANOVA) one or two-way, followed by Tukey's post-test. All data listed below are described as mean \pm standard error of the mean. It was considered significant P values less than 0.05. All analysis were performed using Graphpad Prism software, v.6.0.

6 RESULTS AND DISCUSSION

6.1 Metabolic Cage

6.1.1 Analysis of daily fluid intake, diet and body weight gain

The graph below represents the fluid intake for a period of five days. On the first day all groups had access to normosodic sodium food and two graduated bottles, one containing water and another 1.8% saline. From the second day the animals had access to different diets and solutions according to the experimental group (Control - access to water and saline 1.8%; Low-Na - access to distilled water; Furosemide - furosemide solution in distilled water; and NaCl overload - only access to the saline 1.8%). Intake of water of furosemide group was significantly higher than control group on the last day of evaluation (Furo 22.3 ± 3.1 vs. 8.8 ± 0.6 Ctrl mL/100g bw).

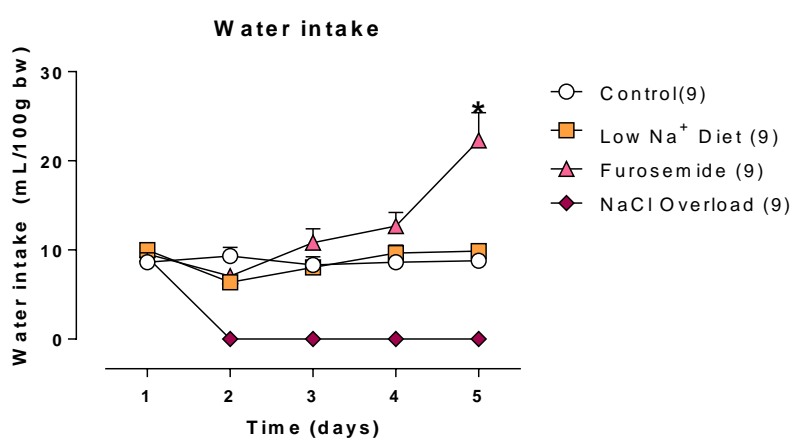


Figure 3. Daily water intake. Day 1 correspond to basal measurements and beginning of experimental protocol. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * $P < 0.05$ when compared to the control.

The graph below represents the daily intake of saline 1.8% during the five days of experiment. On the first day every animal had access to hypertonic saline. From the second day ahead only control and NaCl overload groups had access to saline, for this reason, the other groups were not considered in the statistical analysis. During the four days following sodium overload intake was significantly higher than the control (D1 = SO 23.9 ± 2.3 vs. Ctrl 2.9 ± 0.9 ; D2 = SO 22.6 ± 2.8 vs. Ctrl 2.3 ± 1.4 ; D3 = SO 26.4 ± 2.1 vs. Ctrl 2.5 ± 0.9 ; D4 = SO 26.2 ± 3.2 vs. Ctrl 2.3 ± 0.9 mL/100g bw; $p < 0.05$).

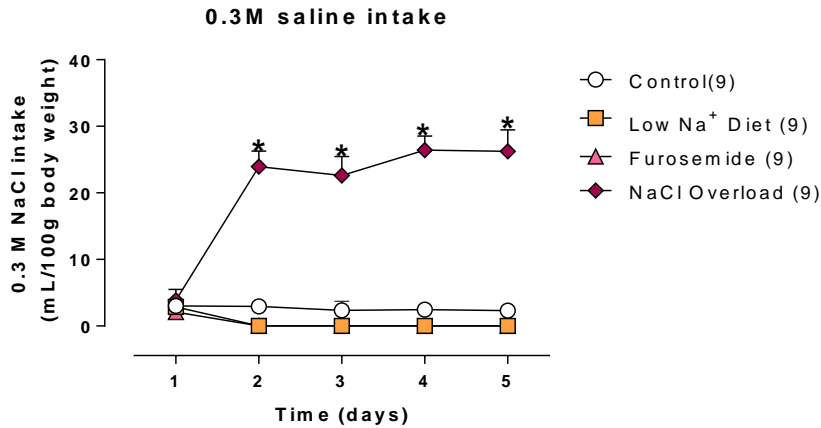


Figure 4. Daily hypertonic saline intake. Day 1 correspond to basal measurements and beginning of experimental protocol. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

By the end of the second day diets were separated according to the experimental group, ie, normosodic food for NaCl overload and control groups and hyposodic chow for low-Na and furosemide groups. Concerning food intake, the Figure 5 show the daily assessment shows that the sodium overload group ingested less food than control (D4 = SO 6.0 ± 0.3 vs. Ctrl 9.0 ± 0.3; D5 = SO 5.3 ± 0.8 vs. Ctrl 9.3 ± 0.3 g/100g bw; p<0.05).

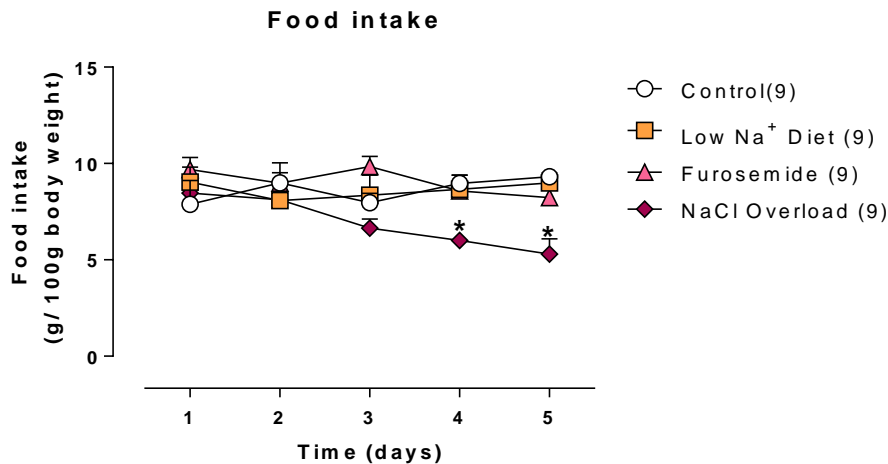


Figure 5. Daily food intake. Day 1 correspond to basal measurements and beginning of experimental protocol. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

In this context, the weight gain during the 5 consecutive days is represented on the Figure 6. In the third day, weight gain was lower in sodium overload group (SO 4,8 ± 3,7 vs. Ctrl 30,9 ± 3,8 g/day). After that every group was diferente from control regarding weight gain from day 4 (LSD 21,0 ± 5,8; Furo 15,7 ± 7,7; SO 9,1 ± 3,8 vs. Ctrl 41,9 ± 3,4 g/day) to five (LSD 28,9 ± 5,2; Furo 19,3 ± 9,0; SO 9,0 ± 5,2 vs. Ctrl 51,2 ± 4,9 g/day).

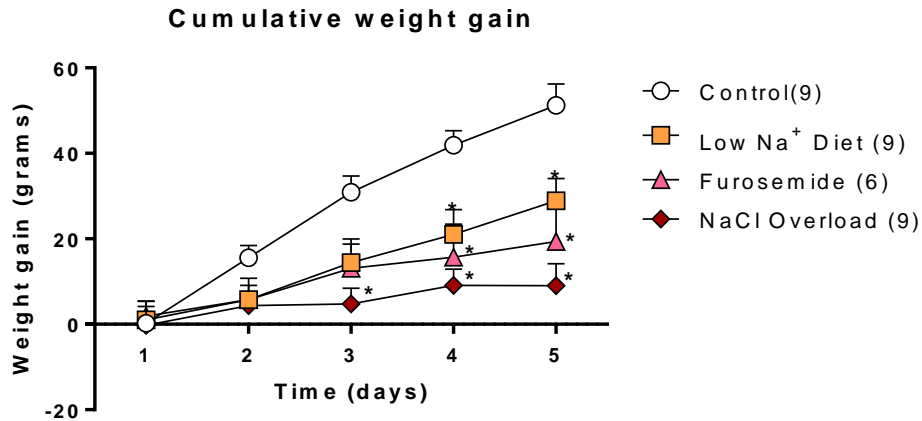


Figure 6. Body weight gain. Day 1 correspond to basal measurements and beginning of experimental protocol. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis * P < 0.05 when compared to the control.

While the animals were housed in metabolic cages daily water intake (tap water, distilled water and water containing furosemide) was similar in Control and Low-Na diet groups. However, in the furosemide group intake became greater over the days, getting to be significantly different from control in the last day of the experiment. As furosemide is a potent diuretic, causing intense diuresis/natriuresis, the animals undergoes a depletion of sodium and volume, so causing the animals to seek sodium and water. Thus, this increase in furosemide solution in the last day is probably due to the pharmacological effect of furosemide, which only in the last day becomes similar to its effect when administered subcutaneously, and intensely activate the neuroendocrine systems related to fluid and electrolyte balance in order to restore osmolality and the deficit of circulating volume, such as increased RAAS activation (SONKODI *et al*, 1982). Furthermore, the use of low doses of furosemide without leading to the depletion of bodily sodium can lead to increased renin release (VANDER & CARLSON, 1969). Increased renin release could then not only increase the peripheral ANG II, as well as the central ANG II, increasing the conversion of angiotensinogen to ANG I. Since the ANG II has strong capacity of inducing dipsogenic behaviour, this could be one reason leading animals to drink more solution even at the risk of hyponatremia.

The group of animals receiving saline overload, while plotted, have not been statistically assessed in this parameter since they only had access to hypertonic saline. This group presented 0.3M saline intake much higher than the control, since the sodium overload increases the osmolality and thereby induces thirst in these animals. As they only have access to hypertonic saline, end up ingesting a large volume in attempt to restore the deficit. Furthermore, it is known that the increase in osmolality is capable of inhibiting food intake, so that it was lower in the salt loading group in the last two days of the experiment (SCHWARTZBAUM. & WARD, 1958). Similarly, the weight gain was lower in these animals compared to control, due to the lower food intake.

6.1.2 Analysis of urinary parameters: volume, osmolality and sodium and potassium content

Figure 7 depicts urine volume collected daily. Since the second day of evaluation urine volume was significantly higher in saline overload group compared to the control (D2 = SO 19.6 ± 2.2 vs. Ctrl 5.6 ± 0.6 ; D3 = SO 20.1 ± 2.3 vs. Ctrl 3.9 ± 0.4 ; D4 = SO 21.3 ± 2.2 vs. Ctrl 4.8 ± 0.5 ; D5 = SO 21.4 ± 2.6 vs. Ctrl 5.3 ± 0.9 mL/100g, $p < 0.05$). Also, Furosemide group presented an increase in urinary volume than control only on the last day of experimental protocol (Furo 17.9 ± 2.7 vs. Ctrl 5.3 ± 0.9 mL/100g, $p < 0.05$).

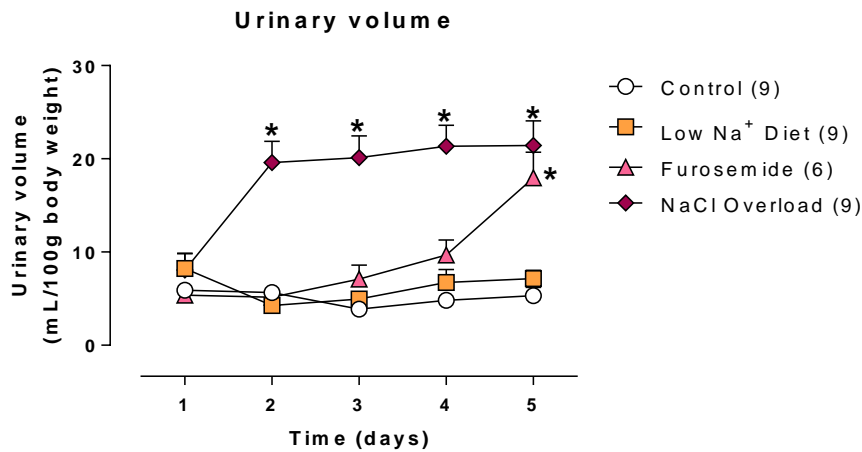


Figure 7. Daily urinary volume. Day 1 correspond to basal measurements and beginning of experimental protocol. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * $P < 0.05$ when compared to the control.

Still, the figure 8 represents the osmolality obtained from the urinary samples collected in basal and during the four consecutive days of experimental protocol. Despite the sodium overload group do not have significant differences from control, the low- Na^+ diet reduced the urine osmolality compared to the control since day 3 (D3 = LSD 419.5 ± 63.0 vs. Ctrl 795.8 ± 109.3 ; D4 = LSD 311.11 ± 17.9 vs. Ctrl 830.2 ± 76.3 ; D5 = LSD 301.8 ± 38.4 vs. Ctrl 758.1 ± 90.9 mOsm/Kg). Similarly, the furosemide group presented lower osmolality when compared to the control in the last two days (D4 = Furo 309.3 ± 68.2 vs. Ctrl 830.2 ± 76.3 ; D5 = Furo 227.1 ± 46.2 vs. Ctrl 758.1 ± 90.9 mOsm/Kg).

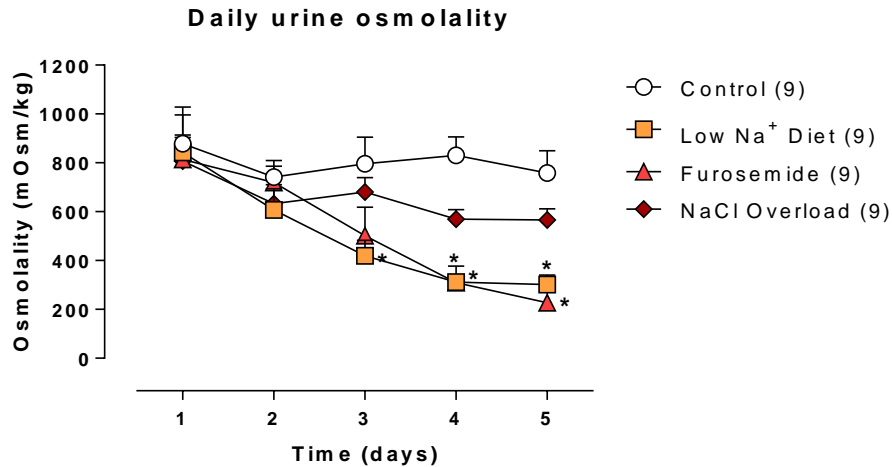


Figure 8. Daily urinary osmolality. Day 1 correspond to basal measurements and beginning of experimental protocol. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis.* P <0.05 when compared to the control.

The daily sodium excretion is represented on the Figure 9. The daily sodium excretion was similar in Furosemide and Low-Na groups, which were not statistically different from control. On the other hand, the sodium excretion from sodium-overloaded group had differed from control since day 2 ($6,2 \pm 0,9$ vs. $1,9 \pm 0,4$ mEq/day) to 5 ($8,7 \pm 2,5$ vs. $1,7 \pm 0,5$ mEq/day).

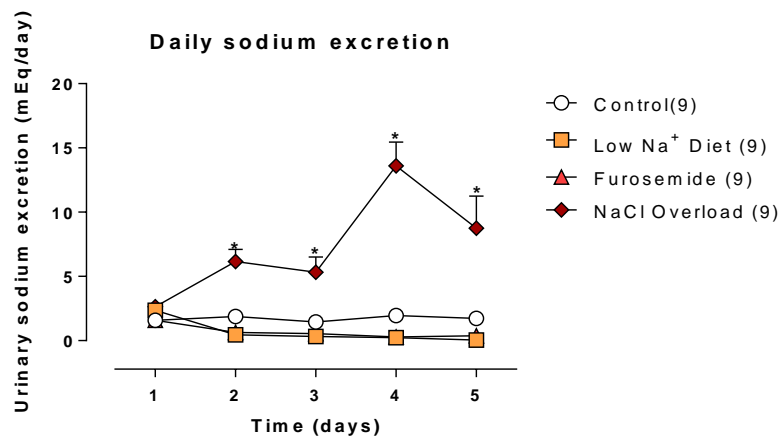


Figure 9. Daily sodium excretion. Day 1 correspond to basal measurements and beginning of experimental protocol. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

The following chart represents daily potassium excretion of animals submitted to different sodium content chows. The daily potassium excretion did not differ between the groups (LSD $0,6 \pm 0,05$; Furo $0,9 \pm 0,09$; SO $0,7 \pm 0,08$ vs. $0,6 \pm 0,1$).

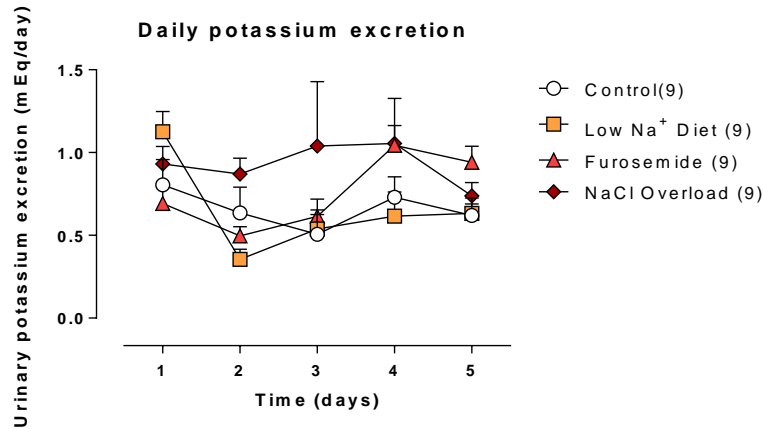


Figure 10. Daily potassium excretion. Day 1 correspond to basal measurements and beginning of experimental protocol. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * $P < 0.05$ when compared to the control.

The salt overload was able to increase urine volume significantly when compared to control due to increased glomerular filtration rate caused by volume expansion. This pattern was maintained during the four days of salt loading, due to the high consumption of solution with a high sodium concentration, by changing the kidneys functioning, what, in long-term could lead to damages to renal function, especially in salt-sensitive subjects (MATAVELLI *et al.* 2007). While the urinary volume on low-Na group was very similar to control throughout the experiment, the furosemide group showed a significant increase on its parameter from control group, only on the last day. Probably, a greater extent of $\text{Na}^+ / \text{K}^+ / 2\text{Cl}^-$ carriers are inhibited, due to a higher serum concentration of the drug. In man and dog this process seems to be well defined, where occurs a decrease in renal vascular resistance following an increase in the plasma flow and therefore enhancement of glomerular filtration. However, in rodents the results are controversial and may involve the release of renin (OPPERMANN *et al.* 2007).

When analysing the urine osmolality during the five days, we saw a gradual decrease in this parameter both in the furosemide group and a low-Na diet group. A similar pattern was not observed with the urinary sodium excretion of the low-Na diet group, which did not differ from control. This is not consistent with literature data where male Wistar rats were subjected to low-sodium diet during the same four-day period (MECAWI *et al.* 2013). However, in furosemide group the urinary sodium concentration found was also low, in part it can be explained by the low sodium intake, but it could also involve other mechanisms as the expression of NKCC transporters (NA *et al.*, 2003).

6.1.3 Evaluation of fluid intake and preference to sodium after restatement

The following figure shows the cumulative intake of hypertonic saline (0.3 M) after fluids restatement. Intake of hypertonic saline was significantly higher in furosemide and low-sodium groups compared with the control in the first 30 minutes (LSD 2.2 ± 0.3 and Furo 2.1 ± 0.8 vs. Ctrl 0.04 ± 0.03 mL/100g bw) and 1 hour (LSD 3.2 ± 0.5 and Furo 4.0 ± 1.1 vs. Ctrl 0.07 ± 0.04 mL/100g bw). Low-Na group continued to show higher intake compared to control at the times of 2 (LSD 3.4 ± 0.5 vs. Ctrl 0.1 ± 0.06 mL/100g bw), 3 (LSD 3.5 ± 0.5 vs. Ctrl 0.13 ± 0.08 mL/100g bw) and 4 hours (LSD 4.1 ± 0.8 vs. Ctrl 0.15 ± 0.08 mL/100g bw). But the furosemide group had significantly higher intake than the control group (2h Furo 6.8 ± 0.7 vs. Ctrl 0.1 ± 0.06 ; 3h Furo 7.8 ± 1.0 vs. Ctrl 0.13 ± 0.08 ; 4h Furo 8.5 ± 1.0 vs. Ctrl 0.15 ± 0.08 mL/100g bw) and Low-Na at the same times (2h Furo 6.8 ± 0.7 vs. LSD 3.4 ± 0.5 ; 3h Furo 7.8 ± 1.0 vs. LSD 3.5 ± 0.5 ; 4h Furo 8.5 ± 1.0 vs. LSD 4.1 ± 0.8 mL/100g bw).

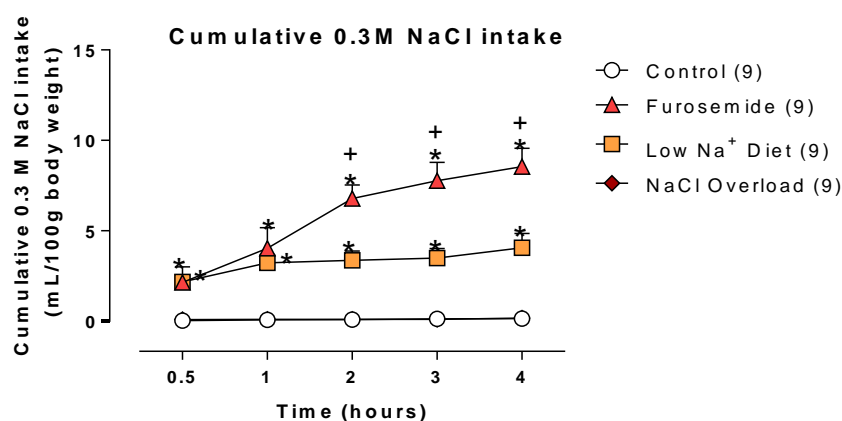


Figure 11. Cumulative intake saline 0.3 M. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * $p < 0.05$ when compared to control and + $P < 0.05$ compared to Diet low.

The graph below depicts the cumulative water intake after the reintroduction of fluids. The saline overload group had higher intake of water at all times when compared to control (0.5h SO 5.6 ± 0.52 vs. Ctrl 0.5 ± 0.03 ; 1h SO 6.1 ± 0.6 vs. Ctrl 0.08 ± 0.05 ; 2h SO 6.2 ± 0.6 vs. Ctrl 0.2 ± 0.1 ; 3h SO 6.3 ± 0.6 vs. Ctrl 0.3 ± 0.1 ; 4h SO 6.5 ± 0.6 vs. Ctrl 0.3 ± 0.1 mL/100g bw). Similarly, water intake was greater in the furosemide group and Low-Na at 2 (Furo 2.5 ± 0.8 and LSD 2.2 ± 0.4 vs. Ctrl 0.2 ± 0.1 mL/100g bw) 3

(Furo 3.0 ± 0.7 and LSD 2.5 ± 0.4 vs. Ctrl 0.3 ± 0.1 mL/100g bw) and 4 hours (Furo 3.59 ± 0.9 and LSD 2.7 ± 0.4 vs. Ctrl 0.3 ± 0.1 mL/100g bw) after restatement of fluids.

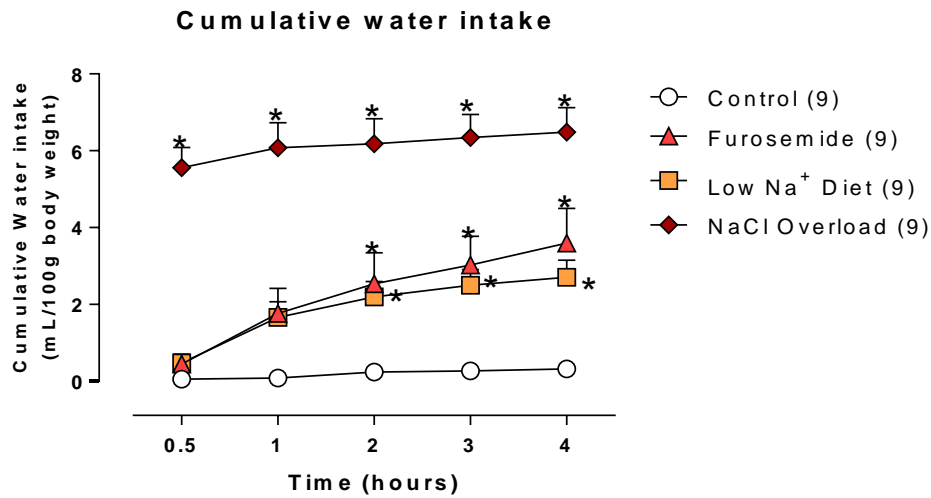


Figure 12. Cumulative water intake. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

The figure below shows the sodium preference ratio, i.e, the ratio between the volume of saline and the total volume ingested. Low-Na group showed a preference for sodium greater than the control at all assessment times (0.5 h = LSD 75.7 ± 10.7 vs. Ctrl 11.1 ± 7.3 ; 1h = LSD 67.2 ± 4.9 vs. Ctrl 22.2 ± 12.1 ; 2h LSD 61.5 ± 3.3 vs. Ctrl 19.7 ± 11.9 ; 3h LSD 59.1 ± 2.6 vs. Ctrl 28.1 ± 12.1 , 4 h LSD 60.1 ± 3.0 vs. Ctrl 28.5 ± 12.0 %). But the furosemide group presented it greater than control at 0.5 (Furo 44.1 ± 14.7 vs. Ctrl 11.1 ± 7.3 %); 2 (Furo 76.9 ± 6.7 vs. Ctrl 19.7 ± 11.9 %); 3 (Furo 72.9 ± 6.7 vs. Ctrl 28.1 ± 12.1 %) and 4 (Furo 71.9 ± 5.85 vs. Ctrl 28.5 ± 12.0 %).

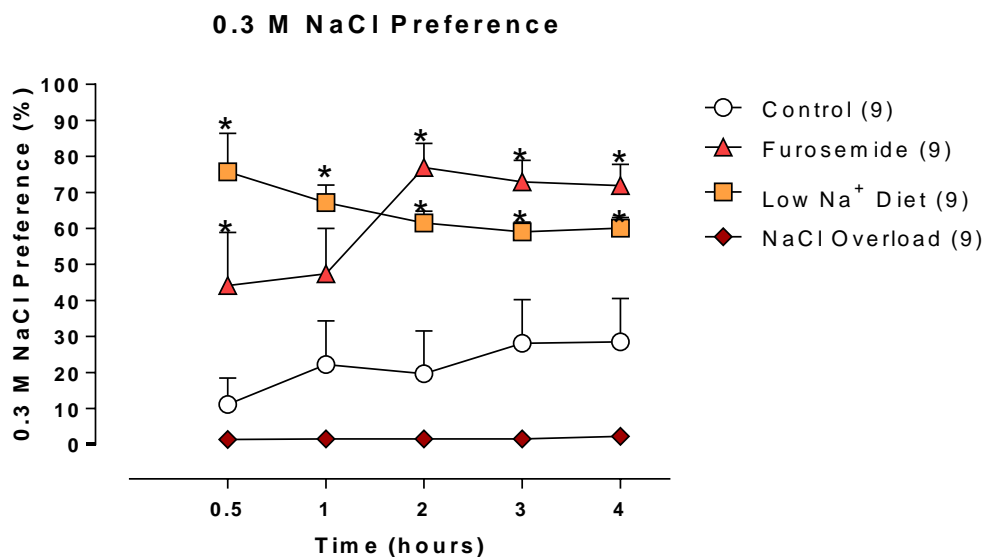


Figure 13. Preference Index for sodium. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

After the five-day trial, food and drinking bottles were removed from the animals for reintroduction of fluids, where each animal received two graduated bottles, one containing tap water and other containing saline 1.8%. As expected, the intake of hypertonic saline was greater in animals under low-sodium diet and those treated with furosemide in drinking water, where both groups showed a preference to sodium, as these conditions stimulate sodium appetite (JALOWIEC, 1974; MECAWI *et al.* 2013). Similarly, water intake in both groups was higher than the control, in similar way with sodium intake curve. Since the osmolality must be first corrected to later correct and keep the circulating volume, water intake occurs as a result of the initial sodium intake. Meanwhile, the group of animals treated with saline overload presented a higher water intake than control associated to a low sodium intake. These animals probably developed an aversive behaviour to sodium (GREENWOOD *et al.* 2014).

6.1.4 Evaluation of fluid intake and urine volume, osmolality; and sodium content and potassium in the urine after restatement of fluids

The following image represents the cumulative urinary volume in the times of two and four hours. The volume was significantly higher in the group furosemide when compared to control (Furo 6.5 ± 1.6 vs. Ctrl 1.4 ± 0.3 mL/100g bw).

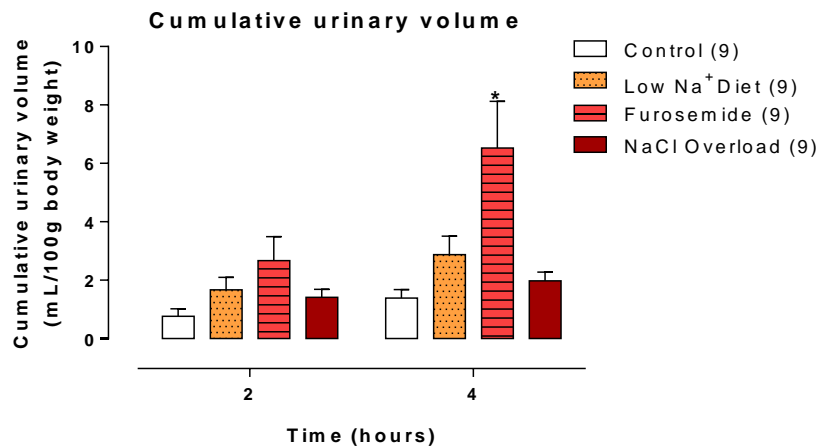


Figure 14. Cumulative urinary volume. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. *P <0.05 when compared to all other groups.

The graph below represents the osmolality obtained from the urine samples collected 2 and 3 hours after reintroduction of fluids. It was only observed significant differences from the third hour, where the NaCl overload group had a lower urinary osmolality when compared with the control (NaCl 170.7 ± 41.3 vs. Ctrl 384.9 ± 58.9 mOsm/kg).

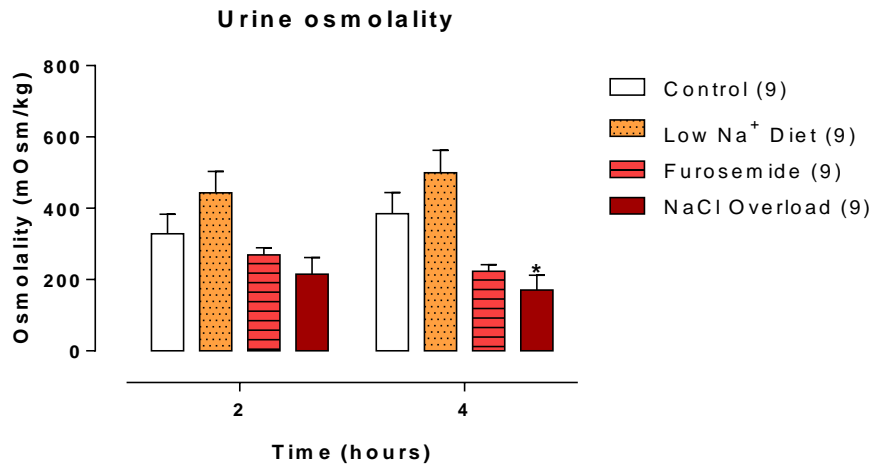


Figure 15. Cumulative urinary osmolality The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

The figure below shows urinary sodium concentration at the times of two and four hours after the reintroduction of fluids. We only observed significant different while comparing furosemide to control at the fourth hour of evaluation ($1,2 \pm 0,3$ vs. $0,2 \pm 0,04$ mEq/day).

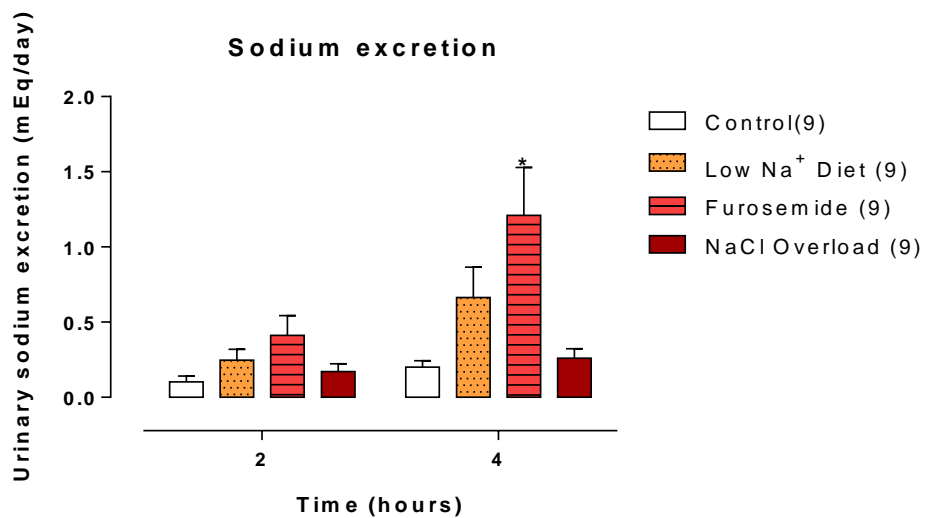


Figure 16. Urinary sodium excretion after fluid presentation. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis.

The following graph represents the urinary concentration of potassium in the times of two and four hours after the reintroduction of fluids. By the fourth hour low sodium diet and furosemide groups were significantly different from control (LSD $0,3 \pm 0,05$, Furo $0,3 \pm 0,05$ vs. $0,1 \pm 0,02$).

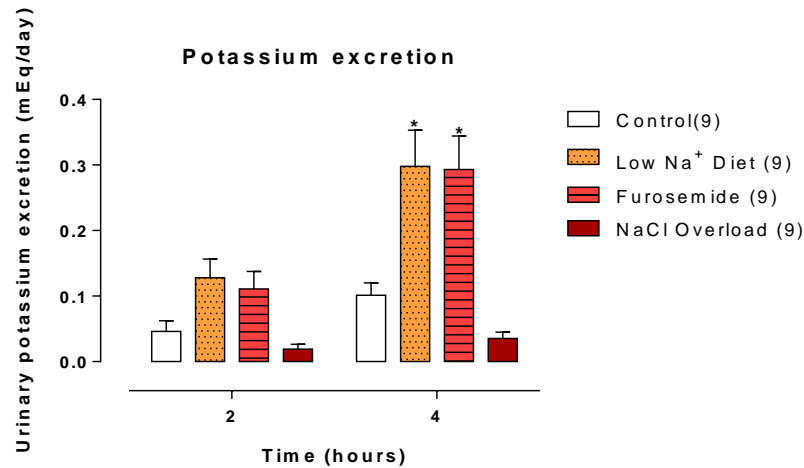


Figure 17. Urinary potassium excretion after fluid presentation. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

While assessing urinary volume after restatement of fluids, it was found significant differences only at the end of the four hours of experiment in the furosemide group compared to the control and poor diet. As the animals have access to water containing furosemide early in the assessment day, the large urinary volume probably due to the effect of the diuretic, added to high sodium intake at the moment of the experiment. The urine osmolality was significantly lower in the NaCl overload only by the fourth hour of evaluation, not presenting, however, a significant difference when it comes to sodium excretion, which was different only in the furosemide group by the end of evaluation. On the other hand, potassium excretion was higher both in furosemide and low sodium diet, similar to the daily evaluation of data, so that the water intake during the study period seems to have not been enough to restore electrolyte homeostasis in these subjects.

6.2 Plasma Parameters Of Animals Subjected To Sodium Intake Changes During Four Days

The figure 18 shows haematocrit evaluation after four days of experimental protocols with different sodium diets. It was not observed significant differences between the treated groups and the Control (Low-Na 46.6 ± 0.9 , Furo 48.6 ± 1.2 SO 47.4 ± 0.8 vs. Ctrl 45.4 ± 0.5 %).

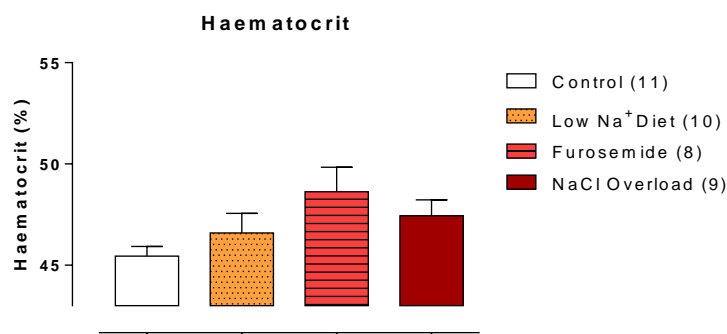


Figure 18. Haematocrit of animals undergoing alterations in the sodium content intake at the end of four days of diet. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 did not observe significant differences.

The plasma osmolality at the end of the 4 days of experimental protocol was also evaluated, as shown in figure 19. Only SO overload group had a significant increase when compared to the control (SO 293.5 ± 2.9 vs. Ctrl 262.3 ± 2.3 mOsm/Kg, $p < 0.05$).

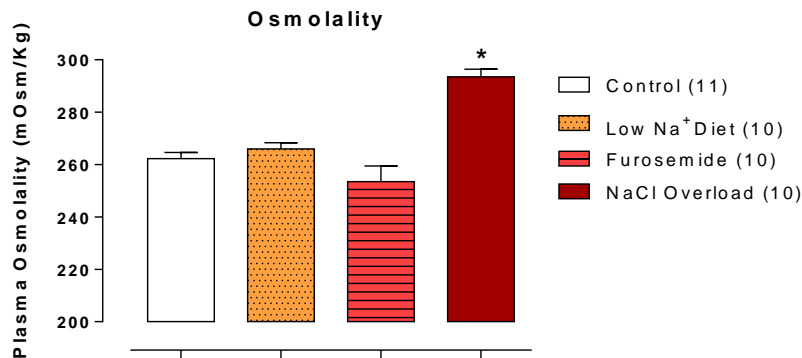


Figure 19. Plasma osmolality. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * $P < 0.05$ when compared to the control, poor diet and the group furosemide.

The plasma sodium concentration is represented in figure 20. The plasma sodium concentration was significantly higher in the NaCl overload and Low-Na group when compared to control (SO 163.7 ± 1.6 and LSD 148.7 ± 1.8 vs. Ctrl 143.2 ± 0.7 mEq/L).

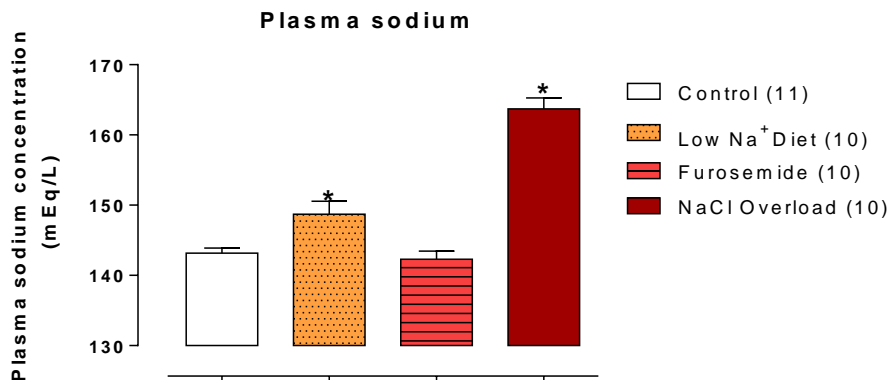


Figure 20. Plasma sodium concentration. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * $P < 0.05$ when compared to the control.

Finally, we did not observed differences in plasma potassium concentration in experimental groups when compared to control, as shown in figure 20 (LSD 11.4 ± 0.7 ; Furo 10.1 ± 0.3 and SO 11.7 ± 0.5 vs. Ctrl 10.7 ± 0.3 mEq/L).

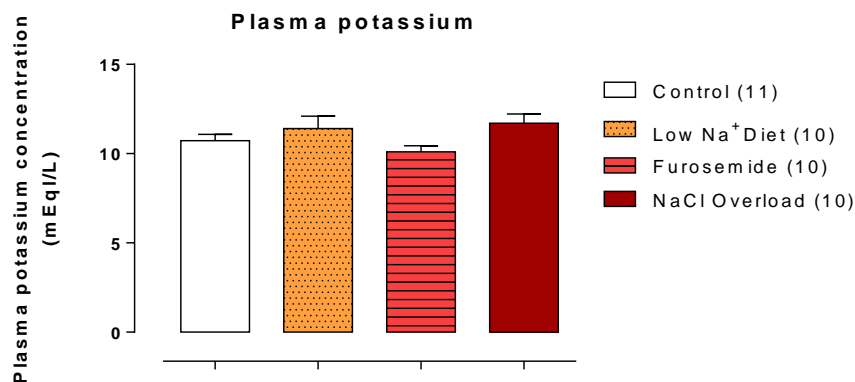


Figure 21. Plasma potassium concentration. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

During the assessment of the plasma parameters, no significant differences were found between the groups. However, regarding haematocrit, it is noteworthy that the difference between the number of animals in each experimental group may have influenced this parameter, since during processing, some samples were destroyed, making the evaluation impossible. However, when evaluating plasma osmolality, we found a significant increase in saline overload group befitting the challenge to which it was submitted. The results of plasma sodium, confirmed the increased osmolality due to the excess of this ion in plasma. However, surprisingly, we observed a higher plasma sodium content also in low-Na group. Once the urinary volume and sodium excretion in these animals is comparable to the control group, this significant result apparently is not only due to an increased renal sodium retention caused by RAAS activation and other renal and endocrine mechanisms. It is possible that during this period of deprivation sodium present in the reservoir is drawn, in order to avoid significant decrease in osmolality due to low plasma sodium (SCHAFFLHUBER et al. 2007; TITZE, 2015). Furthermore, furosemide in drinking water during this period was not able to induce hyponatremia, perhaps for reasons. Likewise, plasma concentrations of potassium remained similar in all groups.

6.3 Cardiac Parameters Of Animals Subjected To Sodium Intake Changes During Four Days

The graph below represents the mean arterial pressure (MAP) of the four groups obtained initially under baseline conditions. And in a second moment after challenging baroreflex and finally, after osmotic challenge. The furosemide group presented MAP lower than the control group after administration of phenylephrine in doses of 10 and 50 µg/mL (Phe10 = Furo 142.6 ± 19.1 vs. Ctrl 222.4 ± 14.2; Phe50 = Furo 261.0 ± 74.8 vs. Ctrl 190.9 ± 19.6 mmHg).

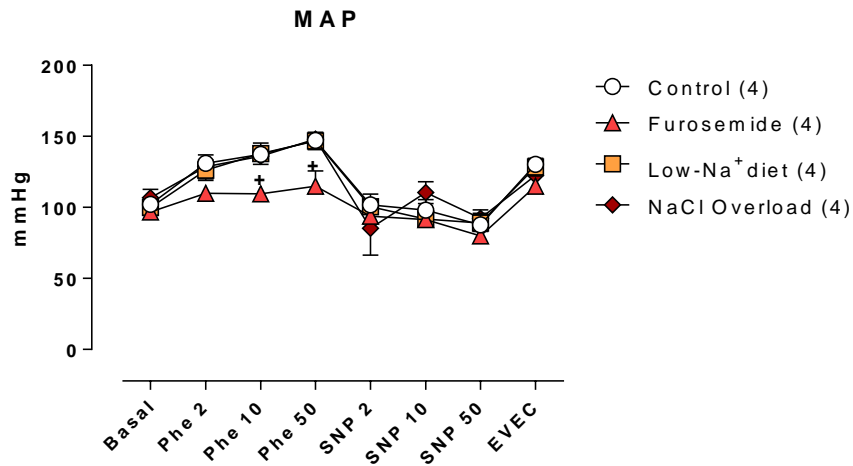


Figure 22. Mean arterial pressure in response to phenylephrine, sodium nitroprusside and expansion of hypertonic volume. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. + P <0.05 compared to control and other groups.

Table 1. Heart rate values of the experimental groups represented as mean \pm SEM.

Heart Rate (HR) in bpm				
	Control	Furosemide	Low-Na	NaCl overload
Basal	207.2 \pm 7.1	214.5 \pm 7.9	198.7 \pm 11.1	219.6 \pm 5.5
Phe 2	208.7 \pm 24.7	156.4 \pm 29.5	226.6 \pm 28.9	156.8 \pm 14.0
Phe 10	222.4 \pm 14.2	142.6 \pm 19.1	195.5 \pm 21.1	162.1 \pm 8.4
Phe 50	190.9 \pm 19.6	261.0 \pm 74.8	183.3 \pm 12.7	164.5 \pm 7.7
SNP 2	230.4 \pm 2.0	189.0 \pm 20.4	217.7 \pm 19.5	202.4 \pm 28.1
SNP 10	176.0 \pm 12.3	219.3 \pm 28.7	245.3 \pm 16.5	200.0 \pm 16.5
SNP 50	187.6 \pm 32.3	201.5 \pm 28.8	228.6 \pm 22.2	254.2 \pm 35.0
EVEC	227.1 \pm 7.1	204.3 \pm 31.4	201.4 \pm 24.8	227.8 \pm 2.7

During the evaluation of cardiac parameters, no significant differences in HR or MAP were observed between the groups at baseline conditions. However, when assessing the integrity of the baroreflex sensibility, furosemide group had a lower response to phenylephrine doses which are known to increase blood pressure (SMYTH *et al.* 1969). The increase in blood pressure by phenylephrine leads to pressor stimulus of baroreceptors, causing a reflex decrease in heart rate. However, with furosemide group that do not seem to occur, probably due to hypovolemia caused by fluids loss. However, from the results observed, it is possible that the hypovolemia caused by this dose of furosemide in water is not comparable to that induced by subcutaneous administration of

the drug in the lowest dose. Moreover, contrary to what was expected, NaCl overload was not able to significantly increase blood pressure, which leads us to believe that in this short period, the recruitment of adaptive mechanisms is able to maintain cardiovascular homeostasis. This can be inferred, since experiments using sodium overload for longer periods were able to cause changes in MAP and HR in Wistar rats (SANTOS *et al.* 2006).

6.4 Quantification of mRNA by qPCR

The graph below represents the AVP mRNA expression in the PVN after four days of treatment. The mRNA expression was higher in the NaCl overload (SO 2.61 ± 0.16 vs. Ctrl 1.04 ± 0.04 a.u.) and lower in low-Na group (LSD 0.65 ± 0.07 vs. Ctrl 1.04 ± 0.04 a.u.) compared with the control.

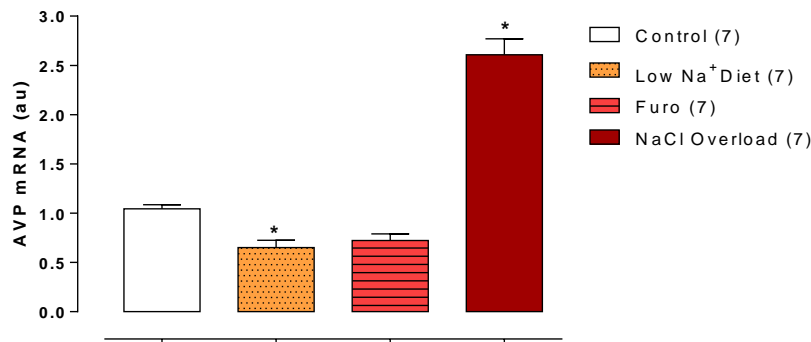


Figure 23. Effect of dietary sodium content over AVP mRNA expression. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

The graph below represents the OT mRNA expression in the PVN after four days of treatment. Similarly to the previous result, the mRNA expression was higher in the NaCl overload group (SO 1.52 ± 0.12 vs. Ctrl 1.01 ± 0.05 a.u.) and lower in low-sodium (LSD 0.65 ± 0.06 vs. Ctrl 1.01 ± 0.05 a.u.) compared with the control.

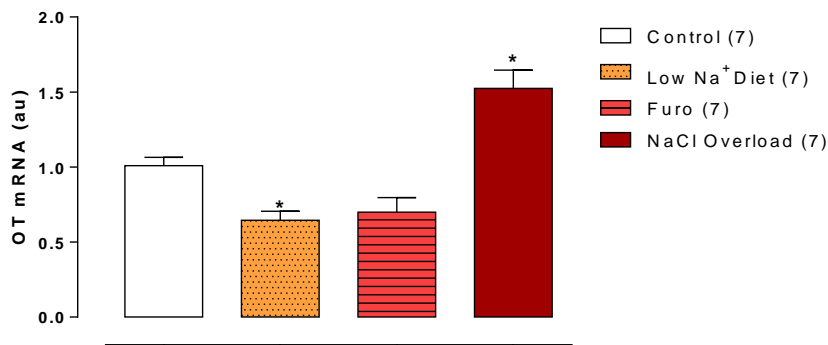


Figure 24. Effect of dietary sodium content over the OT mRNA expression. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P <0.05 when compared to the control.

The graph below represents the mRNA expression of the AT1 receptor in the PVN after four days of treatment. The mRNA expression was higher in the salt overload group (NaCl 2.94 ± 0.26 vs. Ctrl 1.14 ± 0.25 a.u.) and Furosemide group (Furo 3.08 ± 0.51 vs. Ctrl 1.14 ± 0.25 a.u.) when compared to control.

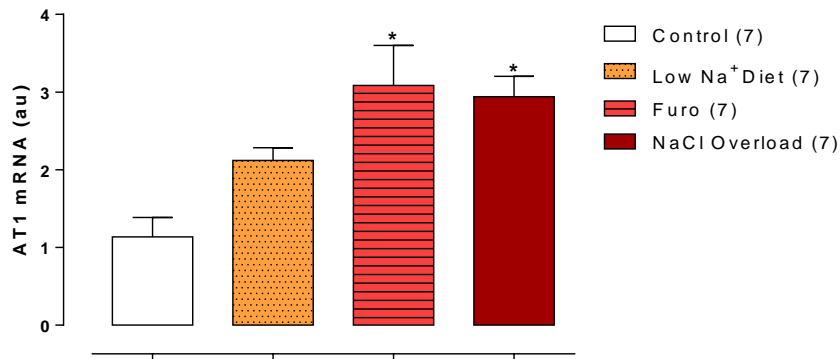


Figure 25. Effect of dietary sodium content on AT1 mRNA expression in the PVN. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. * P < 0.05 when compared to the control.

The graph below represents the expression of mRNA of the AT2 receptor in the PVN after four days of treatment. The mRNA expression showed no significant differences between groups when compared to control (LSD 1.75 ± 0.25 ; Furo 1.30 ± 0.19 and SO 1.58 ± 0.1 vs. Ctrl 1.08 ± 0.2 a.u.).

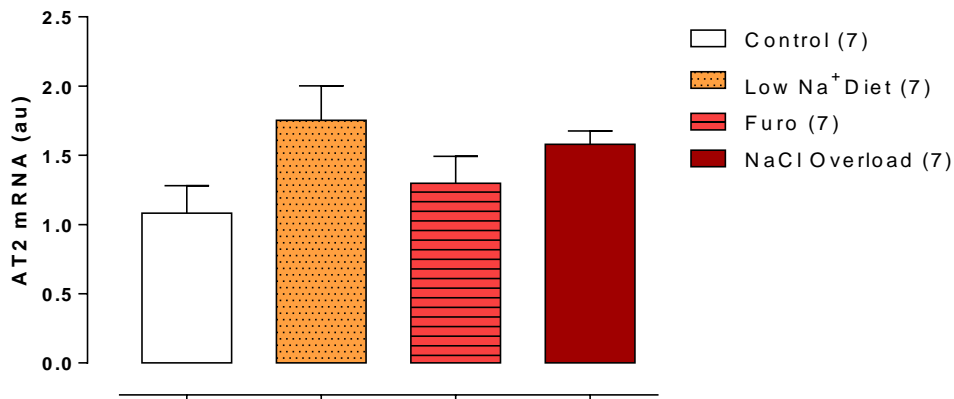


Figure 26. Effect of dietary sodium content on AT2 mRNA expression in PVN. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. p > 0.05.

The graph below represents the mRNA expression of MAS receptor in the PVN after four days of treatment. The mRNA expression showed no significant differences between groups when compared to control (LSD 0.94 ± 0.04 ; Furo 1.31 ± 0.10 and SO 1.21 ± 0.10 vs. Ctrl 1.07 ± 0.15 a.u.).

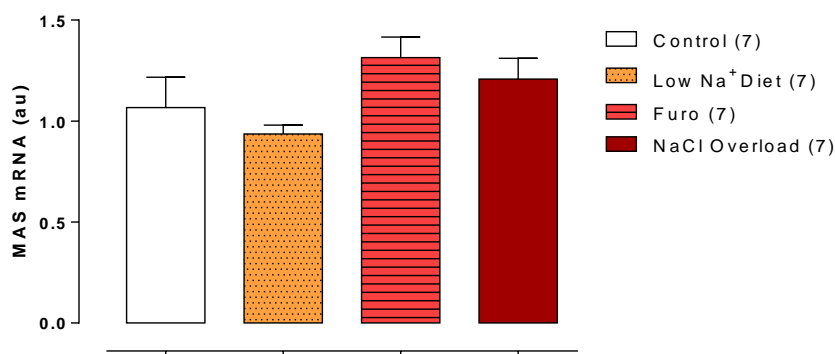


Figure 27. Sodium content change effects in the diet for four days on the AT1 mRNA expression in the PVN. The number of animals per group is described in the figure, between parenthesis. $p > 0.05$.

Finally, we analysed the mRNA expression in the PVN of the experimental groups and found that salt overload was able to significantly increase the mRNA levels of AVP and OT, which is consistent with the literature, since high osmolality is able to increase the release of AVP and OT and also their mRNA expression (BALMENT *et al.* 1980; DUNN *et al.* 1973; VENTURA *et al.* 2005). As the animals subjected to the overload also had hypernatremia, this alteration was sufficient to stimulate the release and secretion of AVP and OT in order to increase retention of water and sodium excretion. The increase in the mRNA of the OT is also a possible mechanism involving the reduction of food intake and aversion sodium in these animals (VERBALIS *et al.* 1993).

Otherwise, the low-sodium diet for four days led to a reduction on AVP and OT mRNA expression. In this case, despite the fact animal did not present a significant reduction in plasma osmolality which would be not enough to inhibit the secretion of AVP and OT, a reduced mRNA expression may reflect the low sodium concentrations detected by the sensors to sodium in the OSF in some other moment, leading to inhibition of magnocellular cells with the purpose of reducing water retention, sodium excretion, and maybe increase mobilization of its ion reservoir in order to avoid hyponatremia.

Interestingly, both furosemide and NaCl overload groups had an increase in mRNA for AT1, but not AT2 or MAS. This highlights the importance of central SRA in these groups. In fact, depletion caused by furosemide leads to increased production of ANG II and aldosterone peripherally and concomitantly neurons within SFO, OVLT, MnPO, SON and PVN increase their activities and also AT1mRNA expression (CHARRON *et al.* 2002). However, the increase of this receptor expression in animals subjected to sodium overload seems controversial, since activation of these receptors by ANG II are related to increase in water intake and sodium appetite. However, the literature contains variable information about the possible role of the AT1 on sodium sensitivity (ENDO *et al.* 2009), so that the increased expression of these receptors could represent early maladaptive responses to sodium overload, once it's known that some of these neurons also projects to regions like RVLM (CATO; TONEY, 2005; TAGAWA; DAMPNEY, 1999).

7 CONCLUSIONS

Although much progress has been made in recent years in the area of hydroelectrolytic balance, much still needs to be elucidated. Especially with regard to regulation / deregulation of sodium appetite and the possible connection to cases of hypertension. The various results of scientific literature can be explained in part by the use of different strains of animals. While some animals present salt-sensitivity pattern, others seem to be resistant to that phenotype. However, a common thread seems to excel in most of the cases; as we see in this work, the involvement of neuroendocrine systems such as central and peripheral RAS appear to be key points for the installation of homeostatic alterations. Thus, the study of the components of these central pathways, as well as its gene regulation seem to emerge as a promising way to answer lingering doubts about the link between imbalances of hydroelectrolytic homeostasis and cardiovascular alterations.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS / REFERENCES

- AGARWAL, M. K.; MIRSHAHI, M. General overview of mineralocorticoid hormone action. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 84, n. 3, p. 273–326, 1999.
- ALZAMORA, A. C.; SANTOS, R. A. S. Hypotensive effect of ANG II and ANG- (1 – 7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms. p. 1187–1195, 2002.
- ANDERSSON, B. Regulation of water intake. **Physiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 582, 1978.
- ANDRESEN, M. C. Nucleus tractus solitarius - gateway to neural circulatory control. p. 93–116, 1994.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological reviews**, v. 84, n. 1, p. 169–208, 2004.
- AZMITIA, E. C.; SEGAL, M. An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. **The Journal of comparative neurology**, v. 179, n. 3, p. 641–667, 1978.
- BADAUÊ-PASSOS, D. et al. Dorsal raphe nuclei integrate allostatic information evoked by depletion-induced sodium ingestion. **Experimental Neurology**, v. 206, n. 1, p. 86–94, 2007.
- BALMENT, R. J.; BRIMBLET, M. J.; FORSLING, M. L. RELEASE OF OXYTOCIN INDUCED BY SALT LOADING AND ITS. p. 439–449, 1980.
- BATUMAN, V. Salt and Hypertension: An Evolutionary Perspective. **Journal of Hypertension: Open Access**, v. 01, n. 03, p. 1–3, 2012.
- BECKER, L. K. et al. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. p. 1416–1424, 2007.
- BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H.; RICHARD, D. **Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation. Frontiers in neuroendocrinology**, 1994. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0091302284710107>>
- CATO, M. J.; TONEY, G. M. Angiotensin II excites paraventricular nucleus neurons that innervate the rostral ventrolateral medulla: an in vitro patch-clamp study in brain slices.

Journal of neurophysiology, v. 93, n. 1, p. 403–13, 2005.

CAVALCANTE-LIMA et al. Chronic excitotoxic lesion of the dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica [et al]**, v. 38, n. 11, p. 1669–1675, 2005a.

CAVALCANTE-LIMA, H. R. et al. Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. **Neuroscience letters**, v. 374, n. 1, p. 5–10, 2005b.

CHARRON, G. et al. Acute sodium deficit triggers plasticity of the brain angiotensin type 1 receptors. **The FASEB Journal**, 2002.

CHENG, W. et al. Renin activates PI3K-Akt-eNOS signalling through the angiotensin AT 1 and Mas receptors to modulate central blood pressure control in the nucleus tractus solitarii. 2012.

CIRILLO M1, CAPASSO G, DI LEO VA, D. S. N. Am J Nephrol. **Am J Nephrol**, v. 14, n. (4-6), p. 426–31, 1994.

CIURA, S., B. C. W. Transient Receptor Potential Vanilloid 1 Is Required for Intrinsic Osmoreception in Organum Vasculosum Lamina Terminalis Neurons and for Normal Thirst Responses to Systemic Hyperosmolality. **Journal of Neuroscience**, v. 26, n. 35, p. 9069–9075, 2006.

D. S. COLOMBARI, J. V. MENANI, A. K. J. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 271, n. 6, p. R1470–R1476, 1996.

DAHL, L. K. Possible role of salt intake in the development of essential hypertension. **International Journal of Epidemiology**, v. 34, n. 5, p. 967–972, 2005.

DENTON, B. D. A.; SABINE, J. R. THE SELECTIVE APPETITE FOR Na + SHOWN BY Na + -DEFICIENT SHEEP From the Department of Physiology , University of Melbourne , Victoria , Australia In view of the importance of Na + equilibrium to normal function of higher species , an innate behaviour patt. p. 97–116, 1961.

DUNN, F. L. et al. The Role of Blood Osmolality and Volume. v. i, n. December, p.

3212–3219, 1973.

ENDO, S. et al. Blockade of angiotensin II type-1 receptor increases salt sensitivity in Sprague – Dawley rats. v. 32, n. 6, p. 513–519, 2009.

EPSTEIN, A N.; FITZSIMONS, J. T.; ROLLS, B. J. Drinking induced by injection of angiotensin into the brain of the rat. **The Journal of physiology**, v. 210, n. 2, p. 457–474, 1970.

FALK, J. L. AND LIPTON, J. M. Temporal factors in the genesis of NaCl appetite by intraperitoneal dialysis. **J Comp Physiol Psychol**, n. 63, p. 247–251., 1967.

FERRARIO, C. M. et al. An Evolving Story of ANgiotensin II Forming Pathways in Rodents and Humans. **Clin Sci (Lond.)**, v. 126, n. 7, p. 461–469, 2014.

FITZSIMONS, B. J. T.; SIMONS, B. J. THE EFFECT ON DRINKING IN THE RAT OF INTRAVENOUS INFUSION OF ANGIOTENSIN , GIVEN ALONE OR IN COMBINATION WITH OTHER STIMULI OF THIRST. **J. Physiol.**, n. 203, p. 45–57, 1969.

FITZSIMONS, J. T. et al. Angiotensin , Thirst , and Sodium Appetite. v. 78, n. 3, p. 583–687, 1998.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiological reviews**, v. 78, n. 3, p. 583–686, 1998.

FRANCHINI, L. F. et al. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 282, n. 1, p. R235–43, 2002.

FRY M, F. A. The sensory circumventricular organs: brain targets for circulating signals controlling ingestive behavior. **Physiol Behav**, v. 24;91, n. 4, p. :413–23, 2007.

GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Central regulation of sodium appetite. **Experimental Physiology**, v. 93, n. 2, p. 177–209, 2008.

GODINO, A. et al. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers? **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 293, n. 3, p. R1027–R1036, 2007.

GODINO, A. et al. Body sodium overload modulates the firing rate and fos immunoreactivity of serotonergic cells of dorsal raphe nucleus. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e74689, 2013.

GREENWOOD, M. P. et al. Salt appetite is reduced by a single experience of drinking hypertonic saline in the adult rat. **PloS one**, v. 9, n. 8, p. e104802, 2014.

HOFMEISTER, L. H.; PERISIC, S.; TITZE, J. Tissue sodium storage: evidence for kidney-like extrarenal countercurrent systems? **Pflügers Archiv : European journal of physiology**, v. 467, n. 3, p. 551–8, 2015a.

HOFMEISTER, L. H.; PERISIC, S.; TITZE, J. **Tissue sodium storage: evidence for kidney-like extrarenal countercurrent systems?Pflügers Archiv : European journal of physiology**, 2015b. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25600900>>

IMPORTANCE, T. R. Section of Comparative Medicine President ' s Address The Relative Importance of. v. 65, p. 631–634, 1972.

J, V. A.; J, C. Mechanism of the Effects of Furosemide on Renin Secretion in Anesthetized Dogs. **Circulation Research**, v. 25, n. 2, p. 145–152, 1969.

JACKSON, F. L. An evolutionary perspective on salt, hypertension, and human genetic variability. **Hypertension**, v. 17, p. I129–I132, 1991.

JE, J. Sodium appetite elicited by furosemide: effects of differential dietary maintenance. **Behav Biol**, n. 10, p. 313–327, 1974.

KOPP, C. et al. ²³Na Magnetic Resonance Imaging-Determined Tissue Sodium in Healthy Subjects and Hypertensive Patients. **Hypertension**, v. 61, n. 3, p. 635–640, 2013.

LECHNER, S. G. et al. The molecular and cellular identity of peripheral osmoreceptors. **Neuron**, v. 69, n. 2, p. 332–344, 2011.

LIMA, S. G. DE et al. Review Article Renin-Angiotensin System : is it Possible to Identify Hypertension Susceptibility Genes ? **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, p. 389–395, 2007.

LIND RW, T. R. & J. A. The subfornical organ and the integration of multiple factors in thirst. **Physiology and Behavior**, v. 32, p. 69–74., 1984.

MATAVELLI, L. C. et al. Salt loading produces severe renal hemodynamic dysfunction independent of arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 292, n. 2, p. H814–H819, 2007.

MCKINLEY, M. J.; HARDS, D. K.; OLDFIELD, B. J. Identification of neural pathways activated in dehydrated rats by means of Fos-immunohistochemistry and neural tracing. **Brain research**, v. 653, n. 1-2, p. 305–14, 1994.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **News in physiological sciences: an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society**, v. 19, p. 1–6, 2004.

MECAWI, A S. et al. The role of angiotensin II on sodium appetite after a low-sodium diet. **Journal of neuroendocrinology**, v. 25, n. 3, p. 281–91, 2013.

MICHELL AR. **The clinical biology of sodium**. New York: Elsevier, 1995.

MOE KE, WEISS ML, E. A. Sodium appetite during captopril blockade of endogenous angiotensin II formation. **Am J Physiol.**, v. 247, n. 2 Pt 2, p. R356–65., 1984.

MOINIER, B. M.; DRÜEKE, T. B. Aphrodite, sex and salt--from butterfly to man. **Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association**, v. 23, n. 7, p. 2154–61, 2008.

NA, K. I. Y. et al. Upregulation of Na⁺ transporter abundances in response to chronic thiazide or loop diuretic treatment in rats. p. 133–143, 2003.

NEILL, J. C.; COOPER, S. J. Selective reduction by serotonergic agents of hypertonic saline consumption in rats: evidence for possible 5-HT_{1C} receptor mediation. **Psychopharmacology**, v. 99, n. 2, p. 196–201, 1989.

NODA, M. Sodium-level-sensitive Sodium Channel and Salt-Intake Behavior. **Chemical Senses**, v. 30, n. Supplement 1, p. i44–i45, 2005.

OLIVARES, E. L. et al. Effect of electrolytic lesion of the dorsal raphe nucleus on water intake and sodium appetite. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 36, n. 12, p. 1709–1716, 2003.

OPPERMANN, M. et al. Vasodilatation of afferent arterioles and paradoxical increase of renal vascular resistance by furosemide in mice. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 293, n. 1, p. F279–87, 2007.

PAXINOS, G. WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. [s.l.]. [s.l.] Elsevier Academic Press, 2005.

PEDRINO, G. R. et al. Role of catecholaminergic neurones of the caudal ventrolateral medulla in cardiovascular responses induced by acute changes in circulating volume in rats. **Experimental physiology**, v. 91, n. 6, p. 995–1005, 2006.

POLLAK DOROCIC, I. et al. A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. **Neuron**, v. 83, n. 3, p. 663–678, 2014.

RAKOVA, N. et al. Long-term space flight simulation reveals infradian rhythmicity in human Na⁺ balance. **Cell Metabolism**, v. 17, n. 1, p. 125–131, 2013.

ROUAH-ROSILIO M, OROSCO M, N. S. Serotonergic Modulation of Sodium Appetite in the Rat. v. 55, n. 5, p. 811–816, 1994.

RUIZ-ORTEGA, M. et al. Role of the renin-angiotensin system in vascular diseases: expanding the field. **Hypertension**, v. 38, n. 6, p. 1382–1387, 2001.

SAKAI, E. G. K. AND R. R. Richter and sodium appetite: from adrenalectomy to molecular biology. **Appetite**, v. 49, n. 2, p. 353–367, 2007.

SANADA, H.; JONES, J. E.; JOSE, P. A. Genetics of salt-sensitive hypertension. **Current Hypertension Reports**, v. 13, n. 1, p. 55–66, 2011.

SANTOS, L. DOS et al. Effects of high sodium intake diet on the vascular reactivity to phenylephrine on rat isolated caudal and renal vascular beds : Endothelial modulation. v. 78, p. 2272–2279, 2006.

SANTOS, R. A. S. et al. G protein-coupled receptor Mas. 2003.

SANTOS, R. A. S.; FERREIRA, A. J.; SIM, A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2 – angiotensin (1 – 7)– Mas axis. p. 519–527, 2008.

SAWCHENKO PE, S. L. Central Noradrenergic Pathways for the Integration of Hypothalamic Neuroendocrine and Autonomic Responses. v. 214, n. 4521, p. 685–7, 1981.

SCHAFFLHUBER, M. et al. Mobilization of osmotically inactive Na⁺ by growth and by dietary salt restriction in rats. **American journal of physiology. Renal physiology**, v. 292, n. 5, p. F1490–F1500, 2007.

SCHWARTZBAUM, J. S., W. H. AN OSMOTIC FACTOR IN THE REGULATION OF FOOD INTAKE IN THE RAT. **J. Comp. Physiol. Psychol.**, v. 51, n. 8, p. 555–560, 1958.

SHARIF NAEINI, R. et al. An N-terminal variant of Trpv1 channel is required for osmosensory transduction. **Nature neuroscience**, v. 9, n. 1, p. 93–8, 2006.

SMITH, C. A et al. Presystemic influences on thirst, salt appetite, and vasopressin secretion in the hypovolemic rat. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 292, n. 5, p. R2089–R2099, 2007.

SMYTH, H. et al. Reflex Regulation of Arterial Pressure during Sleep in Man: a quantitative method of assessing baroreflex sensitivity. v. XXIV, n. January, p. 109–122, 1969.

SONKODI, S. et al. RESPONSE OF THE RENIN-ANGIOTENSIN-ALDOSTERONE SYSTEM TO UPRIGHT TILTING AND TO INTRAVENOUS FRUSEMIDE : EFFECT OF PRIOR METOPROLOL AND PROPRANOLOL. **Br. J. clin. Pharmac.**, v. 13, p. 341–350, 1982.

STELLAR, E. Salt appetite: its neuroendocrine basis. **Acta neurobiologiae experimentalis**, v. 53, n. 3, p. 475–84, 1993.

STRICKER E.M. AND JALOWIEC J.E. Restoration of intravascular fluid volume following acute hypovolemia in rats. **Am J Physiol**, v. 218, p. 191–196, 1970.

SUSAN, L.; TAYLOR, K.; VAN, D. The role of volume depletion, antidiuretic hormone and angiotensin II in the furosemide-induced decrease in mesenteric conductance in the dog. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 219, n. 2, 1981.

SWANSON, L. G. S. AND L. W. Drinking induced by injections of angiotensin into forebrain and mid-brain sites of the monkey. **J Physiol.**, v. 239, n. 3, p. 595–622, 1974.

TAGAWA, T.; DAMPNEY, R. A. AT(1) receptors mediate excitatory inputs to rostral ventrolateral medulla pressor neurons from hypothalamus. **Hypertension**, v. 34, n. 6, p. 1301–7, 1999.

TANAKA J, USHIGOME A, H. K. & N. M. Response of raphe nucleus projecting subfornical organ neurons to angiotensin II in rats. **Brain Research Bulletin**, v. 45, p. 315–318., 1998.

TITZE, J. et al. Glycosaminoglycan polymerization may enable osmotically inactive Na⁺ storage in the skin. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 287, n. 1, p. H203–H208, 2004.

TITZE, J. Sodium balance is not just a renal affair. **Conh**, v. 23, n. 2, p. 101–5, 2014.

TITZE, J. A different view on sodium balance. **Current opinion in nephrology and hypertension**, v. 24, n. 1, p. 14–20, 2015.

VENTURA, R. R. et al. Neuronal nitric oxide synthase inhibition differentially affects oxytocin and vasopressin secretion in salt loaded rats. **Neuroscience letters**, v. 379, n. 2, p. 75–80, 2005.

VERBALIS, E. M. S. AND J. G. Hormones and Behavior: The Biology of Thirst and Sodium Appetite. **Scientist, American**, v. 76, n. 3 (May-June), p. 261–267, 1988.

VERBALIS, J. G. et al. Central oxytocin inhibition of food and salt ingestion: a mechanism for intake regulation of solute homeostasis. **Regulatory Peptides**, v. 45, n. 1-2, p. 149–154, 1993.

VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. **Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 471–503, 2003.

VERNEY, E. B. The Antidiuretic Hormone and the Factors Which Determine Its Release. **Proc R Soc Lond B Biol Sci.**, v. 135, n. 878, p. 25–106, 1947.

VIVAS, L. et al. Neurochemical Circuits Subserving Fluid Balance and Baroreflex: A Role for Serotonin, Oxytocin, and Gonadal Steroids. In: DE LUCA LA JR, MENANI JV, J. A. (Ed.). . **Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration**. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2014.

W.F. GANONG, P.J. MULROW, A. B. AND G. C. Evidence for a direct effect of angiotensin-II on adrenal cortex of the dog. **Proc Soc Exp Biol Med.**, v. Feb, n. 109, p. 381–4., 1962.

WANG, D. H. et al. Regulation of Type 1 Angiotensin II Receptor in Adrenal Gland :

Role of α_1 -Adrenoreceptor. **Hypertension**, v. 30, n. 3, p. 345–350, 1997.

WATANABE, E. et al. Nav2/NaG channel is involved in control of salt-intake behavior in the CNS. **The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience**, v. 20, n. 20, p. 7743–7751, 2000.

WATANABE, E. et al. Nax sodium channel is expressed in non-myelinating Schwann cells and alveolar type II cells in mice. **Neuroscience Letters**, v. 330, n. 1, p. 109–113, 2002.