



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE ANG II (AT1 E AT2)
CENTRAL SOBRE RESPOSTAS CARDIOVASCULARES INDUZIDAS
POR SALINA HIPERTÔNICA INTRAGÁSTRICA EM RATOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

KÁSSIA KRISTINA SOUSA

**GOIÂNIA-GO
2018**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS
DE TESES E
DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

1. Identificação do material bibliográfico: ☒ **Dissertação** ☐ **Tese**

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

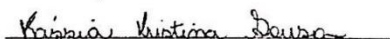
Nome completo do autor: Kássia Kristina Sousa

Título do trabalho: Participação dos receptores de ang II (at1 e at2) central sobre respostas cardiovasculares induzidas por salina hipertônica intragástrica em ratos com hipertensão renovascular.

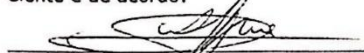
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento ☒ **SIM** ☐ **NÃO**¹

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)²

Data: 28 / 02 / 2019

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data da defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

²A assinatura deve ser escaneada.

KÁSSIA KRISTINA SOUSA

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE ANG II (AT1 E AT2)
CENTRAL SOBRE RESPOSTAS CARDIOVASCULARES INDUZIDAS
POR SALINA HIPERTÔNICA INTRAGÁSTRICA EM RATOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Farmacologia e Fisiologia

Orientador: Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira

GOIÂNIA-GO

2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Kristina Sousa, Kássia

PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE ANG II (AT1 E AT2)
CENTRAL SOBRE RESPOSTAS CARDIOVASCULARES INDUZIDAS
POR SALINA HIPERTÔNICA INTRAGÁSTRICA EM RATOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR [manuscrito] /

Kássia Kristina Sousa. -
2018. li, 51 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Andre Henrique Freiria-Oliveira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás,
Instituto de Ciências Biológicas (ICB), Programa de Pós-
Graduação em Ciências Fisiológicas, Goiânia, 2018.

Bibliografia.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Nº 473

1
2 Aos cinco dias do mês de março do ano de dois mil e dezoito, às nove horas,
3 no Anfiteatro do Instituto de Ciências Biológicas II da Universidade Federal de
4 Goiás, reuniram-se os componentes da banca examinadora: Prof. Dr. André
5 Henrique Freiria-Oliveira, Profa. Dra. Patricia Maria Ferreira e Profa. Dra.
6 Graziela Torres Blanch para, em sessão pública presidida pelo primeiro
7 examinador citado, procederem à avaliação da defesa de dissertação intitulada
8 "Participação dos receptores de ANG II (AT1 e AT2) central sobre respostas
9 cardiovasculares induzidas por salina hipertônica intragástrica em ratos com
10 hipertensão renovascular", em nível de mestrado, área de concentração em
11 Farmacologia e Fisiologia, de autoria de **Kássia Kristina Sousa**, discente do
12 Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de
13 Goiás. A sessão foi aberta pelo presidente, que fez a apresentação formal dos
14 membros da banca. A palavra, a seguir, foi concedida à autora da dissertação
15 que em cerca de 20 minutos procedeu à apresentação de seu trabalho.
16 Terminada a apresentação, cada membro da banca arguiu a examinada,
17 tendo-se adotado o sistema de diálogo sequencial. Terminada a fase de
18 arguição, procedeu-se à avaliação da dissertação. Tendo-se em vista o que
19 consta na Resolução nº1491 de 2017 do Conselho de Ensino, Pesquisa,
20 Extensão e Cultura (CEPEC), que regulamenta o Programa de Pós-Graduação
21 em Ciências Biológicas, a dissertação foi APROVADA, considerando-se
22 integralmente cumprido este requisito para fins de obtenção do título de
23 Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Goiás. A conclusão
24 do curso dar-se-á quando da entrega da versão definitiva da dissertação na
25 Secretaria do programa, com as devidas correções sugeridas pela banca
26 examinadora, no prazo de trinta dias a contar da data da defesa. Cumpridas as



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

27 formalidades de pauta, às 10 horas e 40 minutos, encerrou-
28 se a sessão de defesa de dissertação e, para constar, eu, Renato César
29 Rodrigues, Assistente em Administração da Secretaria de Pós-graduação do
30 Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, lavrei a
31 presente ata que, após lida e aprovada, será assinada pelos membros da
32 banca examinadora em três vias de igual teor.

Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira

Presidente da Banca

Universidade Federal de Goiás

Prof. Dr. Patrícia Maria Ferreira

Universidade Federal de Goiás

Prof. Dra. Graziela Torres Blanch

Pontifícia Universidade Católica de Goiás

KASSIA KRISTINA SOUSA

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES DE ANG II (AT1 E AT2)
CENTRAL SOBRE RESPOSTAS CARDIOVASCULARES INDUZIDAS
POR SALINA HIPERTÔNICA INTRAGÁSTRICA EM RATOS COM
HIPERTENSÃO RENOVASCULAR**

BANCA EXAMINADORA

**Prof. Dr. Andre Henrique Freiria-Oliveira
Universidade Federal de Goiás**

**Prof. Dr. Patrícia Maria Ferreira
Universidade Federal de Goiás**

**Prof. Dr. Graziela Torres Blanch
Pontifícia Universidade Católica de Goiás**

Aprovada em: ____/____/____

Ao meu pai, minha mãe e meu irmão pelo apoio e amor incondicional, e a todos que contribuíram para meu crescimento pessoal e profissional. Vocês me fizeram ser uma pessoa mais filha, mais irmã, mais amiga, mais humana, mais simples e mais desejosa de ser e fazer feliz.

Agradecimentos

À Universidade Federal de Goiás e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela incansável busca para oferecer aos seus alunos uma formação de qualidade. Aos órgãos de fomento CAPES, CNPq e FAPEG pelo apoio financeiro fundamental para a realização desse trabalho.

Ao Prof. Dr. André Henrique Freiria-Oliveira, pela orientação, oportunidade de aprendizado, apoio e por cada ensinamento. Nesses dois anos de convivência, aprendi o valor da ética, do compromisso e da responsabilidade, lições que não são aplicadas apenas à vida acadêmica. Sou imensamente grata pela oportunidade. Muito obrigada.

Agradeço ao meu pai e minha mãe por acreditarem no meu potencial, e por todo amor e carinho que recebo todos os dias de vocês. O meu muito obrigada por terem me apoiado incondicionalmente e me darem forças em momentos de dificuldade e sempre me incentivaram a continuar meus estudos e a ser uma pessoa melhor a cada dia.

Agradeço ao meu irmão pelo apoio, carinho, cuidado, amizade e amor. Considero você como se fosse meu segundo pai. Obrigado por ser essa pessoa de coração enorme e cuidar tão bem de mim e dos nossos pais.

Agradeço a minha amiga Mariana Ferreira Carvalho, por ser a irmã que eu escolhi, só tenho que agradecer pelos anos de amizade, amor e companheirismo de sempre.

As minhas queridas amigas Anália Cirqueira Milhomem e Kelly, por todos esses anos em que moramos juntas, e que tornaram minha família aqui em Goiânia. Obrigada pelos momentos e a convivência maravilhosa.

Aos meus amigos de graduação João Pedro Torres Guimarães, Millena Ferreira Nalbandian e Ludmila Terra, que fizeram desses tantos anos de amizade o meu porto seguro. Obrigada por estarem presentes em cada etapa, fazendo tudo se tornar mais feliz.

A minha querida amiga Stéfanne Madalena Marques (Mada), pela ajuda e todo aprendizado que me deu com tanto carinho. Sem você este trabalho não seria

realizado, sou imensamente grata. Tenho um carinho e um respeito enorme por vo
Muito obrigada.

Aos amigos e colegas do CPNFC por todos os momentos e aprendizado compartilhados. Em especial a Aryanne e Ludmila por todo ensinamento e acolhimento no laboratório, sou imensamente grata a vocês. A Lara pela amizade, por todas as disciplinas que fizemos juntas e pela ajuda nos estudos. A Thais, Laíla e Leticinha por tornarem o congresso mais divertido. A Ariel e o Lucas, meus pupilos, que me ajudaram muito nos experimentos. Amanda pela ajuda nas histologias e pelos momentos de descontração. O João pela amizade e ajuda nas leituras precisas da pipeta graduada. O Paulo, Florência, Laíza, Mariel, Rafael, Gustavo, Nathalia, Melissa, Karla,, e tantos outros amigos que tornaram a rotina de laboratório mais leve e divertida.

A todos aqueles que, de alguma forma, colaboraram para a conclusão deste árduo, mas gratificante trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	VI
LISTA DE FIGURAS	VIII
LISTA DE TABELAS	X
RESUMO	XI
ABSTRACT	XIII
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	6
2.1 Objetivo geral	6
2.2 Objetivo específico	6
3. METODOLOGIA	7
3.1 Modelo animal utilizado	7
3.2 Cirurgia para o desenvolvimento da hipertensão renovascular modelo Goldblatt – 2 rins 1 clipe (2R1C)	7
3.3 Registro de pressão de cauda	7
3.4 Cirurgia para implante de cânula guia no Ventrículo Lateral (VL)	8
3.5 Análise dos parâmetros cardiovasculares	8
3.6 Registro de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados	9
3.7 Análise histológica	9
3.8 Coloração por vermelho neutro	10
3.9 Análise Estatística	10
3.10 Delineamento experimental	10
4.RESULTADOS	
4.1 Histologia	12
4.2 Efeito da hipertensão renovascular sobre a Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca (FC)	12

4.3 Peso dos rins e relação entre o rim direito e esquerdo dos animais hipertensos e normotensos.....	14
4.4 Registro de pressão arterial media (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos acordados	15
4.4.1 Efeitos da microinjeção de losartan sobre a resposta a administração de salina hipertônica intragástrica 2 M.....	15
4.4.2 Efeitos da microinjeção de PD123319 sobre a resposta a administração de salina hipertônica intragástrica 2 M.....	15
5. DISCUSSÃO	21
6. CONCLUSÃO	26
7.REFERÊNCIAS	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2R1C	Dois rins um clipe
Ang II	Angiotensina II
Ang I	Angiotensina I
ANOVA	Análise de variância
ANP	Peptídeo natriurético atrial
AT1	Receptor de angiotensina tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina tipo 2
AVP	Vasopressina
bmp	Batimentos por minuto
C₂H₆O	Álcool etílico
C₈H₁₀	Xilol
C₁₅H₁₇CIN₄	Vermelho neutro
CEUA	Comissão de ética no uso de animais
cm	Centímetro
EPM	Erro padrão da média
FC	Frequência cardíaca
g	Gramas
HA	Hipertensão arterial
HR	Hipertensão renovascular
icv	Intracerebroventricular
Kg	Kilogramas
mg	Miligramas
min	Minutos
mm	Milímetros
mmHg	Milímetros de mercúrio
MnPO	Núcleo pré-óptico mediano
NaCl	Cloreto de sódio
OCVs	Órgãos circuventriculares

OVLT	Órgão vasculoso da lâmina terminal
PA	Pressão arterial
PAM	Pressão arterial média
PAP	Pressão arterial pulsátil
PAS	Pressão arterial sistólica
PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RD	Rim direito
RE	Rim esquerdo
RVLM	Região rostroventrolateral do bulbo
SFO	Órgão subfornical
SON	Núcleo supra-óptico
SRAA	Sistema renina angiotensina aldosterona
VL	Ventrículo lateral
µm	Micrometros

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema representativo do delineamento experimental dos grupos normotenso e hipertenso, com microinjeções de salina ou losartan ou PD123319.....11
- Figura 2.** Fotomicrografia demonstrativa do local de injeção (seta) no VL em um animal representativo do grupo.....12
- Figura 3.** PAS e FC dos animais de 2R1C e normotensos durante cinco semanas. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparando ao valor da primeira semana. # $p < 0,05$ comparado o grupo hipertenso (2R1C) com o grupo normotenso.....13
- Figura 4.** Peso dos rins direito e esquerdo dos animais hipertensos e normotensos. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Teste t Student. * $p < 0,05$ quando comparado ao rim direito.....14
- Figura 5.** Registro de Pressão arterial média (PAM) em ratos acordados hipertensos e normotensos. Na linha tracejada indica microinjeção de losartan e salina. Na linha continua indica gavagem de salina hipertônica 2 M. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao valor basal. # $p < 0,05$ comparado os grupos normotensos com os hipertensos.....17
- Figura 6.** Registro de Frequência Cardíaca (FC) em ratos acordados hipertensos e normotensos. Na linha tracejada indica microinjeção de losartan e salina. Na linha continua indica gavagem de salina hipertônica 2 M. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao valor basal.....18
- Figura 7.** Registro de Pressão arterial média (PAM) em ratos acordados hipertensos e normotensos. Na linha tracejada indica microinjeção de PD123319 e salina. Na linha continua indica gavagem de salina hipertônica 2 M. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao valor basal.....19

Figura 8. Registro de Frequência Cardíaca (FC) em ratos acordados hipertensos e normotensos. Na linha tracejada indica microinjeção de PD123319 e salina. Na linha continua indica gavagem de salina hipertônica 2 M. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.....20

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Peso dos rins (mg) e relação entre o rim direito e esquerdo dos animais hipertensos e normotensos.....14

Tabela 2. Valores basais dos parâmetros cardiovasculares analisados nos animais do grupo hipertenso e normotenso.....15

RESUMO

O sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) está diretamente relacionado com doenças cardiovasculares. O peptídeo efetor do SRAA que está relacionado com o desenvolvimento e manutenção do aumento da pressão arterial (PA) é a angiotensina II (Ang II). Sua atuação direta sobre o receptor AT1 promove diversas ações que podem causar o aumento da PA. Assim, o presente trabalho tem como objetivo avaliar a participação do receptor de angiotensina tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2) central sobre respostas cardiovasculares induzidas por salina hipertônica intragástrica em ratos com hipertensão renovascular (HR). Para isto, foram utilizados ratos Wistar (150-180 g) para a indução da HR pelo modelo de dois rins um clipe (2R1C) com a implantação de um clipe de prata na artéria renal. Uma semana após a cirurgia de 2R1C, os registros da pressão arterial sistólica (PAS) e frequência cardíaca (FC) foram feitos por 5 semanas. Em seguida, fizemos a cirurgia de implante de cânula guia no ventrículo lateral (VL), e após 5 dias foi feita a canulação da artéria femoral possibilitando registrar os parâmetros cardiovasculares como pressão arterial média (PAM) e FC em ratos acordados. No dia seguinte, foi feito o registro acordado com microinjeção de salina ou losartan (217 mM, 1 μ l) ou PD123319 (40mM, 1 μ l) seguida por gavagem intragástrica com salina hipertônica (NaCl 2 M, 2 ml) e registrados por 60 minutos. Os resultados mostram que o modelo foi capaz de desenvolver a HR, na qual a PAS na 1ª semana foi $142,9 \pm 5,0$ mmHg, $p < 0,05$ e na 5ª semana $186,3 \pm 6,9$ mmHg, $p < 0,05$, tendo os animais hipertensos apresentado hipotrofia no rim clipado (RD/RE=0,709). O bloqueio dos receptores AT1 centrais não promoveu alterações pressóricas nos animais normotensos (Δ : $-0,1 \pm 0,9$ mmHg em relação ao basal) no entanto em animais hipertensos houve uma redução da pressão arterial (Δ : $-10,5 \pm 1,9$ mmHg $p < 0,05$ em relação ao basal). A gavagem de salina hipertônica 2 M promoveu resposta pressora tanto nos animais normotensos como nos hipertensos, respectivamente (Δ : $37,9 \pm 3,5$ mmHg vs Δ : $37,1 \pm 6,5$ mmHg $p < 0,05$; 15 min após a gavagem) e esta resposta foi completamente bloqueada apenas em animais HR após o losartan (Δ : $-4,4 \pm 1,8$ mmHg $p < 0,05$; 15 min após a gavagem). O bloqueio do receptor AT2 não foram observadas alterações na PAM. Posteriormente, a gavagem foi realizada em todos os grupos e promoveu um efeito hipertensivo não-sustentado em todos eles (PD123319 normotenso Δ : $39,4 \pm 4,3$ mmHg, $p < 0,05$, PD123319

hipertensivo Δ : $34,0 \pm 2,6$ mmHg, $p < 0,05$). Nossos resultados mostram que os receptores AT1 presentes nos órgãos circunventriculares (OCVs) participam da manutenção da pressão arterial elevada em animais com hipertensão renovascular e medeiam as respostas cardiovasculares induzidas pela administração intragástrica de salina hipertônica 2 M em animais hipertensos, mas não em animais normotensos. Assim, podemos sugerir que o modelo 2R1C é capaz de alterar o padrão da neurotransmissão angiotensinérgica prosencefálica envolvida em respostas causadas pela hiperosmolaridade plasmática.

Palavra-chave: 2R1C, Losartan, Órgãos circunventriculares, Hiperosmolaridade plasmática.

ABSTRACT

The renin angiotensin aldosterone system (RAAS) is directly related to cardiovascular diseases. The effector peptide of RAAS is related to the development and maintenance of increased blood pressure (BP) is angiotensin II. Its direct action on the AT1 receptor promotes several actions that may cause the increase of BP. Thus, the present work aims to evaluate the participation of central AT1 and AT2 receptor on cardiovascular responses induced by intragastric hypertonic saline in rats with renovascular hypertension (RH). For this, Wistar rats (150-180 g) were used for the induction of HR by the model of two kidneys one clip (2K1C) with the implantation of a silver clip in the renal artery. One week after 2K1C surgery, records of systolic blood pressure (SBP) and heart rate (HR) were done for 5 weeks. Afterwards, we performed the implantation of a guide cannula in the lateral ventricle, and 5 days after, the femoral artery was cannulated, making it possible to record the cardiovascular parameters such as mean arterial pressure (MAP) and HR in agreed rats. On the following day, the animals was submmited to microinjection of saline or losartan (217 mM, 1 μ l) or PD123319 (40mM, 1 μ l) followed by intragastric hypertonic saline gavage (2 M NaCl, 2 ml) and recorded for 60 minutes. The results showed that the model was able to develop HR, in which the SBP at the first week was 142.9 ± 5.0 mmHg, $p < 0.05$ and at the 5th week 186.3 ± 6.9 mmHg, $p < 0.05$, and the hypertensive animals presented hypotrophy in the clipped kidney (RD / RE = 0.709). Blockade of the central AT1 receptors did not promote blood pressure changes in normotensive animals (Δ : -0.1 ± 0.9 mmHg in relation to baseline); however, in hypertensive animals there was a reduction in blood pressure (Δ : -10.5 ± 1.9 mmHg $p < 0.05$ compared to baseline). Hypertonic saline gavage promoted a pressure response in both normotensive and hypertensive animals, respectively (Δ : 37.9 ± 3.5 mmHg vs Δ : 37.1 ± 6.5 mmHg $p < 0.05$; gavage) and this response was completely blocked only in RH animals after losartan (Δ : -4.4 ± 1.8 mmHg, $p < 0.05$, 15 min after gavage). AT2 receptor blockade did not show changes in MAP. Subsequently, gavage was performed in all groups and promoted a non-sustained hypertensive effect in all of them (PD123319 normotensive Δ : 39.4 ± 4.3 mmHg, $p < 0.05$, PD123319 hypertensive Δ : 34.0 ± 2.6 mmHg, $p < 0.05$). Our results show that AT1 receptors present in the circunventricular organs (OCVs) are involved in the maintenance of high blood pressure in animals with renovascular hypertension and mediate cardiovascular responses induced by the intragastric 2 M hypertonic saline

administration in hypertensive animals, but not in normotensive animals. Thus, we may suggest that the 2K1C model can alter the pattern of angiotensinergic neurotransmission involved in responses caused by plasma hyperosmolarity.

Keywords: 2K1C, Losartan, Circumventricular organs, Plasma hyperosmolarity.

1. INTRODUÇÃO

O sistema cardiovascular é composto pelo coração, vasos sanguíneos e capilares, sendo encarregado pela circulação sanguínea venosa e arterial no organismo, exercendo papel importante para a oferta adequada de suprimentos necessários à sobrevivência das células e manutenção da homeostase corporal (1). A manutenção dos níveis pressóricos dentro da normalidade depende das variações do débito cardíaco, e/ou da resistência periférica e, caso ocorra algum desequilíbrio pressórico resulta em alterações no débito cardíaco ou na resistência periférica, essas alterações podem levar ao aumento da pressão arterial (PA), uma vez que esse aumento seja sustentado pode-se estabelecer uma condição clínica conhecida como hipertensão arterial (HA) (2).

De acordo com a VII Diretrizes Brasileiras de Hipertensão (2), a HA é caracterizada pela elevação e manutenção da PA para números acima dos valores considerados normais (Pressão Sistólica ≥ 140 mmHg; Pressão Diastólica ≥ 90 mmHg). Apesar de ser uma doença frequentemente detectável, não apresenta sintomas clínicos aparentes, podendo levar a complicações fatais se não for tratada (3,4).

A HA está associada com eventos como morte súbita, acidente vascular encefálico, infarto agudo do miocárdio, insuficiência cardíaca, doença arterial periférica e doença renal crônica (5). Dados norte-americanos trazem que a HA é responsável por 45% das mortes cardíacas e 51% das mortes resultantes de acidente vascular encefálico (6). De acordo com dados epidemiológicos sobre a hipertensão arterial sistêmica, no Brasil a HA atinge em torno de 32,5 % das pessoas adultas, contribuindo para cerca de 50 % das mortes por doença cardiovascular (5).

Existem diversas causas envolvidas na fisiopatogenia da HA, no entanto, a maioria dos pacientes são ainda considerados hipertensos sem causa definida, ou seja, hipertensos primários ou essenciais. Por outro lado, quando a etiologia da doença é conhecida, define-se a HA como secundária, o que pode, portanto, direcionar o tratamento de acordo com a etiologia (7).

A hipertensão renovascular (HR) é considerada uma das causas mais frequentes de HA secundária, definida como o aumento da pressão arterial causado por uma lesão estenótica ou obstrutiva em uma ou ambas as artérias renais, capaz

de alterar a pressão de perfusão e o fluxo sanguíneo, acometendo entre 2% e 5% da população hipertensa (8,9).

Um dos modelos mais utilizados para o estudo da HA experimental foi proposto por Goldblatt (1934) (8), no qual a HR é induzida por meio da estenose parcial da artéria renal de um dos rins, por implantação de um clipe de prata; enquanto a artéria do rim contralateral é mantida intacta, diante disso, o modelo é denominado dois rins um clipe (2R1C) (8,10,11). Esse modelo de HR serviu como base para estudos subsequentes e demonstrou que uma lesão obstrutiva na artéria renal deve alcançar um nível crítico de 75% a 80% para produzir mudanças hemodinâmicas significantes na medida do fluxo arterial através da lesão (12).

Alguns estudos demonstraram que vários fatores estão envolvidos na fisiopatogenia do modelo de hipertensão 2R1C, dentre eles, o sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA), sendo o mecanismo humoral envolvido na modulação das funções cardiovascular e renal, que participa do controle da PA e no balanço eletrolítico (13).

No modelo de 2R1C, a oclusão parcial de uma das artérias renais por um clipe de prata com diâmetro pré-estabelecido, promove uma constrição parcial desta artéria, o que leva inicialmente a um aumento dos níveis de renina circulante e a consequente exacerbação do SRAA (8). Na segunda fase da hipertensão, que acontece em um período de 5 a 8 semanas, há a diminuição da renina circulante, no entanto o animal está mais sensível a estímulos com angiotensina II (Ang II) (14,15). Na terceira fase, após a nona semana, quando a hipertensão já está estabelecida, já foi demonstrado que haja participação do sistema nervoso simpático mantendo os elevados níveis de pressão, já que nessa fase há a normalização da renina circulante e mesmo com a retirada do clipe não é capaz de alterar os elevados níveis de pressão (14,15).

Após a clipagem de um dos rins, o fluxo sanguíneo renal diminui, logo a renina é liberada pelas células justaglomerulares que são células do músculo liso modificadas e que trabalham como mecanorreceptores, e são vistas na parede das arteríolas aferentes do aparato justaglomerular dos rins (16). A renina é uma protease que hidrolisa o angiotensinogênio, um substrato produzido pelo fígado, catalisando sua conversão em um peptídeo de 10 aminoácidos, a angiotensina I (Ang I), que

possui pouca atividade vasoconstritora, insuficiente para promover mudanças expressivas na função circulatória. Ang I é convertida pela enzima conversora de angiotensina (ECA) para o octapeptídeo Ang II (16). Também tem sido descrito que a partir da Ang I ou da Ang II, outros metabólitos como a Ang III, Ang IV e Ang 1-7 podem ser gerados (16).

A Ang II é o peptídeo efetor do SRAA e exerce suas ações via receptores de angiotensina do tipo 1 (AT1) e tipo 2 (AT2), os quais pertencem à família de receptores acoplados a proteína G (16). Quando ligados a Ang II produzem sinais que levam a ações que geralmente são opostas (17). Enquanto os receptores AT1 medeiam ações com consequências potencialmente deletérias, se não forem apropriadamente contrabalanceados, os receptores AT2 parecem induzir ações protetoras, embora de relevância clínica ainda não totalmente esclarecida (18). A interação da Ang II com os receptores AT1 ativa numerosos processos celulares induzindo a vasoconstrição, retenção de sódio e água, liberação de vasopressina (AVP), geração de espécies reativas de oxigênio, inflamação vascular, remodelamento cardíaco e vascular, aumento da atividade do sistema nervoso simpático e liberação de aldosterona que contribuem não somente para a gênese da HA, mas também para acelerar os danos nos chamados órgãos-alvo como coração e rim. Já sua interação com os receptores AT2 medeiam uma ação anti-proliferativa e apoptótica (19).

Por conseguinte, na HR, a redução do fluxo sanguíneo para o rim em razão da estenose da artéria renal, induz a ativação excessiva do SRAA, levando à HA (20,21). A fase inicial da hipertensão após colocação do clipe é dependente do aumento na concentração plasmática de renina e de Ang II. De fato, estudos mostram que a administração de inibidor de Ang II em ratos com hipertensão 2R1C produziu queda acentuada na pressão arterial após 5 semanas de clipagem. Esses dados indicam que a HR neste modelo é inicialmente dependente da renina (22). Enquanto que a fase de manutenção da hipertensão, que se inicia aproximadamente quatro semanas após a instalação do clipe, os níveis plasmáticos de Ang II e renina retornam aos seus níveis normais. Os níveis elevados de Ang II retêm sódio e água, mesmo com níveis reduzidos de renina (13,23,24).

Diversos estudos sugerem que a hipertensão no modelo experimental 2R1C depende do aumento da atividade do SRAA, tanto periférico quanto central (15,25–27). Visto que, Ang II circulante é amplamente conhecida por seu papel na regulação

do balanço hidroeletrolítico e função cardiovascular, uma vez que atua diretamente nas arteríolas promovendo vasoconstrição; em núcleos hipotalâmicos estimulando a produção de vasopressina; nos rins, diretamente no túbulo renal aumentando excreção de potássio e a reabsorção de sódio (consequentemente aumentando a retenção de água); e no córtex da glândula adrenal estimulando a liberação de aldosterona, que por sua vez também atua na excreção de potássio e reabsorção de sódio (15,25–28).

A Ang II circulante também atua no encéfalo por meio de sua ligação a receptores presentes nos órgãos circunventriculares (OCVs), em regiões livres de barreira hematoencefálica, o que permite ao encéfalo detectar sinais ou alterações na composição do sangue e responder a essas alterações por meio de ajustes neurais ou neuroendócrinos. Entre os OCVs podemos citar: a área postrema, o órgão subfornical (SFO) e o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) como peças chave no controle da pressão arterial e equilíbrio hidroeletrolítico (29).

Um dos estímulos para ativação dos OCVs é alteração da osmolaridade plasmática. Experimentalmente, o aumento da osmolaridade plasmática pode ser ocasionado por administração intragástrica de salina hipertônica 2 M que simula a ingestão de substâncias osmoticamente ativas, resultando em desidratação celular (30). A hiperosmolaridade induzida por cloreto de sódio (NaCl) intragástrica 2 M em ratos aumenta a concentração plasmática de sódio e osmolalidade em 4%, reduz a atividade de renina plasmática, sem alterar o hematócrito e a proteína plasmática total (31), causa sede, resposta pressora, tem aumento da atividade de neurônios hipotalâmicos vasopressinérgicos e ocitocinérgicos, acarretando uma maior concentração de vasopressina e ocitocina plasmáticos (32,33).

Diferentes estudos demonstram que aumentos agudos da concentração plasmática de sódio desencadeiam uma série de respostas autonômicas, cardiovasculares e hormonais. Dentre essas respostas destacamos: a redução da atividade simpática renal (34), a secreção do peptídeo natriurético atrial (ANP), ocitocina e vasopressina (35–38), o aumento da PA (32,39,40), e a vasodilatação renal (41). Admite-se que estes ajustes, desencadeados pela hipernatremia fazem parte de um conjunto de respostas integradas que visam promover a natriurese, restabelecendo, assim as condições volêmicas normais (42).

Ademais, a administração intracerebroventricular (icv) ou em várias áreas prosencefálicas de Ang II, produz aumento da PA (43–45). Este aumento da PA induzido por Ang II em áreas prosencefálicas é decorrente de um aumento da atividade do sistema nervoso simpático e/ou secreção de vasopressina (46–48). Já foi demonstrado que a infusão icv de bloqueador do receptor AT1 (losartan) promove a diminuição da PA e da frequência cardíaca (FC) em ratos *Dalth salt-sensitive* conscientes, o que sugere a participação desses receptores nas respostas cardiovasculares nessa linhagem (49). Ademais a injeção icv de losartan foi capaz de impedir a resposta pressora e a resistência vascular renal evocada pela Ang II em animais espontaneamente hipertensos conscientes (50).

Do até aqui exposto, tendo em vista que a Ang II promove diversas ações que resultam em aumento da resposta pressora por meio da ação do sistema nervoso central e que o modelo de HR é dependente da Ang II, buscamos entender qual a participação dos receptores AT1 e AT2 localizados nos OCVs na resposta a administração intragástrica de solução salina hipertônica 2 M, classicamente dependente de Ang II em animais com HR pelo modelo de hipertensão 2R1C.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a participação dos receptores de ANG II (AT1 e AT2) centrais sobre respostas cardiovasculares induzidas por salina hipertônica intragástrica em ratos normotensos e com HR.

2.2 Objetivos específicos

Verificar os parâmetros cardiovasculares como pressão arterial média (PAM) e FC em resposta a administração de salina hipertônica intragástrica 2 M em animais normotensos após o bloqueio dos receptores AT1 e AT2.

Determinar os parâmetros cardiovasculares como PAM e FC em resposta a administração de salina hipertônica intragástrica 2 M em animais 2R1C após o bloqueio dos receptores AT1 e AT2;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Modelo animal utilizado

Foram utilizados ratos Wistar (150 a 180 gramas (g) – para a indução da hipertensão renovascular), fornecidos pelo Biotério da Universidade Federal de Goiás. Os animais foram mantidos sob condições de luz controlada ciclo claro-escuro de 12 horas, em salas climatizadas com temperatura controlada (22-24°C) e tiveram acessos *ad libitum* à água e ração granulada, atendendo a todas as normas de manejo e cuidado animal. Todos os protocolos utilizados foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Goiás (CEUA, nº 31/2014).

3.2 Cirurgia para o desenvolvimento da hipertensão renovascular Modelo Goldblatt – 2 rins 1 clipe (2R1C)

Os animais com peso de 150-180 g foram anestesiados com uma mistura de cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal). Foi feita a laparotomia para exposição da artéria renal esquerda, que foi isolada para a colocação de um clipe de prata (abertura de 0,2 mm) que ocluiu parcialmente o fluxo de sangue da artéria renal. Posteriormente, a camada muscular e a pele foram suturadas e realizou-se o tratamento profilático com administração intramuscular de pentabiótico veterinário (benzilpenicilina 80000IU + streptomicina 33 mg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, SP) e de anti-inflamatório cetoprofeno (ketoprofen 1%, 1 mg/kg de peso corporal, Mundo Animal, São Paulo, SP) em todos os animais. Para os animais controle, o mesmo procedimento foi realizado com a exceção da colocação do clipe de prata.

3.3 Registro de pressão de cauda

Uma semana após a cirurgia de 2R1C, os registros de PAS e FC foram feitos periodicamente (2 vezes por semana) durante 5 semanas. Estes registros ocorreram sempre no mesmo período. Os ratos foram pré-aquecidos a aproximadamente 38 °C durante 15 minutos (min) para dilatação da artéria caudal. Os animais foram colocados em um contensor de madeira, apenas para a exposição da cauda para que fosse possível o registro de pressão arterial pulsátil (PAP), a partir da artéria caudal. Um manguito de borracha foi posicionado na cauda, próximo ao corpo do animal,

possibilitando que a insuflação e desinsuflação do manguito obstrua e desobstrua o fluxo sanguíneo da artéria caudal. O manguito foi conectado a uma pêra de insuflação e a um transdutor de pressão arterial, acoplado a um sistema de aquisição de dados (PowerLab 4/25, ML0380/D, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). O registro dos sinais mecânicos produzidos a partir da insuflação do manguito e da PAP da artéria caudal, foram obtidos a partir do software LabChart Pro (v.7.3.7, ADInstruments, Bella Vista, Austrália). Os ciclos de insuflação e desinsuflação foram repetidos pelo menos 3 vezes. A FC foi calculada através da PAP e os valores foram obtidos entre as médias dos ciclos registrados.

3.4 Cirurgia para implante de cânula guia no Ventrículo lateral (VL)

Após cinco semanas de registro de pressão de cauda, os animais foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) administrado intraperitonealmente, e posteriormente fixados em um aparelho estereotático para pequenos animais (Bonther Ltda, Ribeirão Preto, SP). O crânio foi nivelado utilizando o bregma e lâmbda como referências. Uma cânula de aço inoxidável (12 milímetros (mm) comprimento x 0,7 mm diâmetro interno) foi implantada no VL, após a trepanação do crânio com uma broca circular, usando as coordenadas 0,6 mm caudal ao bregma, 1,2 lateral a linha média e 3,6 mm abaixo da superfície do crânio. A cânula foi fixada no crânio com a utilização de parafusos e resina acrílica. Após a secagem completa da resina, o animal foi retirado do estereotático e um mandril foi introduzido dentro da cânula. Uma dose profilática de pentabiótico veterinário (benzilpenicilina 80000IU + streptomicina 33 mg, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Campinas, SP) e de anti-inflamatório cetoprofeno (ketoprofen 1%, 1 mg/kg de peso corporal, Mundo Animal, São Paulo, SP) foi administrada intramuscularmente em todos os animais. Os animais foram mantidos em recuperação por um período de cinco dias.

3.5 Análise dos parâmetros cardiovasculares

Para avaliar os parâmetros cardiovasculares como PAM e FC em ratos acordados foi realizado o procedimento cirúrgico de canulação da artéria femoral no dia anterior aos experimentos de registro acordado. Para isso os animais foram anestesiados (70 mg/kg de cetamina e 30 mg/kg de xilazina), uma incisão na face

ventral da pata traseira foi necessária para expor e dissecar a artéria, logo em seguida um tubo de polietileno PE-10 de 4 centímetro (cm) foi introduzido na artéria. Esse tubo é soldado a outro tubo de polietileno PE-50 de 15 cm de comprimento preenchido com heparina. As porções PE-50 foram transpassadas sob a pele do dorso e suas extremidades foram exteriorizadas e fixadas com fios de sutura. Finalizando o procedimento cirúrgico a incisão foi suturada e os animais receberam doses de antibiótico e anti-inflamatório.

3.6 Registro de pressão arterial e frequência cardíaca em ratos não anestesiados

Após 24 horas da cirurgia, a cânula ligada à artéria femoral foi acoplada a um transdutor de pressão ligado a um amplificador (ETH-200 CB SCIENCES INC), por sua vez conectado a um conversor analógico digital PowerLab/400 (ADInstruments) acoplado ao software Labchart (ADInstruments), a fim de registrar a pressão arterial pulsátil (PAP), PAM e a FC. Com o intuito de evitar a formação de coágulos durante os registros, foi administrada solução salina heparinizada na cânula ligada à artéria femoral. Após o período de estabilização do registro, cerca de 20 minutos, foi microinjetado salina ou losartan (217 mM, 1µl) ou PD123319 (40mM, 1µl), um antagonista de receptor AT1 e AT2 no VL. Após a microinjeção foi feito o registro por 15 minutos, e logo os animais foram submetidos ao protocolo de gavagem intragástrica com salina hipertônica (NaCl 2 M, 2 ml) e registrados por mais 60 minutos.

3.7 Análise histológica

Ao final dos experimentos, os animais foram anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg de peso corporal). Em seguida, receberam injeções de corante (azul de Evans 1% 0,1µl) no VL e foram submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração (ventrículo esquerdo) de solução de formaldeído 10% (20 ml). A seguir os encéfalos foram retirados e armazenados em formaldeído 10% por alguns dias. Os encéfalos foram seccionados em cortes coronais de 40 micrometros (µm) de espessura com o auxílio de um micrótomo de congelamento (Leica; Wetzlar, Alemanha), montados em lâminas e corados com corante vermelho neutro. Para a localização das injeções no VL, os cortes foram analisados utilizando um microscópio

óptico (Leica DM500, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha) acoplado a um sistema digital de aquisição de imagens (Leica Application Suite, V.3.10, Leica Microsystems, Wetzlar, Alemanha). Os ratos também foram submetidos a uma laparotomia mediana para retirada dos rins para que fosse avaliado o peso deles, com o intuito de certificar que o procedimento cirúrgico de clipagem foi realizado com sucesso.

3.8 Coloração por vermelho neutro

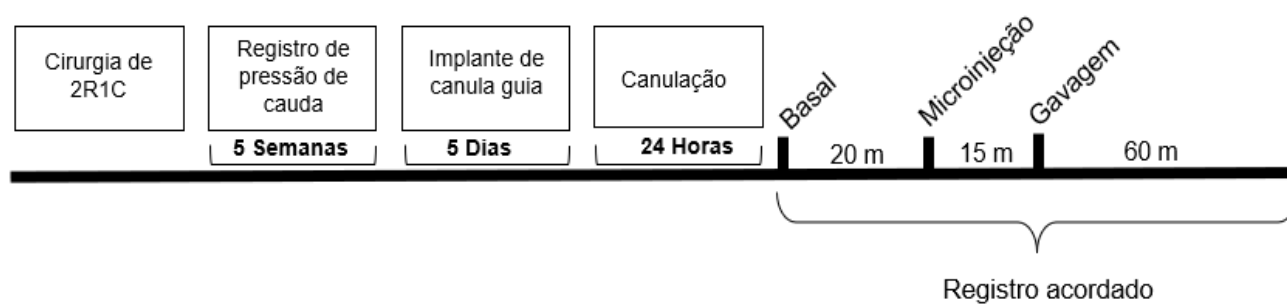
Os cortes encefálicos dos animais submetidos a microinjeção no VL foram submetidos a coloração de vermelho neutro para evidenciar a marcação do corante azul de Evans (4%; 100 nL; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). Após a montagem em lâminas e secagem em temperatura ambiente, os cortes foram submergidos em vermelho neutro ($C_{15}H_{17}ClN_4$, 1%) por 5 minutos. Em seguida foram lavados em água destilada e desidratados em concentrações crescentes de álcool etílico (C_2H_6O ; 70%, 90%, 100%; 3 min). Os cortes foram ainda submergidos em xilol (C_8H_{10} ; 30min; Neon, Suzano, SP, Brasil) para remoção do álcool e clarificação. Posteriormente foram recobertos com lamínulas com auxílio de DPX (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

3.9 Análise Estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism (v 6.01; GraphPad Software, Inc. San Diego, Califórnia, USA). Os valores foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM). As variações da PAS, PAM e FC foram analisadas usando análise de variância de duas vias (ANOVA two way) seguido pelo pós-teste de Tukey. Os dados de peso corporal e relação do peso dos rins foram analisados através do teste *t Student* não pareado.

3.9 Delineamento experimental

Na figura 1 é mostrado o delineamento experimental realizado.



Microinjeção: salina ou Losartan ou PD123319

Gavagem: salina hipertônica 2 M

Figura 1: Esquema representativo do delineamento experimental dos grupos normotenso e hipertenso, com microinjeções de salina ou losartan ou PD123319.

4. RESULTADOS

4.1 Histologia

A Figura 2 apresenta uma fotomicrografia transversal representativa de um corte histológico indicando o ponto de injeção típico (seta) no VL. Para este estudo, somente os animais positivos foram analisados.

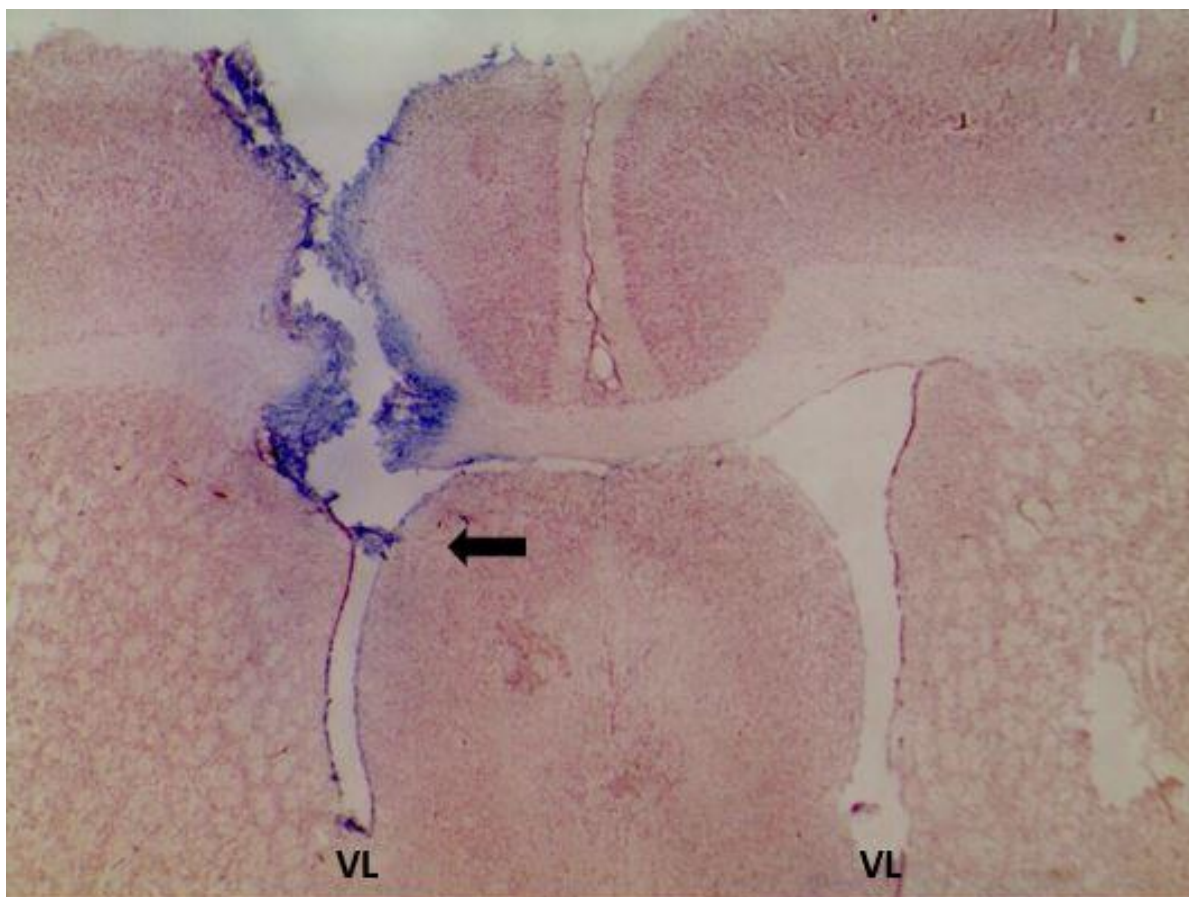


Figura 2: Fotomicrografia demonstrativa do local de injeção (seta) no VL em um animal representativo do grupo.

4.2 Efeito da hipertensão renovascular sobre a Pressão Arterial Sistólica (PAS) e Frequência Cardíaca (FC)

A figura 3 apresenta os valores da PAS e FC pelo método de pletismografia de cauda ao final da 5ª semana de protocolo experimental. Conforme esperado, os animais submetidos à estenose da artéria renal esquerda apresentaram aumentos significantes dos níveis pressóricos ao decorrer das semanas. Na primeira semana de pletismografia de cauda, os animais obtiveram $142,9 \pm 5.0$ milímetros de mercúrio (mmHg) de PAS e no fim da quinta semana os animais obtiveram um aumento

significativo para $186,3 \pm 6,9$ mmHg, $p < 0,05$. Enquanto que, nos animais normotensos não houve diferença ao decorrer das semanas ($109,7 \pm 1,4$ mmHg na primeira semana e na 5ª semana $115,6 \pm 1,3$ mmHg). A FC dos animais com cirurgia de 2R1C e normotensos não houveram diferença significativa durante as semanas (2R1C: $403,0 \pm 7,0$ batimentos por minutos (bpm) e $416,8 \pm 8,3$ bpm; primeira e quinta semana, respectivamente; normotenso: $364,4 \pm 3,1$ bpm e $377,8 \pm 3,1$ primeira e quinta semana, respectivamente.)

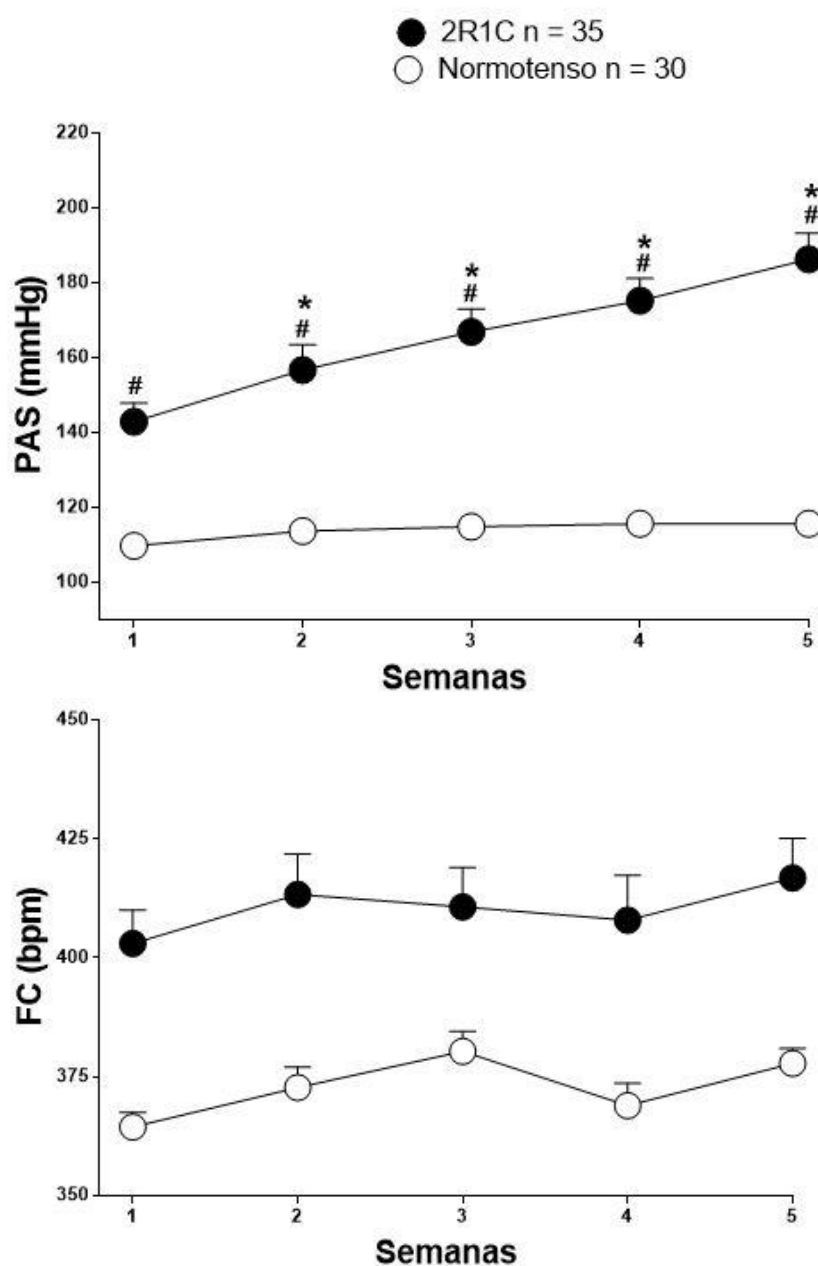


Figura 3: PAS e FC dos animais de 2R1C e normotensos durante cinco semanas. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparando ao valor da primeira semana. # $p < 0,05$ comparado o grupo hipertenso (2R1C) com o grupo normotenso.

4.3 Peso dos rins e relação entre o rim direito e esquerdo dos animais hipertensos e normotensos

Além dos valores pressóricos, foi analisado o peso renal dos animais. Indispensavelmente, o rim dos animais clipados (hipertensos) deveria apresentar uma hipotrofia quando comparado ao rim não clipado, numa relação entre o rim direito e o rim esquerdo (RD/RE) de 0,4 até 0,9 (Tabela 1) (51). Analisando a figura 4, observamos que o rim clipado dos animais 2R1C apresentou hipotrofia quando comparado ao rim não clipado (rim direito: $1778,4 \pm 94,4$ mg e rim esquerdo: $1259,5 \pm 54,7$ mg, $p < 0,05$), diferentemente dos animais normotensos que não houve diferença entre os rins (rim direito: $1528,65 \pm 34,4$ mg e rim esquerdo: $1400,7 \pm 28,1$).

Tabela 1: Peso dos rins (mg) e relação entre o rim direito e esquerdo dos animais hipertensos e normotensos.

	Direito (mg)	Esquerdo (mg)	RD/RE)
Hipertensos	$1778,4 \pm 94,4$	$1259,5 \pm 54,7^*$	0,709
Normotensos	$1528,0 \pm 34,4$	$1400,7 \pm 28,1$	1,026

Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) dos valores do peso do rim direito e esquerdo comparado o grupo hipertenso com o normotenso. *Diferente dentro do mesmo grupo.

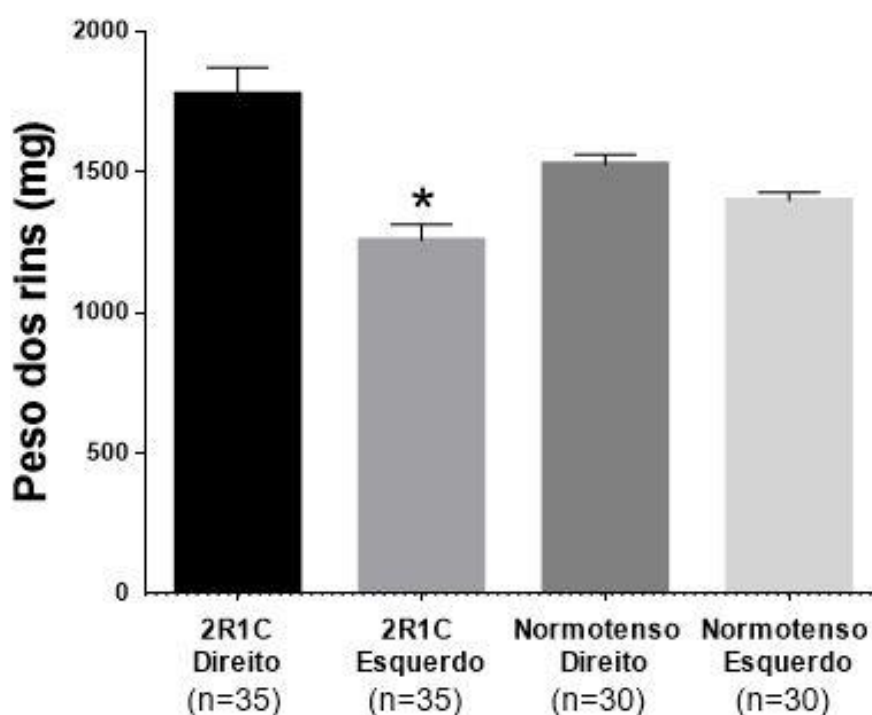


Figura 4: Peso dos rins direito e esquerdo dos animais hipertensos e normotensos. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Teste t Student. * $p < 0,05$ quando comparado ao rim direito.

4.4 Registro de pressão arterial media (PAM) e frequência cardíaca (FC) em ratos acordados

Após avaliarmos a hipertensão através da cirurgia de 2R1C, avaliamos também os parâmetros cardiovasculares em ratos não anestesiados submetidos a gavagem de salina hipertônica 2 M após a microinjeção de antagonista de receptor AT1 (losartan) e antagonista de receptor AT2 (PD123319) central.

Na tabela a seguir, são mostrados os valores basais de PAM e FC do registro não anestesiados dos animais hipertensos e normotensos. Mostrando que os parâmetros cardiovasculares foram diferentes entre os grupos apenas na PAM (hipertensos: $174,6 \pm 5,5$ mmHg, $p < 0,05$ e normotensos: $112,9 \pm 2,3$ mmHg, $p < 0,05$) (Tabela 2).

Tabela 2. Valores basais dos parâmetros cardiovasculares analisados nos animais do grupo hipertenso

	N	PAM (mmHg)	FC (bpm)
Hipertensos	35	$174,6 \pm 5,5^*$	$380,0 \pm 12,4$
Normotensos	30	$112,9 \pm 2,3$	$370,8 \pm 4,5$

e normotenso.

Média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) dos valores basais da pressão arterial média (PAM-mmHg) e frequência cardíaca (FC-bpm). *Diferente do controle normotenso com $p < 0,05$.

4.4.1 Efeitos da microinjeção de Losartan sobre a resposta a administração de salina hipertônica intragástrica 2 M

Durante o registro acordado, nos animais normotensos e hipertensos, foi feita a microinjeção de salina para controle, e não foram observadas alterações na PAM. Posteriormente, foi feita a gavagem de salina hipertônica 2 M em ambos os grupos, e promoveu um efeito hipertensor não sustentado (normotenso salina Δ : $28,9 \pm 2,6$ mmHg, $p < 0,05$ e $-1,5 \pm 1,7$ mmHg; 15 e 35 min após a gavagem, respectivamente; e hipertenso salina Δ : $37,1 \pm 6,5$ mmHg, $p < 0,05$ e $-2,1 \pm 1,6$ mmHg; 15 e 45 min após a gavagem, respectivamente, figura 5). Mostrando que a gavagem de salina hipertônica 2 M promove o aumento da PAM tanto em animais normotensos quanto em animais hipertensos, como é mostrado nos nossos resultados.

Nos animais normotensos, a microinjeção de antagonista de receptor AT1 não promoveu alterações significativas e quando administramos gavagem de salina hipertônica 2 M resultou em um efeito hipertensor, retornando para os valores basais (normotenso losartan Δ : $37,9 \pm 3,5$ mmHg, e $4,0 \pm 2,2$ mmHg 15 e 55 min após a gavagem, respectivamente, figura 4). Enquanto que, nos animais 2R1C a microinjeção de losartan levou a uma hipotensão (hipertenso losartan Δ : $-10,5 \pm 1,9$ mmHg, $p < 0,05$; 10 min após a microinjeção, figura 5). Após 15 minutos da administração central de losartan foi realizada a gavagem de salina hipertônica 2 M, que ocasionou ao longo de 25 minutos no retorno da PAM aos valores basais (hipertenso losartan Δ : $-3,3 \pm 2,1$ mmHg; 25 min após a gavagem de salina hipertônica 2 M, figura 5).

Nossos resultados indicam que após o bloqueio do receptor AT1 não houve alterações pressóricas nos animais normotensos, já nos animais hipertensos promoveu a queda da PA. Quando administramos a gavagem de salina hipertônica intragástrica, causou uma resposta pressora nos animais normotensos, e nos animais hipertensos restaurou a PAM aos valores basais. Quando comparamos entre o grupo de hipertenso frente a microinjeção e a gavagem de salina hipertônica 2 M, existem diferenças significativas entre eles (hipertenso losartan Δ : $-10,5 \pm 1,9$ mmHg, $p < 0,05$ e $-4,4 \pm 1,8$ mmHg, $p < 0,05$; 10 e 15 min após a microinjeção e gavagem de salina hipertônica 2 M, respectivamente; hipertenso salina Δ : $3,6 \pm 1,0$ mmHg, $p < 0,05$; e $37,1 \pm 6,5$ mmHg, $p < 0,05$; 10 e 15 min após a microinjeção e gavagem de salina hipertônica 2 M, respectivamente). Também comparamos entre o grupo normotenso, e há diferença significativa após a gavagem de salina hipertônica 2 M (normotenso losartan Δ : $37,9 \pm 3,5$ mmHg, $p < 0,05$; 15 min após a gavagem de salina hipertônica 2 M; normotenso salina Δ : $28,9 \pm 2,6$ mmHg, $p < 0,05$; 15 min após a gavagem) (figura 5).

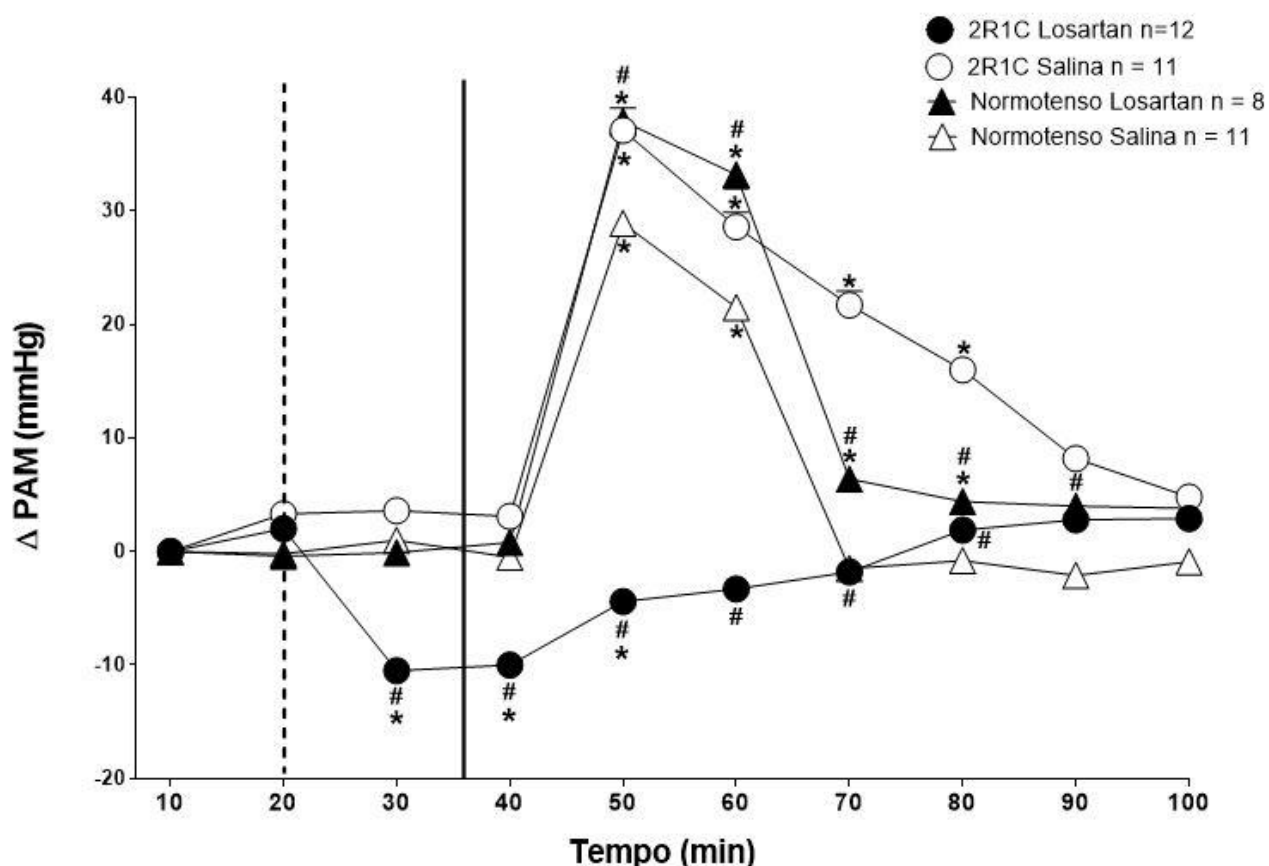


Figura 5: Registro de Pressão arterial média (PAM) em ratos acordados hipertensos e normotensos. Na linha tracejada indica microinjeção de losartan e salina. Na linha contínua indica gavagem de salina hipertônica 2 M. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao valor basal. # $p < 0,05$ comparado entre os grupos.

A figura 6 mostra o registro de FC nos ratos acordados hipertensos e normotensos. Em ambos os grupos não houve alterações na FC tanto após a microinjeção de salina e losartan no VL. Porém após a gavagem de salina hipertônica 2 M houve alterações na FC, promovendo uma taquicardia não sustentada (normotenso salina Δ : $56,6 \pm 21,6$ bpm, $p < 0,05$; 15 minutos após a gavagem; normotenso losartan Δ : $36,2 \pm 9,6$ bpm, $p < 0,05$; 15 minutos após a gavagem; hipertenso salina Δ : $-38,9 \pm 13,3$ mmHg, $p < 0,05$; 15 min após a gavagem; hipertenso losartan Δ : $38,9,1 \pm 13,3$ mmHg, $p < 0,05$ bpm; 15 min após a gavagem, figura 6).

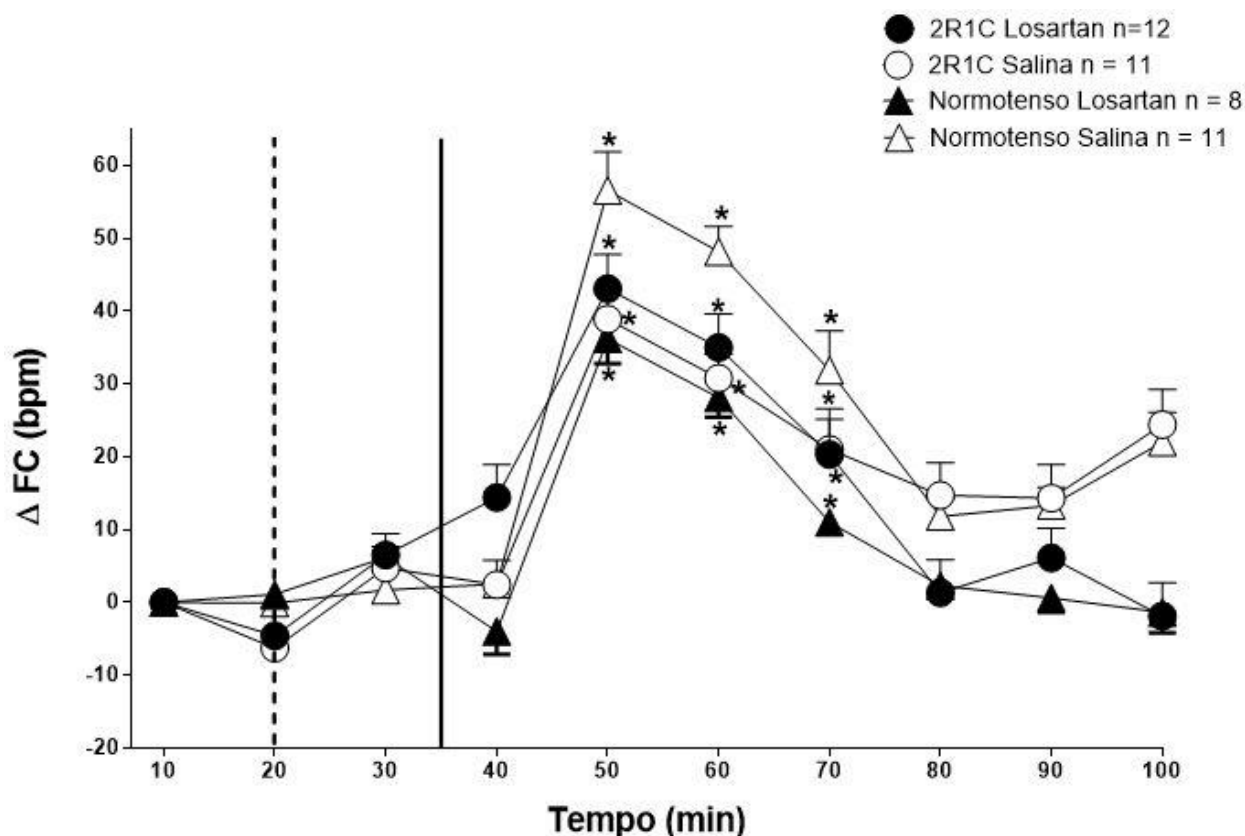


Figura 6: Registro de Frequência Cardíaca (FC) em ratos acordados hipertensos e normotensos. Na linha tracejada indica microinjeção de losartan e salina. Na linha contínua indica gavagem de salina hipertônica 2 M. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao valor basal.

4.4.2 Efeitos da microinjeção de PD123319 sobre a resposta a administração de salina hipertônica intragástrica 2 M

Conforme a figura 7 mostra, o registro de PAM nos animais normotensos e hipertensos feita microinjeção de salina e PD123319 e não foram observadas alterações na PAM. Em seguida, foi feita a gavagem de salina hipertônica 2 M em todos os grupos, e promoveu um efeito hipertensor não sustentado em todos eles (normotenso salina: Δ : $32,8 \pm 3,9$ mmHg, $p < 0,05$ e $0,0 \pm 1,2$ mmHg; 15 e 45 min após a gavagem, respectivamente; hipertenso salina Δ : $36,0 \pm 14,5$ mmHg, $p < 0,05$ e $7,0 \pm 2,9$ mmHg; 15 e 45 min após a gavagem, respectivamente; normotenso PD123319 Δ : $39,4 \pm 4,3$ mmHg, $p < 0,05$ e $4,3 \pm 2,8$ mmHg; 15 e 45 min após a gavagem, respectivamente; hipertenso PD123319 Δ : $34,0 \pm 2,6$ mmHg, $p < 0,05$ e $3,2 \pm 2,6$ mmHg; 15 e 45 min após a gavagem, respectivamente). Nossos resultados indicam que a após o bloqueio do receptor AT₂ não houve alterações pressóricas, enquanto

que, após a gavagem de salina hipertônica 2 M, há um efeito hipertensor não sustentado em ambos os grupos.

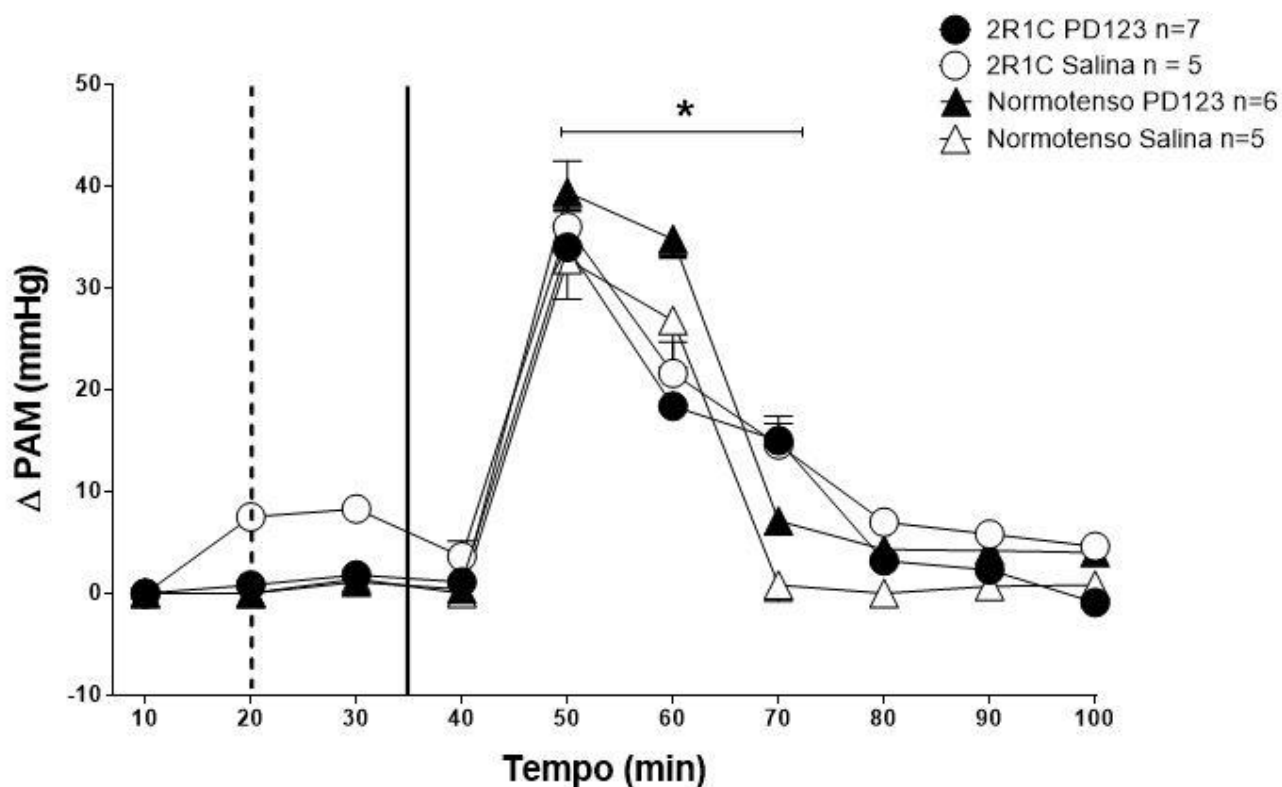


Figura 7: Registro de Pressão arterial média (PAM) em ratos acordados hipertensos e normotensos. Na linha tracejada indica microinjeção de PD123319 e salina. Na linha contínua indica gavagem de salina hipertônica 2 M. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey. * $p < 0,05$ comparado ao valor basal.

Durante o registro acordado, em todos os grupos, não houve alterações na FC tanto após a microinjeção de salina e PD123319, quanto após a gavagem de salina hipertônica 2 M (normotenso salina Δ : $4,0 \pm 2,6$ e $26,2 \pm 2,0$ bpm; 10 min após a microinjeção de salina e 15 min após a gavagem, respectivamente; hipertenso salina Δ : $-6,9 \pm 19,8$ e $23,2 \pm 20,7$ bpm; 10 min após a microinjeção de salina e 15 min após a gavagem, respectivamente; normotenso PD123319 Δ : $6,6 \pm 3,2$ e $25,5 \pm 6,0$ bpm; 10 min após a microinjeção de PD123319 e 15 min após a gavagem, respectivamente; hipertenso PD123319 Δ : $9,7 \pm 10,1$ e $20,2 \pm 17,7$ bpm; após a microinjeção de PD123319 e 15 min após a gavagem, respectivamente) (figura 8).

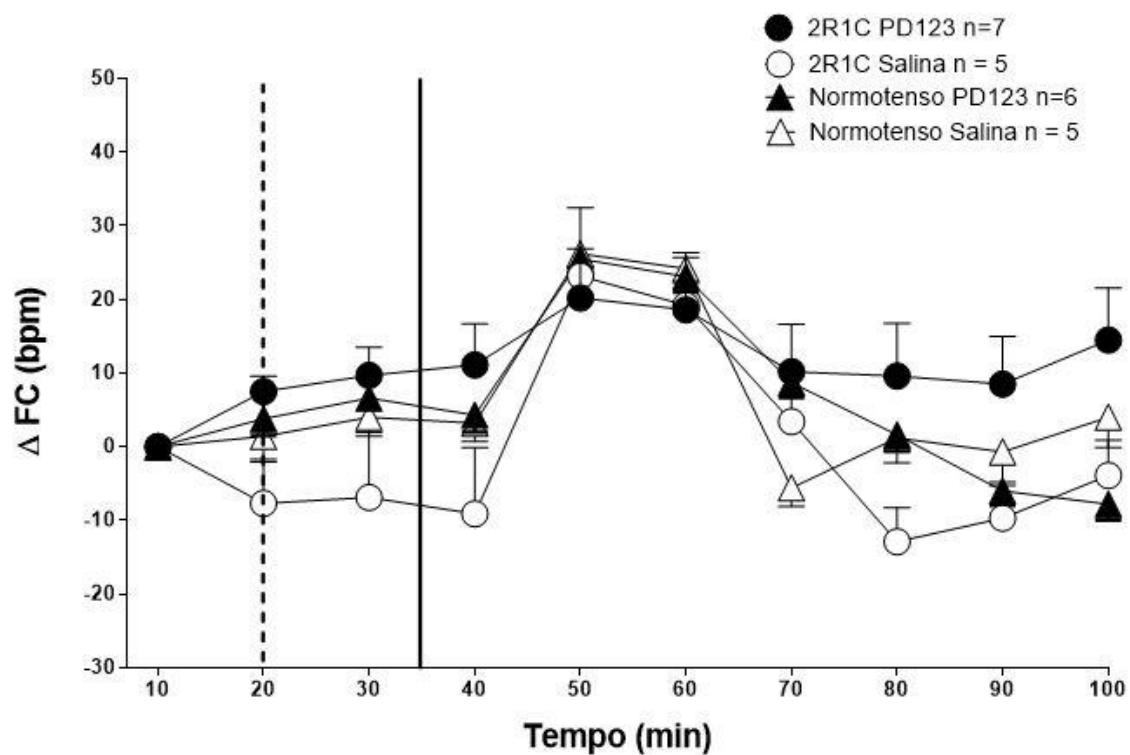


Figura 8: Registro de Frequência Cardíaca (FC) em ratos acordados hipertensos e normotensos. Na linha tracejada indica microinjeção de PD123319 e salina. Na linha contínua indica gavagem de salina hipertônica 2 M. Os dados foram expressos em média $\pm$ EPM e analisados por Two Way ANOVA seguido pelos pós teste de Tukey.

5. DISCUSSÃO

Os resultados obtidos no presente estudo corroboram com a hipótese de que a Ang II aumentada durante a HR, atua sobre os receptores AT1 localizados nos OCVs, no entanto, medeia a resposta pressora promovida pela administração intragástrica de salina hipertônica 2 M que não era esperado. Especificamente, demonstramos que: I. o modelo 2R1C promoveu hipertensão nos animais apresentando hipotrofia no rim clipado; II. o bloqueio do receptor AT1 não promoveu alterações pressóricas em animais normotensos e reduziu a pressão nos animais HR; III. o bloqueio do receptor AT1 aboliu a resposta pressora induzida pela gavagem de salina hipertônica 2 M apenas em animais hipertensos; IV. o bloqueio do receptor AT2 não promoveu alterações pressóricas em animais normotensos e hipertensos; V. o bloqueio do receptor AT2 não promoveu alterações na resposta pressora induzida pela gavagem de salina hipertônica 2 M em animais normotensos e hipertensos.

No modelo de HR 2R1C ocorre uma diminuição crônica do fluxo sanguíneo e, conseqüentemente, da pressão de perfusão renal promovendo a elevação dos níveis plasmáticos de Ang II que, por sua vez, acarreta em um aumento sustentado da pressão arterial (20). Essas evidências foram confirmadas no presente estudo, que demonstra aumentos significativos nos níveis pressóricos ao decorrer das semanas em ratos submetidos a cirurgia de 2R1C, sem alterar de maneira significativa a FC, mostrando que a indução da hipertensão renovascular do nosso estudo foi eficaz (52–57).

Ao final do protocolo, foi avaliado o peso dos rins e constatou-se que animais hipertensos apresentam hipotrofia renal no rim correspondente à artéria em que o clipe foi implantado. Os resultados deixam claro que o rim esquerdo, clipado, apresentou peso menor comparado ao rim direito, não clipado. A hipotrofia renal gerada pela estenose arterial do rim esquerdo é decorrente da redução do fluxo sanguíneo e com conseqüente redução da filtração glomerular (51). De acordo com Smith e Bishop (1986) (51) a HR é confirmada quando se tem resultados da relação entre rim esquerdo/ rim direito (RE/RD) entre 0,4 e 0,9; sendo, portanto, indicativo de uma operação bem sucedida, ou seja, este intervalo de relação RE/RD sugere que os animais ficaram hipertensos, e diferentemente dos animais normotensos que possuem a relação acima de 0,9. Neste sentido, os resultados encontrados nesse

trabalho em relação RE/RD em animais hipertensos e normotensos estão de acordo com os dados já publicados.

O receptor AT1 é amplamente distribuído nos sistemas nervoso, endócrino, cardiovascular e renal. Em condições fisiológicas, o AT1 medeia os efeitos clássicos da Ang II, incluindo a manutenção do volume do fluido extracelular e da pressão arterial. No entanto, o aumento das concentrações de Ang II no plasma ou aumento da expressão do receptor AT1 nos diferentes tecidos, pode resultar em vasoconstrição, liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, retenção de sódio, estimulação do sistema nervoso simpático (58).

A injeção central do antagonista do receptor AT1, losartan, não alterou a PAM em animais normotensos, mas nos animais hipertensos pelo modelo de 2R1C houve uma diminuição da pressão arterial basal, efeito já demonstrado em ratos *Dalt* salt-sensitive conscientes (49), bem como após a inibição da atividade da enzima conversora de angiotensina (15), o que demonstra que a manutenção da hipertensão pelo modelo de 2R1C depende da ativação dos receptores AT1 central, pelo menos até o período de 6 semanas após a clipagem.

Em nosso trabalho, após a microinjeção central de losartan houve uma redução na PA nos animais de 2R1C. A Ang II aumentada neste modelo pode atuar sobre os receptores AT1 presentes nos OCVs e promover tanto uma estimulação do componente simpático do sistema nervoso autônomo quanto aumentos na secreção de vasopressina. Assim, levando em conta as conexões dos OCVs com áreas relacionadas ao controle humoral e autonômico, como o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e a região rostroventrolateral do bulbo (RVLM) (59,60), esta poderia ser as vias de modulação da resposta pressora.

Também mostramos que o bloqueio do receptor AT2, com microinjeção central de PD123319, não promoveu alteração na PAM basal em ratos normotensos e hipertensos. Estudo anterior, evidenciou que a administração icv do bloqueador do receptor AT2 desempenhou um papel protetor no desenvolvimento da hipertensão DOCA/SAL (uninefrectomizados tratados cronicamente com acetato de desoxicorticosterona) em ratas, através da modulação do SRAA e de citocinas inflamatórias (61). Esses resultados indicam que o receptor AT2 pode desempenhar

um papel importante na regulação da PA em alguns modelos de hipertensão. Entretanto, em nosso modelo experimental, não observamos a participação direta desse receptor sobre a manutenção da HR.

A desidratação intracelular promovida pela gavagem de salina hipertônica 2 M promove aumento da PAM em animais normotensos (32,33), assim como mostrado no presente estudo tanto em animais normotensos como nos animais hipertensos. Este aumento de pressão arterial causado pela hiperosmolaridade é determinado por ativação de áreas envolvidas com o controle cardiovascular, aumento da secreção de vasopressina e aumento da atividade simpática (60,62,63). O bloqueio dos receptores AT1 centrais em animais normotensos não afetou a resposta pressora da sobrecarga intragástrica, no entanto, nos animais 2R1C com bloqueio do receptor AT1 houve um bloqueio da resposta pressora, mostrando que essa resposta passa a ser mediada pela Ang II em animais com HR.

Respostas a alterações no volume e na osmolaridade plasmática são, em parte, detectadas por neurônios osmosensitivos do sistema nervoso central que são capazes de detectar a hiperosmolaridade dos fluidos corporais e ativar circuitos neuronais (64). O VL dá acesso uma série de regiões do encéfalo como OVLT, SFO que são desprovidos da barreira hematoencefálica além de outras áreas prosencefálicas. De fato, esses núcleos localizados próximos aos ventrículos são capazes de detectar alterações nos níveis circulantes de Ang II e na osmolaridade (ou sódio) plasmática (65). Assim mudanças nas concentrações plasmáticas de sódio ou de Ang II podem ser detectadas por esses sensores e promover ajustes, a fim de restabelecer a homeostase corporal.

Várias regiões do SNC são responsáveis pela detecção de mudanças da osmolaridade e na concentração de angiotensina. Estudos anteriores demonstraram que os neurônios do SFO e OVLT são despolarizados pelo aumento da concentração plasmática de sódio e hiperpolarizado pela diminuição desses parâmetros (66). De fato, osmorreceptores centrais, como o SFO e OVLT, enviam estas informações para outras regiões do SNC, especialmente para o núcleo pré-óptico mediano (MnPO) e o PVN (67–69). Tais regiões desencadeiam uma série de conexões para ajustes no tônus simpático e secreção de vasopressina/ oxitocina para restabelecer a homeostase corporal. De fato, O PVN controla o componente neural com suas

projeções diretas para a coluna intermédia lateral e RVLM, e o componente humoral pela liberação de vasopressina ou ocitocinas (60,70). Assim, o aumento da osmolaridade plasmática desencadeado pela administração de salina hipertônica 2 M no presente estudo, pode ativar essa circuitaria neuronal e promover aumentos na PAM como mostra os nossos resultados.

Shi et al. (2008) (71) demonstraram que vias do OVLT que se dirigem para o PVN são ativados após a administração de solução salina hipertônica intracarótida, essas observações indicam que o aumento da osmolaridade estimula o SFO e OVLT e que o envio de informações para regiões hipotalâmicas depende da neurotransmissão glutamatérgica, especialmente do OVLT (71). Demonstrou-se que o núcleo supraóptico (SON), outra região hipotalâmica, também é osmosensitiva (72) e que a hiperosmolaridade dos fluidos corporais despolariza os neurônios SON independentemente das conexões sinápticas. Todavia, os mecanismos pelos quais essas regiões são estimuladas ainda estão sob investigação (73).

Em condições fisiológicas, os receptores AT1 medeiam os efeitos clássicos da Ang II, incluindo a manutenção do volume do fluido extracelular e da pressão arterial. No entanto, o aumento das concentrações de Ang II no plasma ou aumento da expressão do receptor AT1 nos diferentes tecidos, pode resultar em aumentos da liberação de vasopressina, vasoconstrição, liberação de aldosterona pelas glândulas adrenais, retenção de sódio e estimulação do sistema nervoso simpático (18,19).

Estudos mostram que a desidratação pode promover mecanismos de plasticidade neuronal, desencadeando mudanças no padrão de neurotransmissão em regiões do SNC, como o tronco cerebral. Essas mudanças podem resultar em ajustes autonômicos e endócrinos a fim de reestabelecer a homeostase corporal e promover adaptações ao processo de desidratação. Investigações mostram que a atividade do fator de transcrição AP1 pode ser responsável pela plasticidade neuronal induzida por desidratação no NTS (74) onde a manutenção da atividade simpática e PA se deve a um importante papel dos receptores AT1 hipotalâmicos em animais normohidratados, mas em animais desidratados este papel passa a ser do bulbo. Mostramos que os receptores AT1 presentes nos OCVs participam da manutenção da PA elevada em animais hipertensos e que medeiam às respostas cardiovasculares induzidas pela sobrecarga de sódio exclusivamente em animais 2R1C. Podemos

sugerir assim, que esse modelo experimental é capaz de alterar o padrão da neurotransmissão envolvida em respostas causadas pela hiperosmolaridade plasmática.

Diante do exposto, nossos resultados contribuem para a idéia que os receptores AT1 tem um papel essencial na manutenção da HR no período de 6 semanas após a clipagem. Nossos resultados mostram pela primeira vez que os receptores AT1, provavelmente prosencefálicos, passam também a participar das respostas cardiovasculares induzidas pela administração intragástrica de salina hipertônica 2 M neste modelo de hipertensão.

6. CONCLUSÃO

Nossos resultados sugerem que os receptores AT1 presentes nos OCVs, prosencefálicos principalmente, participam da manutenção da pressão arterial elevada em animais com hipertensão renovascular e que medeiam as respostas cardiovasculares induzidas pela administração intragástrica de salina hipertônica 2 M em animais hipertensos, mas não em animais normotensos. Assim, podemos sugerir que o modelo 2R1C é capaz de alterar o padrão da neurotransmissão envolvida em respostas causadas pela hiperosmolaridade plasmática.

REFERÊNCIAS

1. Cannon WB. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev* 1929 Sep;9(3).
2. Brasileira S, *Cardiologia @bullet* Issn-0066-. 7ª Diretriz Brasileira brasileira de hipertensão arterial. 2016;107(3).
3. Collins R, Peto R, Macmahon S, Hebert P, Fiebach NH, Eberlein KA. Blood pressure, stroke, and coronary heart disease. Part 2 Short-term reductions in blood pressure: overview of randomised drug trials in their epidemiological context. *Lancet* (London, England) 1990; 335(8693):827–38.
4. Perry HM, Miller JP, Fornoff JR, Baty JD, Sambhi MP, Rutan G. Early predictors of 15-year end-stage renal disease in hypertensive patients. *Hypertens* (Dallas, Tex 1979) 1995 Apr; 25(4 Pt 1):587–94.
5. Malachias M, Souza W, Plavnik F, Rodrigues C, Brandão A, Neves M. 7th Brazilian Guideline of Arterial Hypertension: Chapter 1 - Concept, Epidemiology and Primary Prevention. *Arq Bras Cardiol* 2016;107(3):1–6.
6. Lim SS, Vos T, Flaxman AD, Danaei G, Shibuya K, Adair-rohani H. A comparative risk assessment of burden of disease and injury attributable to 67 risk factors and risk factor clusters in 21 regions, 1990 – 2010 : a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012;380(1):1990–2010.
7. VII Diretrizes brasileiras de hipertensão - DBH VI. Hipertensão arterial sistêmica secundária. *Rev Bras Hipertens* 2010;17(1):44–51.
8. Goldblatt H, Lynch J, Hanzal RF, Summerville WW. Studies on experimental hypertension I. the production of persistent elevation of systolic blood pressure by means of renal ischemia. *J Exp Med* 1934 Feb 28;59(3):347–79.
9. Bortolotto LAE; Malachias MVB. New concepts on the diagnosis and treatment of secondary hypertension. *Rev Bras Hipertens* 2011;18(2):46–66.
10. Edmunds ME; Russell GI; Bing RF. Reversal of experimental renovascular hypertension. *Journal of Hypertension* 1991; 289-301.

11. Melaragno MG. Slow pressor effect of angiotensin II in normotensive rats with renal artery stenosis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996;23(2):140–4.
12. May AG; Van de Berg; Deweese JA; Rob CG. Critical arterial stenosis. *Surgery* 1963 Jul;54:250–9.
13. Navar LG, Zou L, Von Thun A, Tarng Wang C, Imig JD, Mitchell KD. Unraveling the Mystery of Goldblatt Hypertension. *Physiology* 1998;13(4).
14. Goldblatt H. Experimental Hypertension Induced by Renal Ischemia: Harvey Lecture. *Bull N Y Acad Med* 1938 Sep;14(9):523–53.
15. Martinez-Maldonado M. Pathophysiology of renovascular hypertension. *Hypertension*. 1991 May;17(5):707–19.
16. Lavoie JL, Sigmund CD. Minireview: overview of the renin-angiotensin system—an endocrine and paracrine system. *Endocrinology* 2003; 144(1):2179–83.
17. Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin. A new look at an old system. *Prog Neurobiol* 2011;49–67.
18. Antonio F. Sanjuliani, Marcia R. S. G. Torres, Livia N. Paula, Fabiana B. Bassan. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: Bases fisiológicas e fisiopatológicas. *Rev do Hosp Univ Pedro Ernesto, UERJ*, 2011;11–30.
19. Braam B, Navar LG, Mitchell KD. Modulation of tubuloglomerular feedback by angiotensin II type 1 receptors during the development of Goldblatt hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 1995 Jun; 25(6):1232–7.
20. Ploth DW. Angiotensin-dependent renal mechanisms in two-kidney, one-clip renal vascular hypertension. *Am J Physiol - Ren Physiol* 1983;245(2).
21. Gavras H, Brunner H, Thurston H, Laragh J. Reciprocation of renin dependency with sodium volume dependency in renal hypertension. *Science* 1975 Jun;188(4195):1316–7.
22. Sadjadi J, Puttaparthi K, Welborn MB, Rogers TE, Moe O, Clagett GP, Turnage RH, Levi MJ. Upregulation of autocrine-paracrine renin-angiotensin systems in chronic renovascular hypertension. *J Vasc Surg* 2002 Aug;36(2):386–92.

23. Kobori H, Nangaku M, Navar LG, Nishiyama A. The Intrarenal Renin-Angiotensin System: From Physiology to the Pathobiology of Hypertension and Kidney Disease. *Pharmacol Rev* 2007;59(3).
24. DeForrest JM, Knappenberger RC, Antonaccio MJ, Ferrone RA, Creekmore JS. Angiotensin II is a necessary component for the development of hypertension in the two kidney, one clip rat. *Am J Cardiol* 1982 Apr; 49(6):1515–7.
25. Niederberger M; Aubert JF; Nussberger JB, Hans R; Waeber B. Sympathetic nerve activity in conscious renal hypertensive. *Journal of Hypertension* 1995 Apr; 13 (4): 439-45.
26. Wang DS, Xie HH, Shen FM, Cai GJ, Su DF. Blood pressure variability, cardiac baroreflex sensitivity and organ damage in experimentally hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2005 Jul;32(7):545–52.
27. de Kloet AD, Krause EG, Woods SC. The renin angiotensin system and the metabolic syndrome. *Physiol Behav* 2010 Jul;100(5):525–34.
28. De Luca LAJ, Menani JV, Johnson AK. Neurobiology of Body Fluid Homeostasis. *Frontiers in neuroscience* 2014; 13: 978-1.
29. Elizabeth M, Starbuck D, Fitts A. Effects of SFO lesion or captopril on drinking induced by intragastric hypertonic saline. *Brain Res* 1998 Jun 8;795(1–2):37–43.
30. Pereira DTB, Vendramini RC, David RB, Nozaki PN, Menani JV, Luca LADJ. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. *Physiol Behav* 2002 Aug;76(4–5):501–5.
31. Freiria-Oliveira AH, Blanch GT, Pedrino GR, Cravo SL, Murphy D, Menani J V. Catecholaminergic neurons in the commissural region of the nucleus of the solitary tract modulate hyperosmolality-induced responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2015 Nov; 309(9):R1082-91.
32. Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Murphy D, Paulin RF, Antunes-Rodrigues J, Colombari E. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2013

- Apr;304(7):R531-42.
33. Pedrino GR, Freiria-Oliveira AH, Almeida Colombari DS, Rosa DA, Cravo SL. A2 noradrenergic lesions prevent renal sympathoinhibition induced by hypernatremia in rats. *Plos One* 2012;7(5):37587.
 34. Antunes-Rodrigues J, Ramalho MJ, Reis LC, Menani J V, Turrin MQ, Gutkowska J. Lesions of the hypothalamus and pituitary inhibit volume-expansion-induced release of atrial natriuretic peptide. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Apr;88(7):2956–60.
 35. Antunes-Rodrigues J, Machado BH, Andrade HA, Mauad H, Ramalho MJ, Reis LC, et al. Carotid-aortic and renal baroreceptors mediate the atrial natriuretic peptide release induced by blood volume expansion. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1992 Aug;89(15):6828–31.
 36. Godino A, Giusti-Paiva A, Antunes-Rodrigues J, Vivas L. Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. *Neuroscience* 2005 Jan;133(2):493–505.
 37. Haanwinckel MA, Elias LK, Favaretto AL, Gutkowska J, McCann SM, Antunes-Rodrigues J. Oxytocin mediates atrial natriuretic peptide release and natriuresis after volume expansion in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug;92(17):7902–6.
 38. Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Murphy D, Paulin RF, Antunes-Rodrigues J, Colombari E, et al. Inhibitory mechanism of the nucleus of the solitary tract involved in the control of cardiovascular, dipsogenic, hormonal, and renal responses to hyperosmolality. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 2013 Apr;304(7):531–42.
 39. Colombari DS, Colombari E, Lopes OU, Cravo SL. Afferent pathways in cardiovascular adjustments induced by volume expansion in anesthetized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2000 Sep;279(3):884-90.
 40. Morita H, Vatner SF. Effects of volume expansion on renal nerve activity, renal blood flow, and sodium and water excretion in conscious dogs. *Am J Physiol* 1985 Nov;249(5 Pt 2):F680-7.

41. Colombari E, Colombari DSA, Li H, Shi P, Dong Y, Jiang N, et al. Macrophage migration inhibitory factor in the paraventricular nucleus plays a major role in the sympathoexcitatory response to salt. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 2010 Nov;56(5):956–63.
42. Johnson, AK, Hoffman WE BJ. Attenuated pressor responses to intracranially injected stimuli and altered antidiuretic activity following preoptic hypothalamic periventricular ablations. *Brain Res* 1978;(161–166).
43. Colombari DS, Haibara AS, Camargo LA, Saad WA, Renzi A, DeLuca LA, et al. Role of the medial septal area on the cardiovascular, fluid and electrolytic responses to angiotensin II and cholinergic activation into the subfornical organ in rats. *Brain Res Bull* 1994;33(3):249–54.
44. Colombari E, Saad WA, Camargo LA, Renzi A, De Luca Júnior LA, Menani J V. AV3V lesion suppresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats. *Brain Res* 1992 Feb;572(1–2):172–5.
45. Hoffman WE, Phillips MI, Schimid PG, Falcon J, Weet JF. Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. *Neuropharmacology* 1977 Jul;16(7–8):463–72.
46. Hatzinikolaou P, Gavras H, Brunner HR, Gavras I. Role of vasopressin, catecholamines, and plasma volume in hypertonic saline-induced hypertension. *Am J Physiol - Hear Circ Physiol*. 1981;240(6).
47. Buñag RD, Miyajima E. Sympathetic hyperactivity elevates blood pressure during acute cerebroventricular infusions of hypertonic salt in rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 1984;6(5):844–51.
48. Lark LA, Wappel SM, Weyhenmeyer JA. Cardiovascular effects after the intracerebroventricular administration of peptide and nonpeptide angiotensin antagonists in Dahl salt-sensitive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1995;274(2):745–51.
49. Toney GM, Porter JP. Effects of blockade of AT1 and AT2 receptors in brain on the central angiotensin II pressor response in conscious spontaneously

- hypertensive rats. *Neuropharmacology*. 1993 Jun;32(6):581–9.
50. Smith SH, Bishop SP. Selection criteria for drug-treated animals in two-kidney, one clip renal hypertension. *Hypertension*. 1986 Aug;8(8):700–5.
 51. Nishi EE, Bergamaschi CT, Oliveira-Sales EB, Simon KA, Campos RR. Losartan Reduces Oxidative Stress Within the Rostral Ventrolateral Medulla of Rats With Renovascular Hypertension. *Am J Hypertens* 2013 Jul;26(7):858–65.
 52. Oliveira-Sales EB, Toward MA, Campos RR, Paton JFR. Revealing the role of the autonomic nervous system in the development and maintenance of Goldblatt hypertension in rats. *Auton Neurosci* 2014 Jul;183(100):23–9.
 53. Oliveira-Sales EB, Colombari E, Abdala AP, Campos RR, Paton JF. Sympathetic overactivity occurs before hypertension in the two-kidney, one-clip model. *Exp Physiol* 2016 Jan;101(1):67–80.
 54. Bergamaschi C, Campos RR, Schor N, Lopes OU. Role of the Rostral Ventrolateral Medulla in Maintenance of Blood Pressure in Rats With Goldblatt Hypertension. *Hypertens (Dallas, Tex 1979)* 1995 Dec; 4(3):387–93.
 55. Smith SH, Bishop SP. Selection criteria for drug-treated animals in two-kidney, one clip renal hypertension. *Am Hear Assoc* 1986;8:700–5.
 56. Blanch GT, Freiria-Oliveira AH, Speretta GF, Carrera EJ, Li H, Speth RC, Colombari E, Sumners C, Colombari DS. Increased expression of angiotensin II type 2 receptors in the solitary-vagal complex blunts renovascular hypertension. *Hypertension* 2014;64(4):777–83.
 57. Sanjuliani AF, Torres MRSG, Paula LN, Bassan FB. Eixo renina-angiotensina-aldosterona: Bases fisiológicas e fisiopatológicas. *Rev do Hosp Univ Pedro Ernesto, UERJ* 2011;11–30.
 58. Hochstenbach SL, Ciriello J. Plasma hypernatremia induces c-fos activity in medullary catecholaminergic neurons. *Brain Res* 1995 Mar; 674(1):46–54.
 59. Toney GM, Chen QH, Cato MJ, Stocker SD. Central osmotic regulation of sympathetic nerve activity. *Acta Physiol Scand* 2003 Jan;177(1):43–55.

60. Dai SY, Peng W, Zhang YP, Li JD, Shen Y, Sun XF. Brain endogenous angiotensin II receptor type 2 (AT2-R) protects against DOCA/salt-induced hypertension in female rats. *J Neuroinflammation* 2015 Mar;12(1):47.
61. Mckinley MJ, Allen AM, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Sly D, et al. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2001 Dec; 28(12):990–2.
62. Hochstenbach SL, Ciriello J. Plasma hypernatremia induces c-fos activity in medullary catecholaminergic neurons. *Brain Res* 1995 Mar; 674(1):46–54.
63. Bourque CW. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. *Nat Rev Neurosci* 2008 Jul; 9(7):519–31.
63. Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996 Feb;23(2):183–91.
64. Johnson AK, Cunningham JT, Thunhorst RL. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 1996 Feb; 23(2):183–91.
65. Osmoreceptors, Osmoreception, and Osmoregulation. *Front Neuroendocrinol* 1994 Sep;15(3):231–74.
66. Saper CB, Reis DJ, Joh T. Medullary catecholamine inputs to the anteroventral third ventricular cardiovascular regulatory region in the rat. *Neurosci Lett* 1983 Dec;42(3):285–91.
67. Afferent connections of the median preoptic nucleus in the rat: Anatomical evidence for a cardiovascular integrative mechanism in the anteroventral third ventricular (AV3V) region. *Brain Res* 1983 Dec; 288(1–2):21–31.
68. Tucker DC, Saper CB, Ruggiero DA, Reis DJ. Organization of central adrenergic pathways: I. Relationships of ventrolateral medullary projections to the hypothalamus and spinal cord. *J Comp Neurol* 1987 May; 259(4):591–603.
69. Hochstenbach SL, Ciriello J. Plasma hypernatremia induces c-fos activity in medullary catecholaminergic neurons. *Brain Res* 1995 Mar; 674(1):46–54.

70. Shi P, Martinez MA, Calderon AS, Chen Q, Cunningham JT, Toney GM. Intra-carotid hyperosmotic stimulation increases Fos staining in forebrain organum vasculosum laminae terminalis neurones that project to the hypothalamic paraventricular nucleus. *J Physiol*. 2008 Nov; 586(21):5231–45.
71. Mason WT. Supraoptic neurones of rat hypothalamus are osmosensitive. *Nature*. 1980 Sep;287(5778):154–7.
72. Oliet SHR, Bourque C. Mechanosensitive channels transduce osmosensitivity in supraoptic neurons. *Nature* 1993 Jul;364(6435):341–3.
73. Wright JW, Harding JW. Brain renin-angiotensin—A new look at an old system. *Prog Neurobiol*. 2011 Sep; 95(1):49–67.
74. Colombari DSA, Colombari E, Freiria-Oliveira AH, Antunes VR, Yao ST, Hindmarch C, et al. Switching control of sympathetic activity from forebrain to hindbrain in chronic dehydration. *J Physiol* 2011 Sep; 589(Pt 18):4457–71.