

UFRRJ
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

DISSERTAÇÃO

**A ANGIOTENSINA-(1-7) ESTÁ ENVOLVIDA NA RESPOSTA À
PRIVAÇÃO HÍDRICA?**

Raoni da Conceição dos Santos

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**A ANGIOTENSINA-(1-7) ESTÁ ENVOLVIDA NA RESPOSTA À PRIVAÇÃO
HÍDRICA?**

RAONI DA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

Sob a 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

Seropédica, Rj

Julho de 2015

612.01522

S237a

T

Santos, Raoni da Conceição dos, 1989-

A Angiotensina-(1-7) está envolvida na resposta à privação hídrica? / Raoni da Conceição dos Santos. - 2015.

77 f.: il.

Orientador: Luís Carlos Reis.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, 2015.

Bibliografia: f. 71-77.

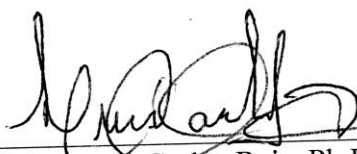
1. Fluidos e humores no organismo - Teses. 2. Angiotensina - Teses. 3. Homeostase - Teses. I. Reis, Luís Carlos, 1952- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas. III. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
(FEDERAL RURAL UNIVERSITY OF RIO DE JANEIRO)
INSTITUTO DE BIOLOGIA (BIOLOGY INSTITUTE)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
(GRADUATE PROGRAM IN PHYSIOLOGICAL SCIENCES)**

RAONI DA CONCEIÇÃO DOS SANTOS

Dissertation submitted as a partial requirement to obtain the **Master Degree in Physiological Sciences**, in the Graduate Program in Physiological Sciences, Concentration Area of Physiology and Pharmacology.

DISSERTATION APROVED IN July 9th, 2015



Prof. Dr. Luis Carlos Reis, Ph.D., UFRRJ - Brazil
(Advisor)



Prof. Dr. Emerson Lopes Olivares, Ph.D., UFRRJ - Brazil



Prof. Dr. Charles Colin Thomas Hindmarch, Ph.D.
University of Bristol – United Kingdom

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Edson Cordeiro dos Santos e Márcia da Conceição dos Santos, sem os quais nada do que faço seria possível. Dedico não somente este trabalho, mas tudo que alcançar, pois sei que a sua influência está em todas as minhas ações.

Tenho orgulho de ser seu filho.

AGRADECIMENTOS

“Nenhum homem é uma ilha isolada; cada homem é uma partícula do continente, uma parte da terra; se um torrão é arrastado para o mar, a Europa fica diminuída, como se fosse um promontório” Donne, John

De forma que quero agradecer a todos aqueles com os quais componho um continente:

Meu orientador Luís Carlos Reis e ao professor André de Souza Mecawi, pelo apoio com a confecção deste trabalho.

Aos professores, Charlie Hindmarch e Emerson Lopes Olivares, que em conjunto com meu orientador compõem a banca avaliadora deste trabalho.

Aos professores, técnicos e funcionários do Departamento de Ciências Fisiológicas.

Ao Departamento de Educação Física e Desportos, onde obtive minha formação acadêmica básica, especialmente aos professores Paulo Eduardo Carnaval, Anderson Luís Bezerra da Silveira e Pancrácio Esmeraldo

Aos professores Carmen Cabanelas Pazos de Moura (UFRJ), Robson Augusto Souza dos Santos (UFMG) e Fábio Fortes (UEZO), que abriram seus laboratórios ou doaram recursos para a realização deste trabalho.

Aos amigos e família que, por sorte, são muitos para serem citados.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Dos-Santos, Raoni da Conceição. **A ANGIOTENSINA-(1-7) ESTÁ ENVOLVIDA NA RESPOSTA À PRIVAÇÃO HÍDRICA?** 2015. 91p Dissertação (mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rj, 2015.

A manutenção do equilíbrio dos fluidos corporais é essencial para a manutenção da vida, de forma que pequenas alterações de volume sanguíneo ou osmolaridade incorrem em respostas neuroendócrinas correspondentes para recuperação da homeostase. O sistema renina angiotensina está implicado nesse controle destas funções. As ações clássicas das angiotensinas (ANG) são mediadas pela ANG-II, no entanto, um metabólito de ANG-II, a ANG-(1-7), está envolvida em diversas respostas fisiológicas. A influência da ANG-(1-7) sobre desafios osmóticos ainda não está bem estabelecida. Este estudo avaliou a participação da ANG-(1-7) na resposta a privação hídrica (PRIV) em diversos parâmetros. A microinjeção de ANG-(1-7) não alterou a ingestão de água ou salina hipertônica em condições basais – grupo controle (CTRL), no entanto, os animais PRIV-salina ingeriam mais água ($25 \pm 4,7$ vs. $5,9 \pm 2,7$ ml, $p < 0,05$ aos 240 min) e salina hipertônica ($9 \pm 2,4$ vs. 1 ± 1 ml, $p < 0,05$ aos 120 min) que os CTRL-salina enquanto os animais PRIV-ANG-(1-7) aumentavam a ingestão de água ($29,1 \pm 4,3$ vs $5,1 \pm 2,3$ ml, $p < 0,05$ aos 60 min) mais rápido, sem aumentos significativos na ingestão de salina hipertônica ($7,1 \pm 2,4$ vs $1,6 \pm 1,6$ ml, $p > 0,05$ aos 300 min) em relação ao CTRL-Salina. Estes resultados indicam que este peptídeo pode ser importante na resposta normal a privação hídrica. A análise imunoistoquímica demonstrou que a densidade do receptor MAS aumentou nos núcleos mediano pré-óptico (MNPO) e supra-óptico (SON) após privação hídrica. A intensidade de marcação de proteína FOS aumentou em todos os núcleos estudados, porém as duplas marcações só foram significativamente maiores no SON e MNPO, indicando que estes podem estar envolvidos nas respostas observados no experimento comportamental. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a ANG-(1-7) está implicada na resposta à privação hídrica, sendo o MNPO uma região de especial interesse para o estudo destas respostas, no entanto, estudos futuros são necessários para se investigar esta hipótese.

Palavras-chave: Angiotensina-(1-7), privação hídrica, encéfalo

ABSTRACT

Dos-Santos, Raoni da Conceição. **IS ANGIOTENSIN-(1-7) INVOLVED IN THE RESPONSE TO WATER DEPRIVATION?** 2015. 91p Dissertation (master in Physiological Sciences). Instituto de Biologia, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rj, 2015.

The maintenance of body fluid balance is essential for the maintenance of life, hence small alterations of blood volume or osmolarity incur in corresponding neuroendocrine responses for homeostasis recovery. The renin – angiotensin system is implicated in the control of these functions. The classic actions of angiotensins (ANG) are mediated by ANG-II, however, a metabolite of ANG-II, ANG-(1-7), is involved in several physiological responses. The influence of ANG-(1-7) on osmotic challenges is not well established. This study evaluated the participation of ANG-(1-7) on the responses to water deprivation in several parameters. The microinjection of ANG-(1-7) did not change water and sodium intake in basal conditions, however, the WD-Vehicle drank more water (25 ± 4.7 vs. 5.9 ± 2.7 ml, $p < 0.05$ at 240 min) and hypertonic saline (9 ± 2.4 vs. 1 ± 1 ml, $p < 0.05$ at 120 min) than CTRL-Vehicle, meanwhile the WD-ANG-(1-7) drank more water faster (29.1 ± 4.3 vs. 5.1 ± 2.3 ml, $p < 0.05$ at 60 min) without increasing the hypertonic saline intake (7.1 ± 2.4 vs 1.6 ± 1.6 ml, $p > 0.05$ at 300 min) when compared to CTRL-Vehicle. These results demonstrate that this peptide may be important in the normal response to water deprivation. The immunohistochemistry demonstrated that MAS increases in the median pre-optic nucleus (MNPO) and supra optic nucleus (SON) after WD. FOS increases in all studied nuclei, however double-labelling is only significant increased in SON and MNPO. Indicating that these nuclei may be involved in the behavioral responses observed. So, ANG-(1-7) is implicated in the response to water deprivation, and the MNPO is a region of special interest in the study of this regulation, however, future studies are necessary to verify this hypothesis.

Key words: Angiotensin-(1-7), water deprivation, brain

LISTA DE ABREVIACOES

ANG	Angiotensina
AP	Área postrema
JGA	Aparelho justaglomerular
AT1	Receptor de angiotensina do tipo 1
AT2	Receptor de angiotensina do tipo 2
AVP	Vasopressina
BNST	Núcleo leito da estria terminal
CVLM	Núcleo Caudal-ventro-lateral do bulbo
DMX	Núcleo Dorsal Motor do Vago
DRN	Núcleo Dorsal da Rafe
ACE	Enzima conversora de angiotensina
ACE2	Enzima conversora de angiotensina do tipo II
ICV	Intra cerebroventricular
LPBN	Núcleo parabraquial lateral
MnPO	Núcleo Mediano Pré-óptico
MRGPCR	Receptor ligado a proteína G relacionado ao gene MAS
MRGPCRD	Receptor ligado a proteína G relacionado ao gene MAS do tipo D
NA	Núcleo ambíguo
NO	Óxido nítrico
NOs	Óxido nítrico sintase
NTS	Núcleo do trato solitário
OCV	Órgãos circunventriculares
OT	Ocitocina
OVLT	Órgão vascular da lamina terminal
PALM	Porção magnocelular lateral do núcleo paraventricular do hipotálamo
PAMM	Porção magnocelular medial do núcleo paraventricular do hipotálamo
PAMP	Porção parvocelular medial do núcleo paraventricular do hipotálamo
PAPO	Porção parvocelular posterior do núcleo paraventricular do hipotálamo
PBN	Núcleo parabraquial
PI3K	Inositol trifosfato cinase

PVN	Núcleo paraventricular do hipotálamo
RAS	Sistema renina-angiotensina
RVLM	Núcleo Rostro-ventro-lateral do bulbo
SFO	Órgão subfornicial
SON	Núcleo supra-óptico

ABBREVIATION LIST

ACE	Angiotensin Converting Enzyme
ACE2	Type 2 Angiotensin Converting Enzyme
ANG	Angiotensin
AP	<i>Area postrema</i>
AT1	Angiotensin Receptor Type 1
AT2	Angiotensin Receptor Type 2
AVP	Vasopressin
BNST	Bed Nucleus of the <i>Stria Terminalis</i>
CVLM	Caudal Ventro-lateral medulla
DMX	Dorsal Motor Vagus nucleus
DRN	Dorsal Rafe Nucleus
ICV	Intra cerebroventricular
JGA	Juxtaglomerular Apparatus
LPBN	Parabraquial Lateral Nucleus
MnPO	Median Pre-optic Nucleus
MRGPCR	MAS Related G Protein Coupled Recetor
MRGPCRD	MAS Related G Protein Coupled Recetor type D
NA	Ambiguous Nucleus
NO	Nitrous Oxide
NOs	Nitrous Oxide Synthase
NTS	Nucleus of the Solitary Tract
OCV	Circunventricular Organs
OT	Oxytocin
OVLT	<i>Organum Vasculosum</i> of the <i>Lamina Terminalis</i>
PALM	Lateral Magnocellular Portion of the Paraventricular Hypotalamic Nucleus
PAMM	Medial Magnocellular Portion of the Paraventricular Hypotalamic Nucleus
PAMP	Medial Parvocellular Portion of the Paraventricular Hypotalamic Nucleus

PAPO	Posterior Parvocellular Portion of the Paraventricular Hypotalamic Nucleus
PBN	Parabrachial Nucleus
PI3K	Inositol Triphosphate Kinase
PVN	Paraventricular Nucleus of the Hypothalamus
RAS	Renin-Angiotensin System
RVLM	Rostral Ventro-Lateral Medulla
SFO	Subfornical Organ
SON	Supra-optic Nucleus

SUMÁRIO / SUMMARY

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Controle Central Dos Fluidos Corporais	1
1.2 Sistema Renina Angiotensina	5
1.2.1 ACE / ANG-II / AT1	5
1.2.2 ACE2 / ANG-(1-7) / MAS	7
1.2.3 ANG-(1-7), MAS e o sistema nervoso central	9
2 JUSTIFICATIVA	13
3 OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo Geral	14
3.2 Objetivos Específicos	14
4 MATERIAL E MÉTODOS	15
4.1 Delineamento Experimental	15
4.2 Experimento 1: Efeito Da Privação Hídrica Sobre O RAS Periférico	16
4.3 Experimento 2: Efeito Da Administração ICV De Ang-(1-7) Sobre A Ingestão De Água E Salina Hipertônica	16
4.4 Experimento 3: Efeito Da Privação Hídrica Sobre Os Núcleos Envolvidos No Controle Hidroeletrólítico	17
4.4.1. Imunohistoquímica	17
4.5 Análise Estatística	19
5 RESULTADOS	20
6 DISCUSSÃO	29
6.1 Perspectivas	36
ENGLISH VERSION	37
1 INTRODUCTION	
1.1 Body Fluid Homeostasis	37
1.2 Renin-Angiotensin System	41
1.2.1 ACE / ANG-II / AT1	41
1.2.2 ACE2 / ANG-(1-7) / MAS	42
1.2.3 ANG-(1-7), MAS and the Central Nervous System	45
2 JUSTIFICATION	49
3 OBJECTIVES	50
3.1 General Objectives	50
3.2 Specific Objectives	50

4 MATERIAL AND METHODS	51
4.1 Animals	51
4.2 Experiment 1: Effects of Water Deprivation on Fluid Balance	52
4.3 Experiment 2: Effects of ICV Administration of ANG-(1-7) in water and hypertonic saline intake	52
4.4 Experiment 3: Effect of Water Deprivation on the Expression of FOS, MAS and FOS-MAS double labeling in Nuclei Related to Hydroelectrolytic Control	53
4.4.1. Immunohistochemistry	53
4.5 Statistical Analysis	54
5 RESULTS	55
6 DISCUSSION	64
6.1 Perspectives	70
7 REFERÊNCIAS / REFERENCES	71

1 INTRODUÇÃO

1.1 Homeostase Dos Fluidos Corporais

A regulação de volume e osmolaridade dos fluidos corporais é condicional para a manutenção da vida e está sob estrito controle homeostático, de forma que os compartimentos extra- e intracelulares mantêm o volume de líquido e a concentração iônica dentro de uma estreita faixa de variação, e pequenas alterações nessas variáveis são corrigidas por respostas renais e comportamentais adequadas (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; MECAWI et al., 2015).

O conteúdo de água e eletrólitos no meio interno é mantido pelo balanço entre a sua ingestão e excreção, principalmente urinária. De forma que quando ocorre perda de água, como após exercícios ou privação hídrica, ocorre aumento da osmolaridade que é compensado por uma resposta de sede e conseqüentemente de ingestão de água, além de liberação de vasopressina (AVP) que atua nos rins causando reabsorção de água, de forma a se balancear este sistema, diminuindo a osmolaridade (BOURQUE, 2008). Em seguida se desenvolve o apetite por sódio, de forma a se compensar uma possível hiposmolaridade causada pela ingestão de água (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010).

Se a perda de água progride e a ingestão de água não for suficiente para balancear a perda ocorre diminuição progressiva do volume de líquido no compartimento extracelular, este tem, conseqüentemente, um aumento da concentração dos íons. Por sua vez, este aumento faz com que a água se difunda do meio intra- para o extracelular, de forma que uma privação hídrica causa desidratação de ambos os compartimentos (DE LUCA et al., 2007).

Uma complexa rede neural modula estas respostas (Fig. 1). A concentração de sódio/osmolaridade plasmática é percebida por células especializadas presentes em regiões desprovidas de barreira hematoencefálica (órgãos circunventriculares – OCVs), especialmente na parede anterior do terceiro ventrículo, como órgão subfornicial (SFO) e órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT) (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2013). Neurônios presentes no SFO e OVLT possuem NaX, um canal para sódio, de forma que o aumento de sódio plasmático é percebido por estes neurônios iniciando uma resposta de inibição do apetite por sódio, contrariamente, a diminuição do Na⁺ leva a uma diminuição dessa via inibitória, induzindo o apetite por sódio. Concomitantemente ao aumento do Na⁺ ocorre vazamento

osmótico de água por canais de aquaporina, levando a desidratação destas células, que ativam neurônios que culminam com aumento da ingestão hídrica e liberação de AVP em resposta a osmolaridade aumentada (NODA; SAKUTA, 2013).

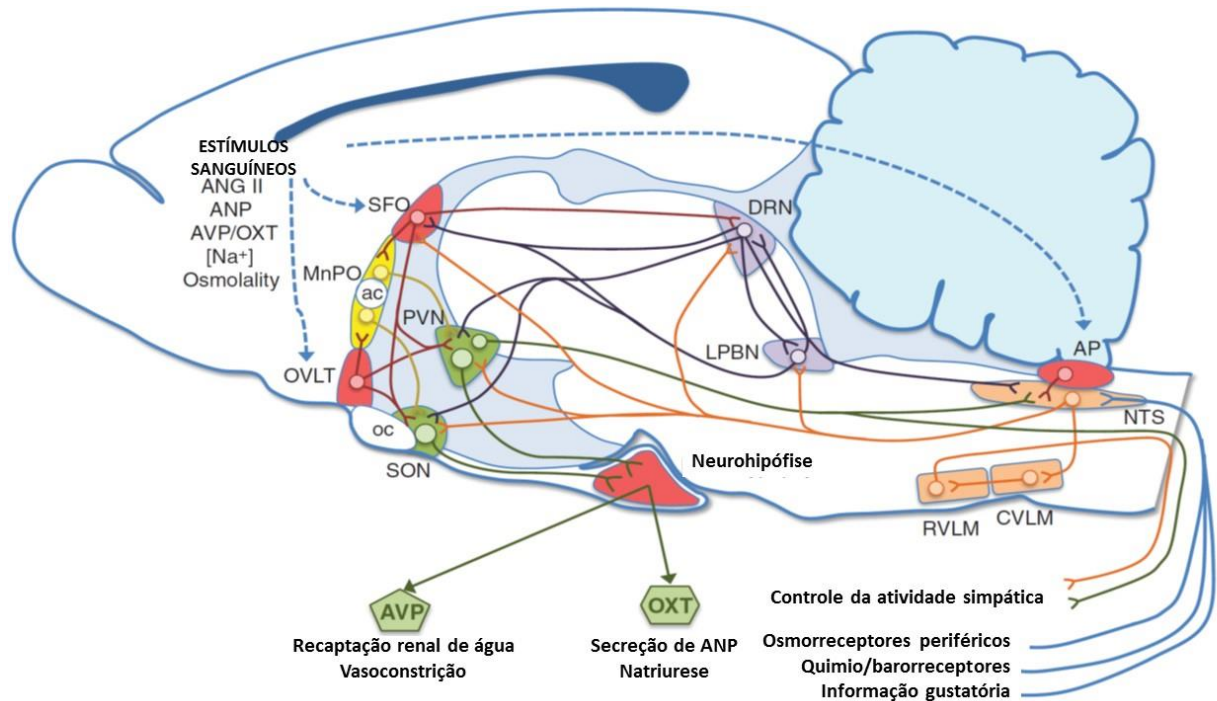


Figura 1: Representação esquemática da rede neural envolvida com o equilíbrio hidroeletrólítico (adaptada de MECAWI et al., 2015). Sódio e hormônios plasmáticos alcançam os núcleos subfornicial (SFO), órgão vasculoso da lamina terminal (OVLT) e área postrema (AP), regiões desprovidas de barreira hemato-encefálica; enquanto informações aferentes provenientes de quimio- baro- e osmoreceptores alcançam o NTS. Estas regiões se conectam com o sistema serotoninérgico (Núcleos dorsal da rafe, DRN; e parabraquial lateral, LPBN) e regiões ligadas aos controles da pressão arterial (Núcleos rostro-ventrolateral do bulbo, RVLM; e caudal-ventrolateral do bulbo, CVLM) e neuroendócrino (Núcleos paraventricular do hipotálamo, PVN; supra-óptico, SON; e neurohipófise). Incorrendo nas respostas adequadas a alterações no volume/osmolaridade sanguíneos.

O OVLT (BISLEY et al., 1996) e o SFO (HIYAMA et al., 2002) possuem células sensíveis às alterações na osmolalidade/concentrações de sódio no plasma ou líquido cérebro-raquidiano (NODA, 2006). Estas regiões possuem conexões diretas com os núcleos mediano pré-óptico (MnPO), paraventricular (PVN) e supra-óptico (SON) do hipotálamo (WEISS; HATTON, 1990a), núcleos da rafe mesencefálica (LIND, 1986) e *Locus Coeruleus* (SLY et al., 1999).

O MnPO apresenta barreira hemato-encefálica, no entanto, se conecta reciprocamente com o SFO e o OVLT, compondo com estes a parede ântero-ventral do terceiro ventrículo, intrinsicamente implicada no controle da sede e apetite por sódio (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2013). Além dessas, o MnPO recebe aferências, dentre outros, do SON, dos núcleos do trato solitário (NTS), rostro-ventrolateral do bulbo (RVLM), parabraquial lateral (LPBN) e dorsal da rafe (DRN), e envia eferências para o SON e PVN (tanto parvo- quanto magnocelular) (MCKINLEY et al., 2015).

No PVN e SON se iniciam as projeções magnocelulares do sistema neurohipofisário, responsáveis pela liberação de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT) (ARMSTRONG, 1995). Adicionalmente, o PVN se comunica ainda com diversos núcleos, dentre eles DRN, LC, LPBN, núcleo ambíguo (NA), NTS medial, RVLM, área postrema (AP) e dorsal motor do vago (DMX) (GEERLING et al., 2010). Sendo o PVN, portanto, uma região essencial para as respostas autonômicas, comportamentais e endócrinas.

Adicionalmente, áreas límbicas integrativas como amígdala e núcleo leito da estria terminal (BNST) são implicadas no controle do balanço hidrossalino, enviando projeções tanto para o LPBN quanto para o NTS (ANDRADE-FRANZE et al., 2010) ao passo que recebem aferências serotoninérgicas do LPBN e angiotensinérgicas do SFO (JOHNSON; THUNHORST, 1997). Lesões nessas regiões induzem aumento da ingestão de salina hipertônica frente a depleção de sódio, interessante, a ingestão de água não foi alterada, indicando que esses núcleos estão relacionados apenas com a natriorexigênese (ZARDETTO-SMITH; BELTZ; JOHNSON, 1994). Especificamente, a região ventro-lateral do BNST está implicada na resposta á desafios osmóticos (GEERLING et al., 2010).

O LPBN recebe as informações provenientes do NTS e AP, servindo como ponto de integração entre estas e áreas anteriores – MnPO, PVN, amígdala – sendo, portanto, um importante relê entre sinais aferentes relacionados a pressão e volume sanguíneos. Tendo uma atividade inibitória sobre a sede e apetite por sódio. O LPBN recebe projeções inibitórias de diversos núcleos, retirando a inibição e culminando no comportamento ingestivo (MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014).

O DRN é um núcleo mesencefálico central para o sistema serotoninérgico, este se comunica com SFO, OVLT, MnPO, PVN, LPBN e SON sendo implicado em diversas funções autonômicas e endócrinas; lesões neste núcleo induzem aumento da sede e apetite por sódio tanto basal quanto após diversos desafios fisiológicos (REIS, 2007). O bloqueio farmacológico agudo deste núcleo causa marcado aumento do apetite por sódio em condições

basais (FONSECA et al., 2009). Ou seja, neurônios serotoninérgicos do DRN disparam tonicamente inibindo o apetite por sódio, certos estímulos são capazes de inibir esta atividade tônica, portanto permitindo o aparecimento deste comportamento.

Adicionalmente, receptores de alta pressão, localizados nas circulações sistêmica e renal, veiculam alterações de volume no plasma por projeções ascendentes que ativam áreas do tronco cerebral (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). Enquanto outras estruturas, como o NTS (que recebe informações viscerais e de alterações no volume/pressão periféricas) e a AP (um OCV) também enviam projeções noradrenérgicas (WEISS; HATTON, 1990b) ou serotoninérgicas (CIRIELLO; LAWRENCE; PITTMAN, 1984), via LPBN, para o PVN e para o SON.

Um desafio osmótico, como a privação hídrica, causa hipernatremia, hipovolemia e ativa o sistema renina angiotensina (RAS). O RAS e os osmorreceptores veiculam essa informação para o sistema nervoso central como resultado ocorre a ativação de diversos destes núcleos causando sede e, posteriormente, apetite por sódio. (DE LUCA JR. et al., 2010).

A privação hídrica de 24 horas aumentou a expressão de FOS – uma proteína nuclear que é expressa quando o neurônio é ativado – no SON, MnPO e OVLT (DE LUCA JR. et al., 2002; JI et al., 2005; SLY; MCKINLEY; OLDFIELD, 2001), porém quando o animal era reapresentado à água os níveis de FOS reduziam apenas no SON e se mantinham altos no OVLT e MnPO (JI et al., 2005). Adicionalmente, a privação hídrica de 48 horas foi capaz de aumentar a expressão de FOS no RVLM, NTS, AP, sem alterar nos núcleos caudal ventrolateral do bulbo (CVLM) e parabraquial (PBN); quando a água era reapresentada o aumento de FOS era similar na AP e RVLM, ainda maior no NTS, e expressivo no PBN, enquanto o CVLM se mantinha inalterado (JI et al., 2007). Ou seja, estes núcleos são ativados para indução do comportamento de sede e aumento da atividade simpática, e quando ocorre a reapresentação à água, a maioria diminui a ativação enquanto, OVLT e MnPO se mantêm ativos.

Durante a privação hídrica o aumento da atividade simpática e a liberação de vasopressina mantém a pressão arterial dentro de valores normais (DE LUCA JR. et al., 2010). Além de suas funções neuroendócrinas, o PVN apresenta projeções para o RVLM e medula espinhal contribuindo para a ativação pré-autônômica de mecanismos cardiocirculatórios. O bloqueio farmacológico do PVN diminui a pressão arterial, sendo o efeito muito mais pronunciado em animais privados de água (FREEMAN; BROOKS, 2007).

Um estudo similar também encontrou evidências indiretas de aumentos na atividade dessas regiões (OVL, MnPO, SFO, SON, PVN, AP, NTS, RVLM) frente a privação hídrica de 24 e 48 horas, que voltavam aos valores basais 48 horas após a rerepresentação (YOSHIMURA et al., 2013).

O controle da ingestão de fluidos é modulado por diversos sistemas, dentre os quais destaca-se o RAS, que culmina com a produção de Angiotensina II, seu mais notório mediador, cujo potencial indutor de sede foi demonstrado há décadas (EPSTEIN; FITZSIMONS; ROLLS, 1970; FITZSIMONS; SIMONS, 1969).

1.2 Sistema Renina-Angiotensina

1.2.1 ECA / ANG-II / AT1

O angiotensinogênio é liberado pelo fígado na circulação e clivado pela renina, uma enzima secretada pelo aparelho justa-glomerular renal (JGA) se transformando em angiotensina (ANG) I, que por sua vez se torna ANG-II, pela ação da enzima conversora de angiotensina (ACE)(fig. 2) (HALL, 2003). O JGA é composto pela macula densa e células justa-glomerulares e mesangiais, e induz a produção de renina por fatores sistêmicos (pressão arterial baixa, concentrações diminuídas de Na^+ ou Cl^- ou estimulação β -adrenérgica) ou locais (óxido nítrico, prostaglandinas), como revisado por Mecawi et al. (2015). A liberação de renina, é o fator limitante para ativação do RAS periférico (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). As ações clássicas do RAS são obtidas pela ANG-II atuando no receptor de angiotensina do tipo I (AT1) (STEGBAUER; COFFMAN, 2011). O RAS é um dos mais importantes moduladores nas respostas de controle de volume e pressão arterial

A ANG-II atua no controle da função cardiovascular, renal e comportamental (MECAWI et al., 2015) demonstra ações vasoconstritoras, aumento da proliferação celular e hipertrofia cardíaca (SANTOS; FERREIRA; SIMOES, 2008), além de induzir um comportamento dipsogênico (EPSTEIN; FITZSIMONS; ROLLS, 1970; FITZSIMONS; SIMONS, 1969).

O RAS está implicado na patogênese da maioria dos casos de hipertensão, de forma que fármacos que antagonizam sua atuação, como inibidores de ACE e bloqueadores de AT1, são amplamente utilizados na clínica médica (MOON, 2013). Estes fármacos são eficientes em diminuir a pressão arterial, no entanto, não são mais eficientes do que fármacos que atuam

sobre outros sistemas implicados no desenvolvimento desta doença, contrariamente ao que seria esperado (BLOOD PRESSURE LOWERING TREATMENT TRIALISTS et al., 2008). Isto se dá pois, possivelmente, essas drogas atuam sobre o RAS plasmático, não sendo capazes de atuar efetivamente sobre os diversos RAS teciduais (FERRARIO et al., 2014). Além do RAS clássico, a maquinaria completa para geração de angiotensinas está presente em diversos tecidos, de forma que a sua produção pode diferir em função do tecido estudado. Uma vez que os componentes do RAS sistêmico não atravessam a barreira hemato-encefálica, porém atuam nos OCVs induzindo aumento do RAS central, este torna-se um importante foco de estudo (PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006).

O OVLT e SFO, são sensíveis aos níveis plasmáticos de ANG-II, levando a ativação do RAS central quando o RAS sistêmico está aumentado (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2013). Lind *et al.* (LIND; SWANSON; GANTEN, 1984) demonstraram que a ANG-II está presente no SFO, e que sua expressão não se altera após privação hídrica (de 72 horas) ou nefrectomia que, respectivamente, aumentam ou diminuem a ANG-II sistêmica, e supuseram que o SFO responde aos níveis sistêmicos de ANG-II, bem como a aferências angiotensinérgicas centrais modulando a sede. Posteriormente, demonstraram que o SFO possui conexões bidirecionais com a rafe mesencefálica, recebendo projeções serotoninérgicas e enviando projeções angiotensinérgicas (LIND, 1986).

A indução de sede pela ANG-II é conhecida há décadas, injeção intravenosa (FITZSIMONS; SIMONS, 1969) ou central (EPSTEIN; FITZSIMONS; ROLLS, 1970) de ANG-II é capaz de induzir um comportamento dipsogênico. A ANG-II atua através de seus receptores AT1 causando, em geral, sede e aumento da pressão arterial. Diminuição da atividade, por bloqueios farmacológicos ou lesões, do SFO, OVLT e MnPO, impedem a resposta dipsogênica frente a administração, sistêmica ou central, de ANG-II. A desidratação extracelular, causada por privação hídrica, furosemida ou hemorragia causam aumento da expressão de AT1 nestes núcleos, bem como aumento da ingestão hídrica (COBLE et al., 2015).

Interessantemente, a privação hídrica é capaz de aumentar ACE sem alterar AT1 em diversos núcleos deste sistema (BOURASSA; SPETH, 2010), o que sugere que nesta situação outros componentes do RAS podem estar envolvidos com a resposta.

1.2.2 ACE2 / ANG-(1-7) / MAS

Diversos mediadores do RAS foram descobertos, dentre os quais destacam-se a ANG-(1-7) e o receptor de angiotensinas do tipo II (AT2), que são antagonistas funcionais do RAS clássico em diversas situações (CHAPPELL et al., 2014; FERRARIO et al., 2014). Há evidências, no entanto, de que a ANG-(1-7) centralmente pode apresentar atividade similar à da ANG-II (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2002; CHENG et al., 2012; HAN et al., 2012; SANTOS et al., 2003a; SILVA; SANTOS; FONTES, 2005; SUN et al., 2012).

A angiotensina-(1-7) foi considerada um metabólito inativo da ANG-II, porém a demonstração de efeitos indutores da liberação de AVP em preparações hipotálamo-hipofisárias (SCHIAVONE et al., 1988) estimulou uma série de estudos sobre este peptídeo. Os estudos que se seguiram demonstraram a oposição entre os efeitos da ANG-II e ANG-(1-7) em diversas respostas (FERRARIO et al., 1991, 1997). Contrariamente as observações anteriores, no animal *in vivo*, a injeção de ANG-(1-7) não foi capaz de alterar a quantidade de vasopressina plasmática (MAHON et al., 1995).

Posteriormente foram descobertas a enzima que produz a ANG-(1-7) (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000) e o receptor onde ela atua (SANTOS et al., 2003a, 2003b), respectivamente, enzima conversora de angiotensina do tipo 2 (ACE2) e receptor MAS. Atualmente, a oposição entre os eixos ACE / ANG-II / AT1 e ACE2 / ANG-(1-7) / MAS já foi descritas em diversas regiões, como coração (FERRARIO, 2006; FERREIRA; SANTOS, 2005), rim (DILAURO; BURNS, 2009; PINHEIRO; SIMOES, 2012) e cérebro (XU; SRIRAMULA; LAZARTIGUES, 2011). Adicionalmente, a ACE hidrolisa a ANG-(1-7) em ANG-(1-5) um metabólito sem atividades descritas (DEDDISH et al., 1998).

A ACE2 pode transformar ANG-I em ANG-(1-9) (DONOGHUE et al., 2000), que posteriormente é convertida em ANG-(1-7) pela ação da ACE ou endopeptidases (RICE et al., 2004). Sua atividade principal, porém, é a conversão de ANG-II diretamente em ANG-(1-7), que ocorre com afinidade 400x mais alta do que a conversão em ANG-I (VICKERS et al., 2002). Logo, a ACE2 é uma enzima chave para a produção de ANG-(1-7). A via de síntese está resumida na Figura 2.

Diversos estudos demonstraram que ocorre ligação específica da ANG-(1-7) ao receptor MAS (GIRONACCI et al., 2011; JANKOWSKI V et al., 2011; PINHEIRO SV et al.,

2004; SANTOS et al., 2003a; SAVERGNINI et al., 2010). Por sua vez o receptor MAS atua principalmente por dois mecanismos: 1- estimula a via da inositol trifosfato cinase (PI3K)/AKT aumentando a atividade da óxido nítrico sintase (NOs), uma enzima produtora de óxido nítrico (NO); e 2- pela estimulação da fosfolipase A2 (BADER et al., 2014). Não há evidências de que a ANG-(1-7) esteja envolvida em outras vias intracelulares ativadas por MAS (influxo de Ca²⁺ e acumulação de inositol 1,4,5-trifosfato, por exemplo) o que implica que estas possam ser atividades constitutivas deste receptor (ZHANG et al., 2012), este estudo, no entanto, usou agonistas de MAS e não a ANG-(1-7) per se o que denota a possibilidade de que este receptor apresente ações diferenciadas em função do ligante (BADER et al., 2014). Atualmente existem dois antagonistas para receptor MAS: o A779, também chamado de D-Ala⁷-Ang-(1-7); e D-Pro⁷-Ang-(1-7).

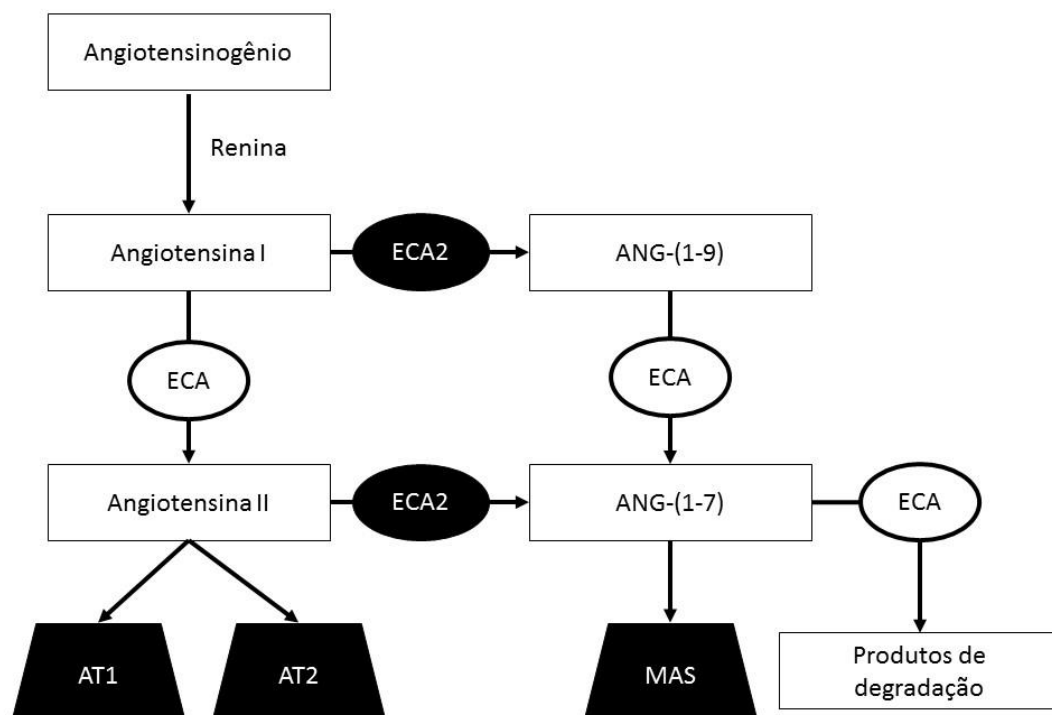


Figura 2: Esquema simplificado das principais vias de síntese de Ang-(1-7). A ANG-(1-7) é sintetizada diretamente de ANG-II ou indiretamente pela ANG-I e atua, principalmente, pelo receptor MAS. ACE (enzima conversora de angiotensinas); AT1, AT2 (receptores para angiotensinas do tipo 1 e 2). Adaptado de Santos *et. al* (SANTOS; FERREIRA; SIMOES, 2008).

A ANG-(1-7), aumenta a expressão de toda a via da PI3K / AKT / NOs e este efeito é bloqueado por A779, o que implica que esta atuação ocorre via MAS (SAMPAIO et al., 2007). Injeção ICV de ANG-(1-7) induz aumento da concentração de NO do PVN, e este efeito é bloqueado por A779 (WHITAKER; MOLINA, 2013). Adicionalmente, a ANG-(1-7) diminui a liberação hipotalâmica de noradrenalina, e este efeito é bloqueável não apenas por antagonistas de MAS, mas também por antagonismo de AT2, ou NOs, de forma que estas são possíveis mediadores desta resposta (GIRONACCI et al., 2000).

A ANG-(1-7) pode atuar ainda por receptores ligados a proteína G relacionados a MAS (MRGPR), especialmente os do tipo D (MRGPRD) (GEMBARDT et al., 2008). Os MRGPR, são uma família de receptores órfãos, porém alguns peptídeos são considerados como possíveis ligantes para sua ativação. Onde destacam-se os MRGPRD, que estão presentes em neurônios, onde causam aumento da excitabilidade, e artérias, onde causam vasodilatação, e são responsivos a ANG-(1-7) (SOLINSKI; GUDERMANN; BREIT, 2014).

Dentre as ações sistêmicas da ANG-(1-7), destacam-se: (I) no coração, melhora da função cardíaca, e diminuição da hipertrofia, arritmia e fibrose; (II) nos vasos, vasodilatação e diminuição da angiogênese, trombose e proliferação celular; (III) no rim, aumento do fluxo sanguíneo, natriurese/diurese; (IV) no fígado, vasodilatação local e diminuição da fibrose; e (V) no cérebro, facilitação do barorreflexo, modulação do tônus simpático e liberação de vasopressina (SANTOS; FERREIRA; SIMOES, 2008).

A privação hídrica é capaz de induzir aumento de ANG-(1-7) plasmática, proporcionalmente maior do que o de ANG-II (BOTELHO et al., 1994). O que é coerente com os resultados de outros autores que demonstraram que a privação hídrica aumenta ACE, mas não AT1 (BOURASSA; SPETH, 2010), ou seja, ocorre um aumento de ANG-II, conseqüente do aumento de ACE, esta ANG-II possivelmente sirva de substrato para a ACE2 privilegiando a formação de ANG-(1-7) durante a privação hídrica, indicando uma participação desse peptídeo nestas respostas.

1.2.3 ANG-(1-7), MAS e o sistema nervoso central

A ACE2 é uma enzima chave para a produção de ANG-(1-7). Está presente em várias áreas do encéfalo do camundongo sendo expressa nos neurônios – e não em células gliais – com mais intensidade em áreas relacionadas ao controle cardiovascular e hidroeletrólítico,

como OVLT, SFO, PVN, AP, DMX, NTS, RVLM e NA (DOOBAY et al., 2007). Neurônios imunorreativos a ANG-(1-7) foram identificados no PVN (especialmente na porção magnocelular), no SON e BNST (BLOCK et al., 1988). Becker et al. (BECKER et al., 2007) avaliaram, pela técnica de imunofluorescência, a presença do receptor MAS em algumas regiões do encéfalo do rato, tendo encontrado marcação no CVLM, RVLM, NTS, Oliva inferior, PVN, amígdala e área pré-optica (relacionadas às respostas hidroeletrólíticas e cardíacas) e em áreas não relacionadas como hipocampo e sub-regiões corticais. O MAS também foi encontrado em regiões do córtex, hipocampo, amígdala e gânglios da base, sendo importante ressaltar que ela é expressa principalmente em neurônios e vasos sanguíneos (FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012), ou seja, dada a sua presença ubíqua esse eixo pode estar envolvido em uma miríade de respostas fisiológicas.

Em condições normais o rato apresenta níveis similares de ANG-I, ANG-II e ANG-(1-7) no hipotálamo, bulbo e amígdala (CHAPPEL, 1989). A ACE2 (DOOBAY et al., 2007), ANG-(1-7) (BLOCK et al., 1988) e MAS (BECKER et al., 2007) estão presentes em vários núcleos da circuitaria relacionada ao equilíbrio hidroeletrólítico, de forma que este peptídeo possivelmente está implicado na resposta neuroendócrina, comportamental e simpática a desafios osmóticos. No entanto, surpreendentemente, poucos estudos avaliaram a relação entre este eixo e o controle de fluidos corporais.

Estes demonstraram que o consumo de água e salina hipertônica não se altera com injeção de Ang-(1-7) no diencéfalo (FITZSIMONS, 1971); via intracerebroventricular (ICV) em condições basais (COONEY; FITZSIMONS, 1993; MAHON et al., 1995; SWANSON et al., 1973) ou frente injeção central de Ang-II, um desafio dipsogênico (COONEY; FITZSIMONS, 1993; SWANSON et al., 1973). Adicionalmente, injeção ICV de Ang-(1-7) não alterou a quantidade de AVP no plasma, tampouco aumentou a expressão de FOS no SFO, SON e PVN; porém, foi capaz de induzir aumento da expressão de FOS no MnPO e OVLT, sendo este muito menor do que o induzido por ANG-II (MAHON et al., 1995).

Contrariamente às observações anteriores, Schiavone *et. al* (1988) demonstraram que a ANG-(1-7) é equipotente à ANG-II para induzir a liberação de AVP em preparações hipotálamo-hipofisárias, e ainda que um antagonista de AT1 também é capaz de induzir liberação de AVP, apesar deste ser de menor proporção do que o encontrado após ANG-II ou ANG-(1-7). Ou seja, o acúmulo de ANG-II causado pelo antagonista pode ter levado ao aumento de ANG-(1-7) e com isso causado liberação de vasopressina.

Apesar desses resultados conflitantes, sabe-se que a atuação da ANG-(1-7) é mediada pelo aumento de NO (BADER et al., 2014; SAMPAIO et al., 2007), e o NO centralmente inibe o disparo de neurônios magnocelulares do SON e PVN, diminuindo a liberação de AVP e OT (RUGINSK et al., 2015). Administração ICV de L-NAME (um bloqueador de NOs) aumenta a liberação de AVP, OT, e peptídeo natriurético atrial, enquanto um precursor de NO alcança os efeitos opostos, sendo inclusive capaz de bloquear a atuação da ANG-II (REIS et al., 2007). Possivelmente, a inibição nitrérgica da liberação de AVP é mediada pela ANG-(1-7) (WHITAKER; MOLINA, 2013). Ou seja, a ANG-(1-7) pode aumentar (SCHIAVONE et al., 1988) ou não alterar a liberação de AVP (MAHON et al., 1995), no entanto informações indiretas sugerem que esta talvez seja capaz de inibir a liberação de AVP em determinadas situações.

Não obstante poucos estudos terem avaliado a relação entre o eixo ACE2 / MAS / ANG-(1-7) central e a sua relação com o balanço hidroeletrólítico, diversos trabalhos avaliaram a relação deste eixo com respostas hemodinâmicas e cardiovasculares.

Quando microinjetada no ventrículo lateral, a ANG-(1-7) não altera a PA de animais normais, no entanto diminuiu a pressão arterial média em animais transgênicos com aumento de renina e após hemorragia (DOBRUCH et al., 2003). A ANG-(1-7) possivelmente medeia a melhora barorreflexa causada pelo tratamento com enalapril (um bloqueador de ACE) em ratos espontaneamente hipertensos, pois o A779 (antagonista do receptor MAS) quando administrado pela ICV reverteu este efeito (BRITTO et al., 1997), similarmente ao estudo de Benter *et al.* (BENTER et al., 2011) onde a administração de A779, também reverteu efeitos protetores cardiovasculares causados pelo bloqueio de ACE. Ainda neste sentido, Gilliam-Davis *et al.* (GILLIAM-DAVIS et al., 2011) demonstraram que o bloqueio crônico de receptor AT1 aumenta a expressão de RNAm para ECA2, Neprilisina e MAS no área dorsomedial do tronco encefálico de animais idosos, sugerindo a influência da ANG-1-7 nesta situação.

Administração ICV aguda (FENG et al., 2008) ou crônica (FENG et al., 2010) de ANG-II causam resposta hipertensiva e o aumento da ingestão de água; no entanto, em animais transgênicos com expressão de ACE2 aumentada, esta resposta foi atenuada. No tratamento crônico, a administração de A779 – um antagonista de ANG-(1-7) – abole estes efeitos, o que sugere que a ANG-(1-7) seja a responsável por estas respostas.(FENG et al., 2010) Enquanto agudamente, a administração de A779 não alterou esta resposta, o que sugere

que estes efeitos sejam mediados apenas pela diminuição da ANG-II que ocorre pela sua conversão em ANG-(1-7) (FENG et al., 2008).

No entanto, no encéfalo as ações da ANG-(1-7) diferem em função da região de administração. Em algumas regiões apresenta ação similar à da ANG-II, por exemplo, no PVN a administração de ANG-(1-7) ou ANG-II aumentam a atividade do nervo simpático renal, sem alterar a pressão arterial (SILVA; SANTOS; FONTES, 2005). Outro estudo encontrou aumento da pressão arterial após administração de ANG-(1-7) no PVN de animais hipertensivos, além de aumento da expressão de receptor MAS no núcleo e no *drive* simpático para o coração (HAN et al., 2012).

Resultados similares demonstraram que ANG-(1-7) ou ANG-II, administrados no PVN aumentaram a modulação simpática reflexa em animais hipertensivos renovasculares, e que seus antagonistas apresentam efeito oposto em condições basais, sugerindo uma participação endógena desses peptídeos (SUN et al., 2012). Ainda neste sentido, Silva *et al.* (SILVA; SANTOS; FONTES, 2005) demonstraram que o bloqueio do receptor MAS pelo A779 em condições basais foi suficiente para diminuir a atividade do nervo simpático renal, o que implica que a ANG-(1-7) está envolvida na manutenção tônica desta atividade. Além disso, ambos apresentam também ação hipertensiva quando administrados no RVLM (SANTOS et al., 2003a), e hipotensiva no CVLM (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2002).

Cheng e colaboradores (CHENG et al., 2012) demonstraram que a injeção de renina no NTS causa uma resposta hipotensora que é atenuada pela administração de lisinopril (um inibidor de ACE), losartan (um inibidor de AT1) e de A779, ou seja, neste núcleo a ANG-II e a ANG-1-7 possivelmente apresentam efeitos sinérgicos. Adicionalmente, este estudo demonstrou que ambos são mediados pela via da Gq-PI3k-Akt-NOs (CHENG et al., 2012).

Em suma, apesar de periféricamente os efeitos da ANG-(1-7) antagonizarem os efeitos da ANG-II, centralmente os efeitos centrais da ANG-(1-7) são controversos, demonstrando por vezes ações semelhantes ou sinérgicas à ANG-II. Adicionalmente, pouco se sabe sobre a atuação da ANG-(1-7) em resposta a desafios a homeostase dos fluidos corporais, ou seja, como a ANG-(1-7) afeta os comportamentos ingestivos, autonômicos ou neuroendócrinos que ocorrem em função de alterações do volume/osmolaridade plasmáticos.

2 JUSTIFICATIVA

A manutenção da composição do meio interno é condicional para a vida, de forma que a hipovolemia e/ou aumento da osmolaridade plasmática incorrem em uma série de alterações neuroendócrinas e comportamentais para regulação destes componentes, dentre estes destacam-se a sede e o apetite por sódio, sensações que induzem os comportamentos de ingestão de água e sódio, respectivamente (MECAWI et al., 2015). A ANG-II, está implicada no controle destes comportamentos, no entanto, a relação entre a ANG-(1-7) e a resposta de sede e apetite por sódio não está estabelecida. A presença de ACE2 (DOOBAY et al., 2007), ANG-(1-7) (BLOCK et al., 1988) e MAS (BECKER et al., 2007) em regiões da circuitaria que controla essas respostas, bem como o marcado aumento de ANG-(1-7) após privação hídrica (BOTELHO et al., 1994), no entanto, sugerem a participação da ANG-(1-7) nesse contexto. Logo, tornam-se necessários estudos que analisem a atuação da ANG-(1-7), especialmente em relação à resposta hidroeletrólítica, já que a mesma ainda não foi elucidada pela literatura.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se a ANG-(1-7) influencia nas respostas neuroendócrinas induzidas pela privação hídrica.

3.2 Objetivos Específicos

I. O comportamento de ingestão de água e salina hipertônica (1,8%) causada por microinjeção de ANG-(1-7) no ventrículo lateral, em condições basais ou após privação hídrica.

II. A expressão de FOS e MAS, bem como sua dupla marcação, após a privação hídrica em núcleos envolvidos com a regulação hidroeletrolítica, como OVLT, SFO, AP, PVN, SON, etc.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Todos os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo: 23083.011701/2013-20) e estão em consonância com as legislações vigentes. Foram utilizados neste estudo ratos Wistar, obtidos do Biotério de Criação do Departamento de Ciências Fisiológicas (DCFis – IB – UFRRJ) ou da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP-USP), mantidos em caixas coletivas (contendo 4 a 5 animais cada) no Biotério de Manutenção do DCFis (IB – UFRRJ), ciclo claro-escuro de 12/12 horas (luz acesa entre as 06:00 e as 18:00 horas), temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, e com acesso *ad libitum* à água e à ração. Para minimizar o estresse inespecífico, estes foram manuseados diariamente durante a semana anterior aos experimentos.

Os animais foram separados em dois grupos:

- I) Controle (CTRL): que mantinha as condições de repouso, ou;
- II) Privação Hídrica (PRIV): que tinha os fluidos removidos no por 24 horas antecedentes ao experimento.

Em seguida foram submetidos a um dos 3 experimentos.

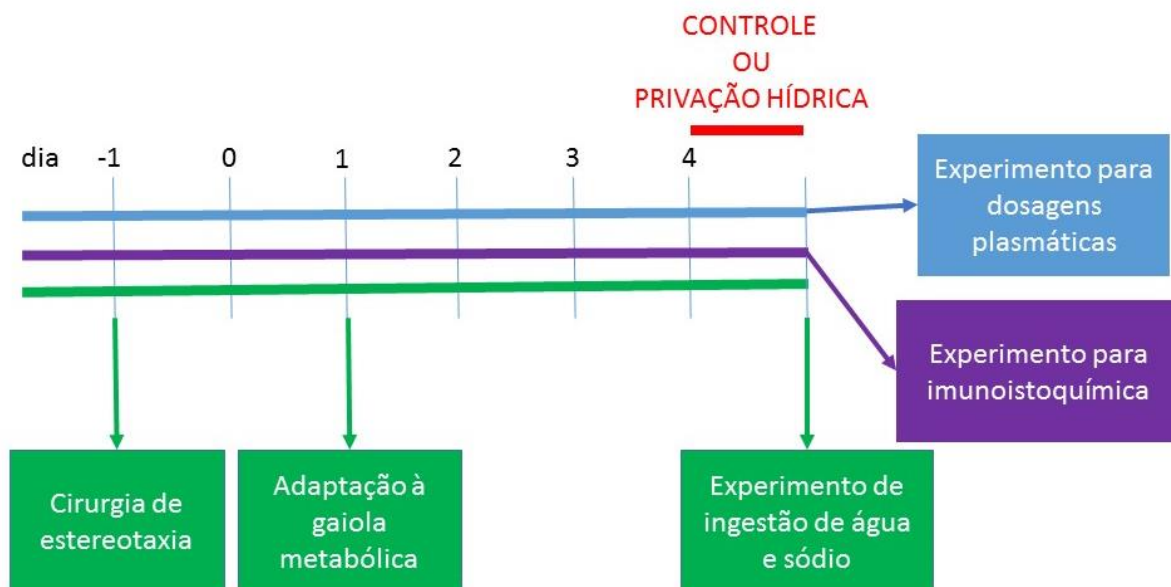


Figura 3. Linha do tempo representativa dos experimentos realizados. Detalhes estão descritos no texto. Cada cor representa um dos 3 experimentos realizados: Azul – experimento 1; verde – experimento 2; roxo – experimento 3.

4.2 Experimento 1: Efeito Da Privação Hídrica Sobre os Fluidos Corporais

Este experimento foi feito para verificar a desidratação causada pela privação hídrica, além de possíveis alterações nos componentes do RAS periférico. Os animais foram pesados e em seguida submetidos aos protocolos CTRL ou PRIV, em seguida pesados novamente e decapitados. O sangue foi coletado pelo tronco e armazenado em tubos capilares de microhematócrito; alíquotas com heparina (10µl/ml de sangue) ou inibidores de peptidases (fluoreto de fenilmetilsulfonil – PMSF 1 mM 10µl/ml de sangue; ácido etilenodiamino tetraacético – EDTA 10% 50 µl/ml de sangue; Pepstatina A 0.5 mM 10µl/ml de sangue; Fenantrolina 30mM 50 µl/ml de sangue).

A parte coletada em tubos capilares de microhematócrito foi centrifugada (2000 RPM por 5 minutos) e o hematócrito avaliado pela escala. Os pesos foram utilizados para se calcular a variação do peso após privação hídrica.

Para determinação da osmolaridade foram utilizados 10µl de plasma em um osmômetro de bancada (OSMETTE II™, modelo 5005© Precision Systems Inc.), para quantificação do Na⁺ plasmático o plasma foi diluído (1:100) e dosado em um fotômetro de chama (modelo MICRONAL b262).

4.3 Experimento 2: Efeito Da Administração ICV De ANG-(1-7) Sobre A Ingestão De Água E Salina Hipertônica

Animais pesando entre $288,3 \pm 4,7$ g foram utilizados no procedimento de estereotaxia. Estes foram anestesiados com quetamina e xilazina (75 e 25 mg/kg, respectivamente, por via intraperitoneal). Quando em plano anestésico foram afixados a um aparelho estereotáxico para implantação de uma cânula (aço inox, 12 mm, 0,6 mm de diâmetro externo). A cânula foi inserida no ventrículo lateral, nas coordenadas: ântero-posterior = 0,5 mm posterior ao bregma; latero-lateral = 1,4 mm; dorso-ventral = 3,6 mm a partir da calota craniana, de acordo com o atlas de Paxinos & Watson (2005).

Após a cirurgia foram utilizados o cetoprofeno (3mg/kg, subcutâneo) e Pentabiótico Veterinário (Fort Dodge Saúde Animal, 0,1ml/100g, via intramuscular). Após dois dias de recuperação foram colocados em gaiolas metabólicas com água, ração, e salina hipertônica (NaCL 1.8%) ad libitum por 5 dias para adaptação. A gaiola apresenta garrafas graduadas como bebedouros, as quais foram preenchidas com água filtrada, ou solução salina hipertônica.

Após a adaptação foram submetidos aos protocolos CTRL e PRIV. No experimento todos foram brevemente contidos para microinjeção de salina 0.9% ou ANG-(1-7) na concentração de 3 nmol, ambos no volume de 2µl, por 30 a 60s. Para administração dos fármacos foi utilizada uma seringa Hamilton de 10 µl conectada a um tubo de polietileno PE-10 e uma agulha gengival (3 mm de diâmetro e 0,6 mm mais longa que cânula implantada). Os animais CTRL ou PRIV foram submetidos ao veículo, salina 0,9 %, ou dose de 3 nmol / 2 µl de ANG-(1-7). Após a microinjeção, a água e a salina hipertônica foram reapresentadas e a ingestão das mesmas foi medida pela leitura da graduação dos bebedouros nos tempos de 30, 60, 120, 180, 240 e 300 minutos.

Este experimento objetiva verificar se a ANG-(1-7) altera a resposta dipsogênica e natriorexigênica normais à privação hídrica, bem como construir uma curva dose-resposta da atuação deste peptídeo neste contexto.

4.4 Experimento 3: Efeito da Privação Hídrica Sobre a Expressão de FOS, MAS e Duplas Marcações FOS-MAS em Núcleos Envolvidos No Controle Hidroeletrólítico

Após o protocolo os animais foram anestesiados com dose letal de thiopental (100mg/kg por via intraperitoneal) e submetidos à perfusão transcardíaca com, aproximadamente, 150 ml de PBS (pH 7,2) seguidos de 500 ml de paraformaldeído 4% diluído em tampão fosfato (PB) 0,1 M (pH 7,2) para fixação do encéfalo. Estes foram removidos e pós-fixados durante 1 hora com a mesma solução de paraformaldeído 4% e armazenados em solução de sacarose (30% em tampão fosfato) a 4°C, até a completa desidratação do tecido. Em seguida os encéfalos foram levados ao criostato (Micron), seccionados em fatias de 30 µm e armazenados em triplicata a -20 °C em solução *anti-freezing* (200ml de glicerol; 300ml de etilenoglicol; 500 ml de PBS, pH 7,2) até a realização dos procedimentos. Essas fatias foram utilizadas para os procedimentos de imunistoquímica. Após a marcação as fatias eram observadas em microscópio e comparadas ao atlas estereotáxico (Paxinos, 2005), as lâminas que continham as áreas de interesse foram utilizadas no estudo.

4.4.1. Imunoistoquímica

A imunistoquímica foi realizada para identificação de FOS – uma proteína nuclear expressa apenas em neurônios que foram ativados frente a um determinado estímulo – e do receptor MAS. Para tal, as fatias foram lavadas com PB 0,01M, após as lavagens e etapas de bloqueio da peroxidase endógena e das ligações inespecíficas, as secções foram incubadas

com o anticorpo primário anti-FOS (1:10000; Calbiochem - NovaBiochem, San Diego – CA, EUA) à 4 °C por 16 – 20 horas. A seguir, as secções foram lavadas e incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário biotilado anti-rabbit (1:200, Vector Laboratories Inc, Burlingame – CA, EUA) e, após mais um ciclo de lavagens, com o complexo Avidina – Biotina – Peroxidase (ABC, Elite PK 6100, Vector Laboratories Inc, Burlingame – CA, EUA) por 60 minutos. Por fim, após mais um ciclo de lavagens, foram utilizados os cromógenos Diaminobenzidina (0,5 mg / mL, DAB; Sigma-AldrichCo, St Louis – MO, EUA), cloreto de cobalto 5% e sulfato de níquel 1%, diluídos em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) juntamente com peróxido de hidrogênio 30%, para conferir a coloração (roxa-escura a preto) do núcleo das células neuronais que expressam a proteína FOS.

Após mais um ciclo de lavagens, foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas e a incubação com o anticorpo primário anti-MAS (1:10000, 4 °C por 48 – 72 horas). Este anticorpo foi gentilmente cedido pelo professor Robson Augusto dos Santos – UFMG; e produzido como descrito em outros estudos (BECKER et al., 2007; SAMPAIO et al., 2007). A seguir, as secções foram lavadas e incubadas por 60 minutos com anticorpo secundário biotilado anti-mouse (1:200, Vector Laboratories Inc, Burlingame – CA, EUA) e, após mais um ciclo de lavagens, com o complexo Avidina – Biotina – Peroxidase (ABC, Elite PK 4000, Vector Laboratories Inc, Burlingame – CA, EUA) por 60 minutos. Por fim, após mais um ciclo de lavagens, foi utilizada a Diaminobenzidina (0,5 mg / mL, DAB; Sigma-AldrichCo, St Louis – MO, EUA), diluídos em tampão fosfato 0,1 M (pH 7,2) juntamente com peróxido de hidrogênio 30%, para conferir a coloração (marrom-clara).

As imagens foram captadas por um microscópio (Zeiss), ligado a um computador com o programa Axiovision. As fotografias foram utilizadas para a quantificação dos: I) neurônios imunorreativos à proteína FOS; e II) neurônios imunorreativos ao receptor MAS. Foram considerados como FOS aqueles que apresentaram o núcleo visivelmente corado (roxo-escuro a preto), enquanto que neurônios com citoplasmas imunorreativos a MAS foram identificados a partir da presença evidente de corpo celular neuronal (em coloração marrom-claro). A contagem dos neurônios imuno-marcados foi realizada por um avaliador sem a identificação do grupo experimental, e com padronização de parâmetros individuais de coloração e delimitação dos núcleos em cada corte. A delimitação dos núcleos cerebrais de interesse foi realizada de acordo com as coordenadas descritas por Paxinos & Watson (2005).

4.5 Análise Estatística

Para as análises de ingestão foi utilizada a análise de variância de duas vias (two-way ANOVA) e o pós-teste de Bonferroni, enquanto para todas as demais foi utilizado o teste T de Student não pareado. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$. As análises foram feitas no software *Graphpad Prism*, v.6.0. Todos os dados estão descritos como média \pm erro padrão da média.

5 RESULTADOS

O hematócrito ($38 \pm 0,5$ vs. $41,2 \pm 0,7$ %; $p=0,0042$) e a osmolaridade plasmática ($306,9 \pm 2,9$ vs. $323,1 \pm 4$ mOsm; $p=0,0032$) aumentaram significativamente nos animais privados de água (Figura 4A e B). O peso corporal aumentou nos animais CTRL, enquanto diminuiu nos animais PRIV ($1,8 \pm 1,5$ vs. $-13,3 \pm 0,8$; $p < 0,0001$; Figura 4C).

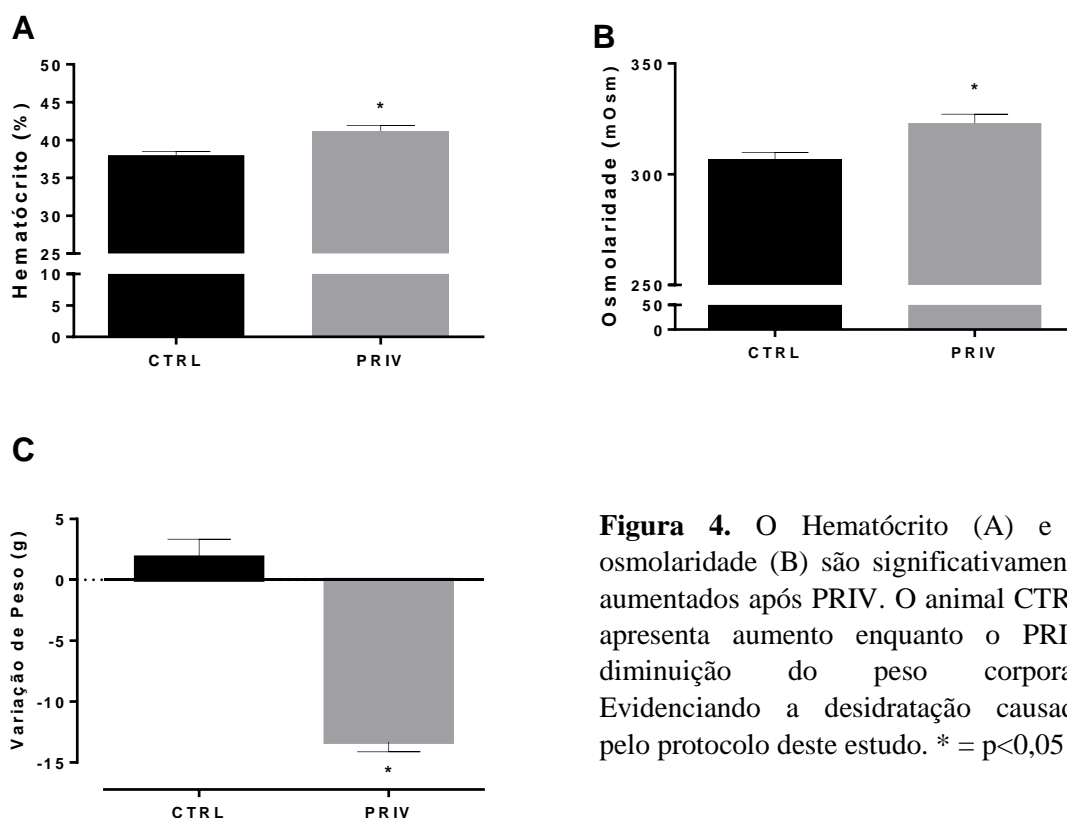


Figura 4. O Hematócrito (A) e a osmolaridade (B) são significativamente aumentados após PRIV. O animal CTRL apresenta aumento enquanto o PRIV diminuição do peso corporal. Evidenciando a desidratação causada pelo protocolo deste estudo. * = $p < 0,05$

Quanto a ingestão hídrica (Figura 5A), a ANG-(1-7) não altera a ingestão em condições basais (aos 300 minutos, CTRL-Veículo = $6,1 \pm 3$ vs. CTRL-ANG-(1-7) = $17,8 \pm 5,4$, $p > 0,05$) os animais PRIV-Veículo ingerem mais água que os CTRL-Veículo a partir do tempo 240 min (CTRL-Veículo = $5,9 \pm 2,7$ vs. PRIV-Veículo = $25 \pm 4,7$) enquanto os animais PRIV-ANG-(1-7) ingerem mais água que ambos os controles aos 120 minutos (CTRL-Veículo = $5,1 \pm 2,3$; CTRL-ANG-(1-7) = $8,2 \pm 3,1$; PRIV-ANG-(1-7) = $29,1 \pm 4,3$). Estas diferenças se mantiveram até o fim do teste (em 300 minutos, CTRL-Veículo = $6,1 \pm 3$; CTRL-ANG-(1-7) = $17,8 \pm 5,4$; PRIV-Veículo = $26,7 \pm 5,1$; PRIV-ANG-(1-7) = $42,2 \pm 4,3$).

Quanto a ingestão de salina hipertônica (FIG 5B), a ANG-(1-7) não altera a ingestão em condições basais (aos 300 minutos, CTRL-Veículo = $1,6 \pm 1,6$ vs. CTRL-ANG-(1-7) = 0 ± 0). A privação hídrica aumenta a ingestão de salina hipertônica aos 120 minutos em relação ao CTRL-ANG-(1-7) (CTRL-ANG-(1-7) = 0 ± 0 vs. PRIV-Veículo = $9 \pm 2,4$) e em 300 minutos contra ambos os controles (CTRL-Veículo = $1,6 \pm 1,6$; CTRL-ANG-(1-7) = 0 ± 0 ; PRIV-Veículo = $10,6 \pm 2,9$). O grupo PRIV-ANG-(1-7) não apresentou diferenças contra os outros grupos (em 300 minutos, CTRL-Veículo = $1,6 \pm 1,6$; CTRL-ANG-(1-7) = 0 ± 0 ; PRIV-Veículo = $10,6 \pm 2,9$; PRIV-ANG-(1-7) = $7,1 \pm 2,4$).

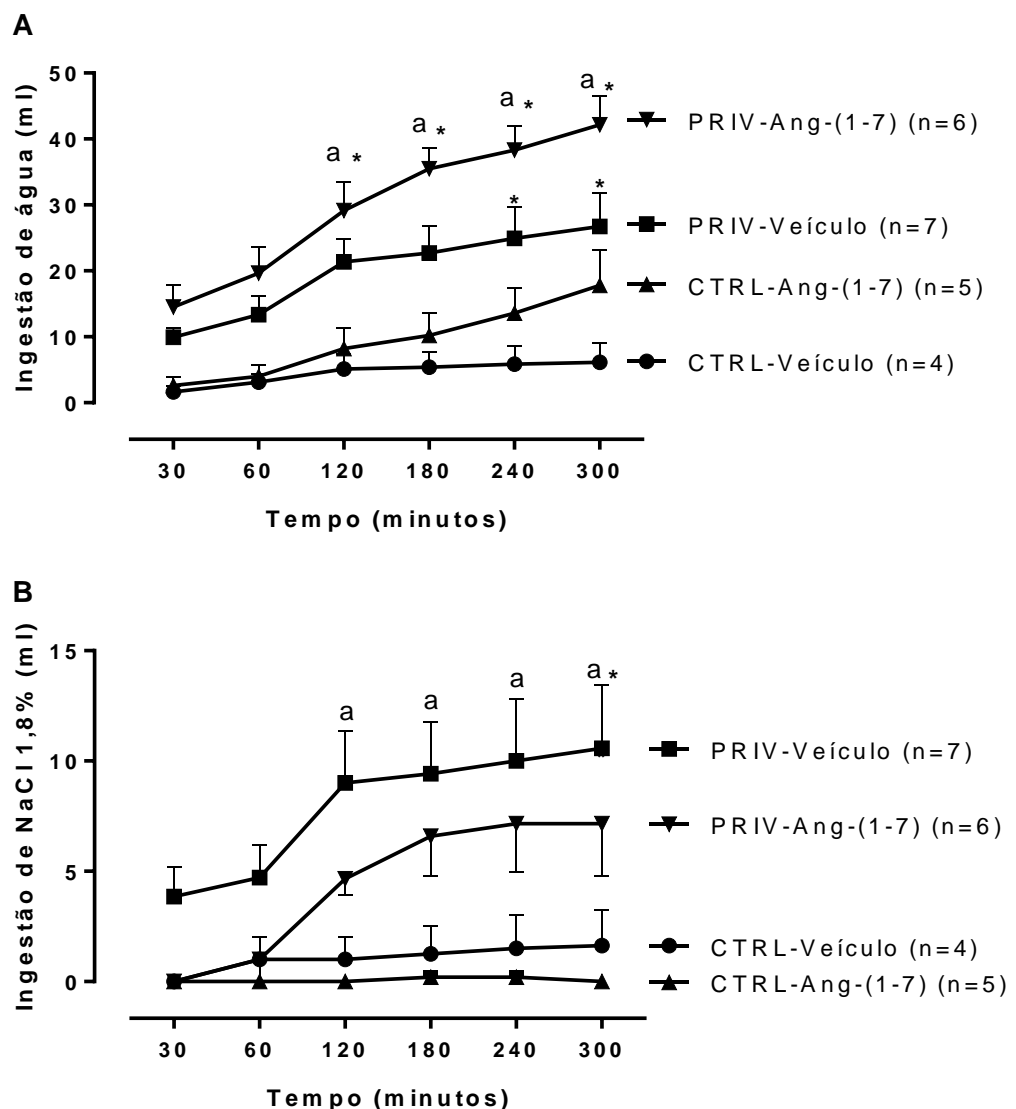


Figura 5. Efeito da microinjeção intra-cerebroventricular de Angiotensina-(1-7). A ANG-(1-7) é capaz de acelerar o aumento da ingestão de água em função da privação hídrica de 24 horas (A); enquanto parece diminuir a ingestão de salina hipertônica (B. * = $p < 0,05$ em relação ao CTRL-Salina; a = $p < 0,05$ em relação CTRL-ANG-(1-7)

Quanto aos estudos de imagem, no MnPO (Fig. 6A) após PRIV houve aumento do número de neurônios imunoreativos para a proteína FOS ($5,8 \pm 2$ vs. 42 ± 8 ; $p = 0,0116$), MAS ($11,7 \pm 2,3$ vs. $66,5 \pm 9,5$; $p = 0,0057$) e dupla-marcação ($2,2 \pm 0,1$ vs. $30,5 \pm 1,5$; $p = 0,0001$). No SON (fig. 6B) a privação hídrica aumentou FOS ($4 \pm 0,7$ vs. $33,2 \pm 1,1$; $p < 0,0001$), MAS ($2,6 \pm 1,1$ vs. $26,25 \pm 1,7$; $p < 0,0001$), e dupla marcação ($2,1 \pm 0,9$ vs. $20 \pm 2,9$; $p = 0,0012$).

O PVN foi fotografado em suas diferentes porções, os resultados demonstraram que a privação hídrica, na porção magnocelular lateral (PALM, fig. 7A) aumenta FOS ($14,5 \pm 5,1$; vs. $32,3 \pm 3,5$; $p = 0,0257$), sem alterações de MAS ($59,9 \pm 7,4$ vs. $62,3 \pm 13,6$; $p = 0,8832$) ou duplas-marcações ($10 \pm 2,5$ vs. $19,3 \pm 5,8$; $p = 0,1871$), na porção parvocelular medial (PAMP, figura 7B) FOS aumenta ($20,2 \pm 2,9$ vs. 31 ± 3 ; $p = 0,0427$), sem alterações de MAS ($83,88 \pm 16,1$ vs. $96,5 \pm 5,7$; $p = 0,4426$) ou duplas-marcações ($12,6 \pm 2$ vs. $15,1 \pm 2,5$; $p = 0,48$)(fig.8D) e na porção parvocelular posterior (PAPO, figura 7C) FOS aumenta ($25 \pm 4,7$ vs. $43,5 \pm 4,3$; $p = 0,0334$), sem alterações de MAS ($65,7 \pm 7,5$ vs. $98,7 \pm 12,2$; $p = 0,1027$) ou duplas-marcações ($5,2 \pm 2,9$ vs. $18,9 \pm 6,2$; $p = 0,1602$).

As imagens representativas do MnPO (figura 8), SON (figura 9), PALM e PAMP (figura 10) e PAPO (figura 11) estão representadas posteriormente, enquanto nos órgãos circumventriculares (SFO, AP/NTS e OVLT) a dupla marcação para FOS e MAS foi muito forte, o que impossibilitou a interpretação das imagens (Figura 12).

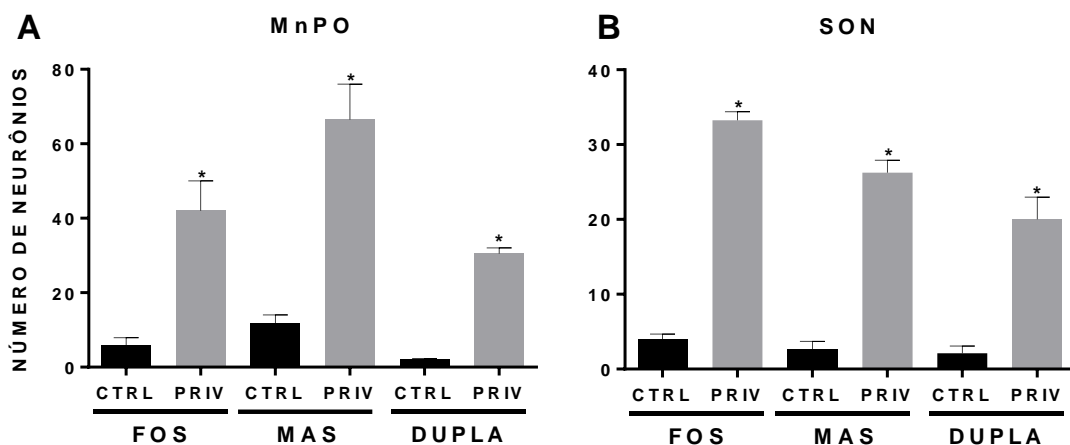


Figura 6. Os dados representam o número de neurônios imunoreativos, nos núcleos mediano pré-optico (MnPO, A) e supra-optico (SON, B). A privação hídrica aumentou FOS, o receptor MAS e as duplas-marcações FOS-MAS, sugerindo que PRIV sensibiliza estes núcleos para uma participação direta da ANG-(1-7). * $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

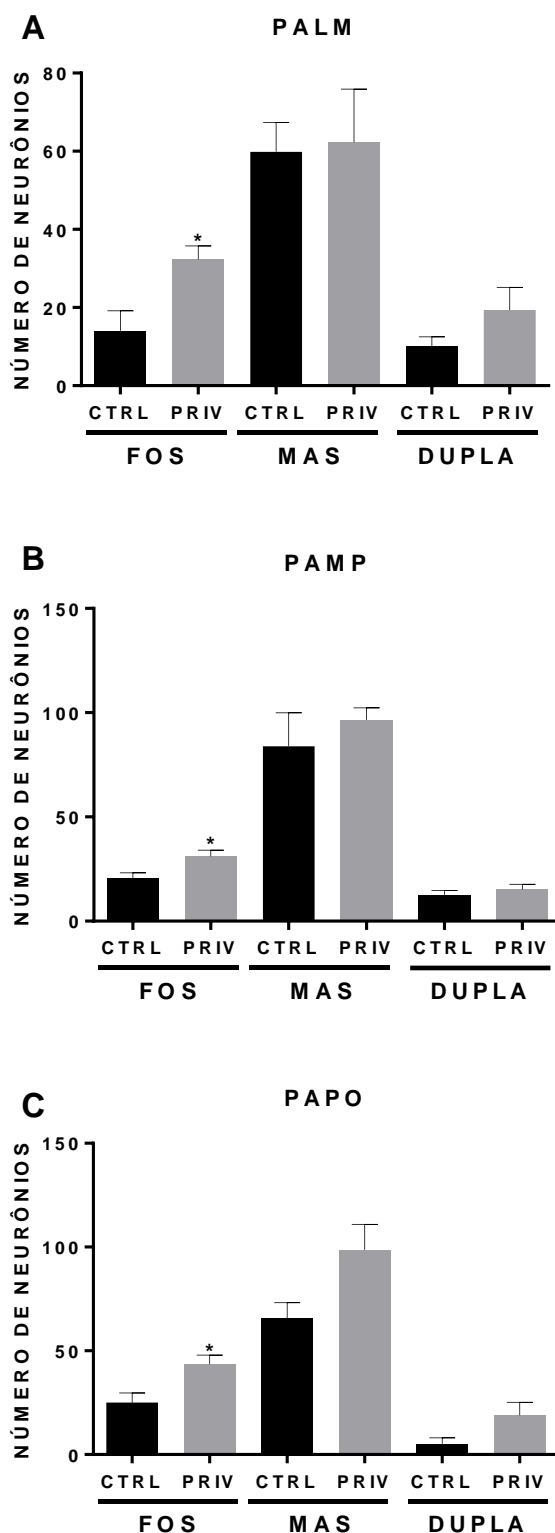


Figura 7. Para análise o PVN foi dividido em seus diversos núcleos, os dados representam o número de células imunorreativas nos núcleos: paraventricular lateral magnocelular (PALM, A); paraventricular medial parvocelular (PAMP, B); e paraventricular posterior parvocelular (PAPO, C). A privação hídrica induziu aumento da expressão de FOS, o receptor MAS foi altamente expresso no grupo controle, sendo encontrado na maioria das células destas regiões, sua expressão se manteve inalterada após privação hídrica. Resultados não significativos para a dupla-marcação FOS-MAS indicam que apesar do aumento da expressão de FOS, este não ocorreu em neurônios que expressam MAS.

* $p < 0,05$ comparado ao grupo controle.

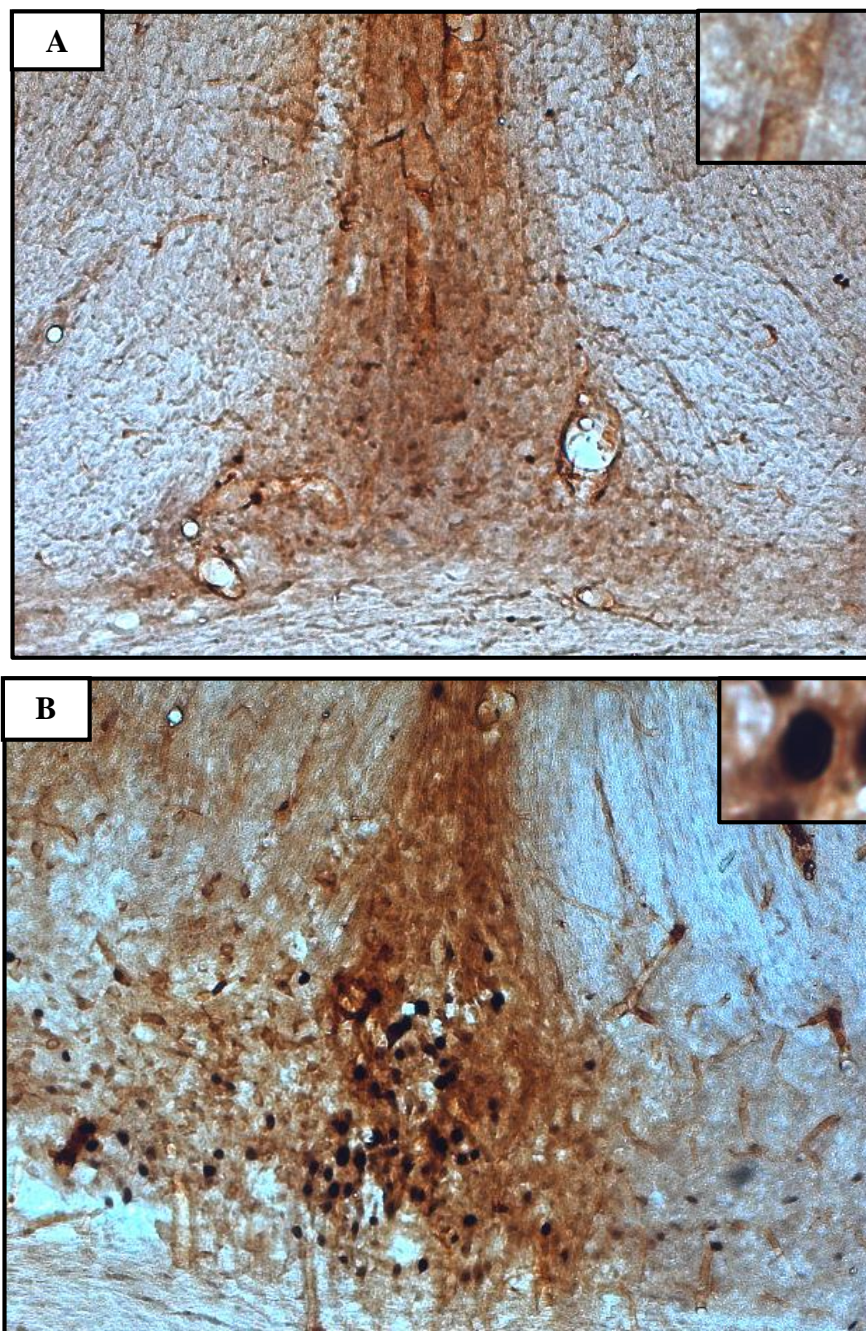


Figura 8. Imagens representativas do MnPO CTRL (A1) ou PRIV (A2). O controle apresenta poucos neurônios marcados para MAS enquanto após privação hídrica FOS, MAS e a sua dupla marcação são mais expressas. Imagens apresentam aumento de 100 vezes, *inserts* apresentam aumento de 400 vezes.

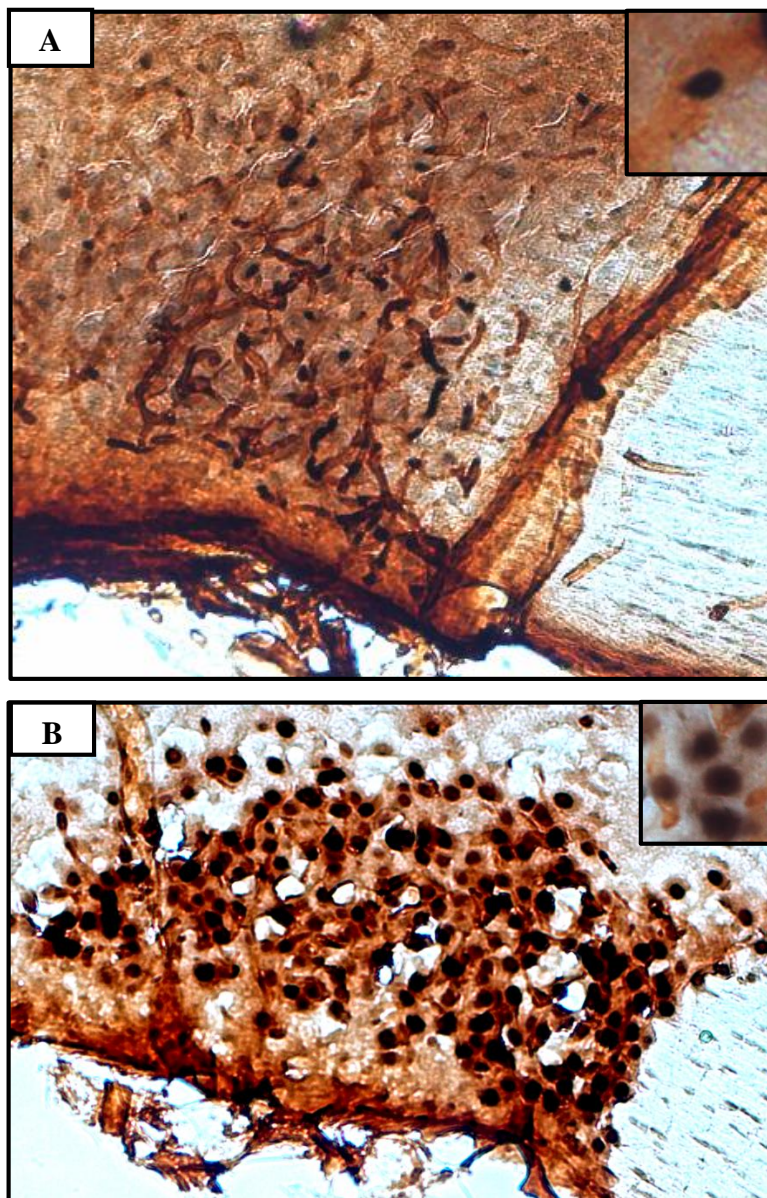


Figura 9. Imagens representativas do SON CTRL (A1) ou PRIV (A2). O controle apresenta poucos neurônios marcados para MAS enquanto após privação hídrica FOS, MAS e a sua dupla marcação são mais expressas, assim como o encontrado no MnPO. Imagens apresentam aumento de 100 vezes, inserts apresentam aumento de 400 vezes.

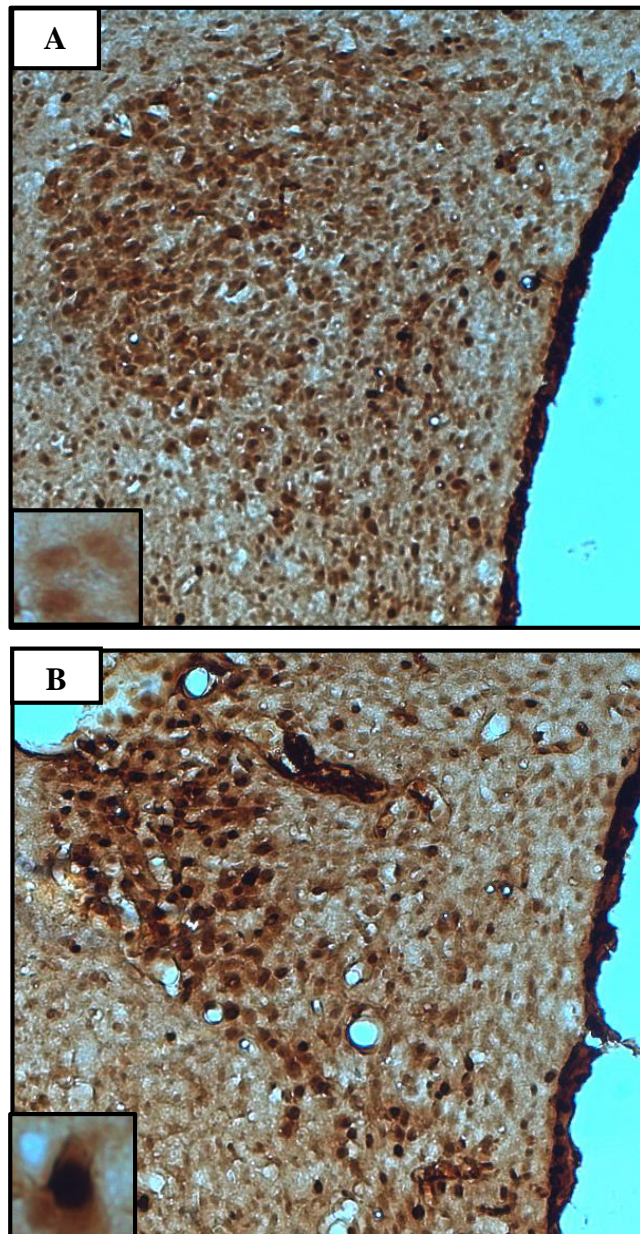


Figura 10. Imagens representativas dos núcleos paraventricular lateral magnocelular (PALM) e medial parvocelular (PAMP) (A1 = CTRL; A2 = PRIV). A Imunorreatividade para FOS aumentou, no entanto para MAS e as dupla marcações não se alteraram. Imagens apresentam aumento de 100 vezes, inserts apresentam aumento de 400 vezes.

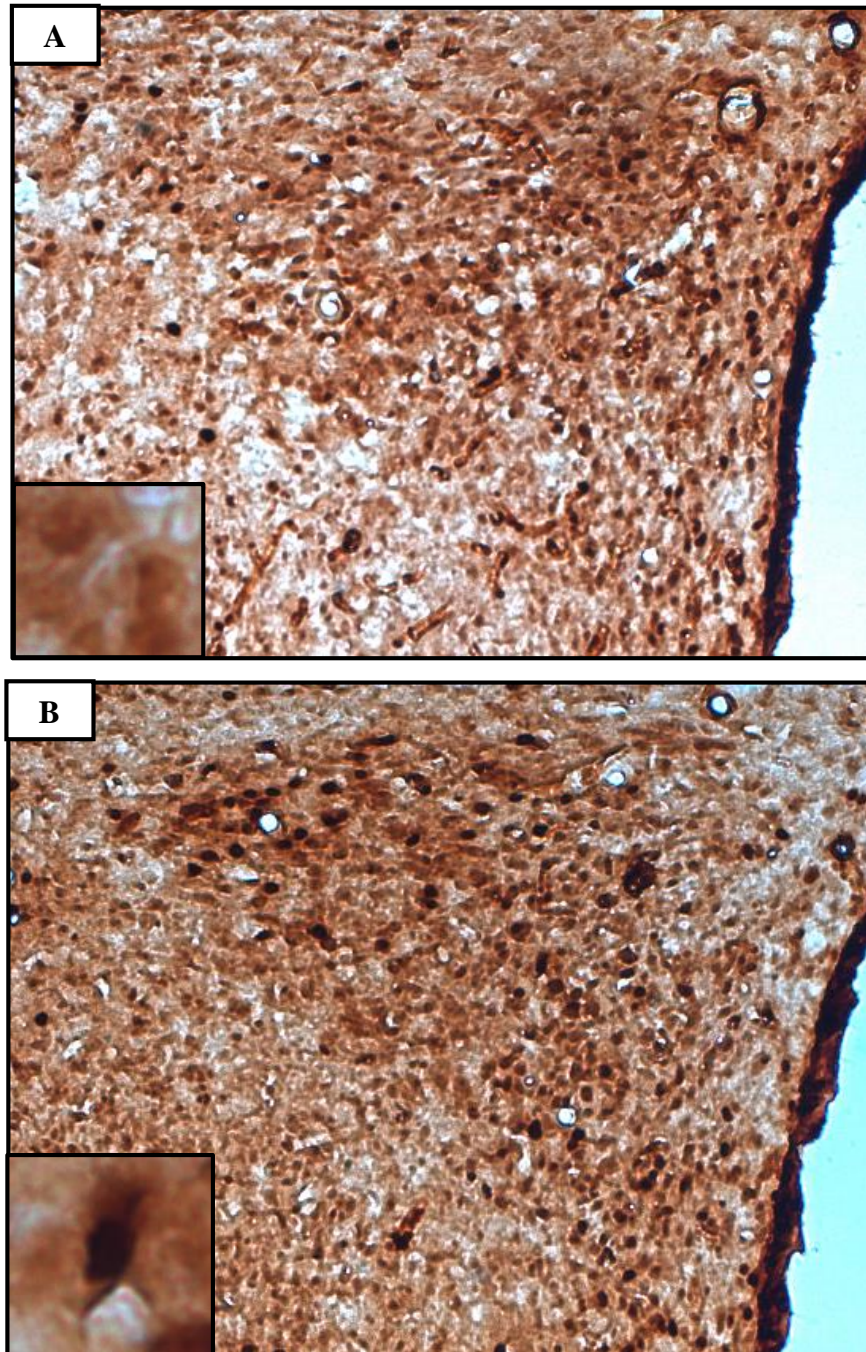


Figura 11. Imagens representativas do núcleo paraventricular parvocelular posterior (PAPO) (A1 = CTRL; A2 = PRIV). A Imunorreatividade para FOS aumentou, no entanto para MAS e as dupla marcações não se alteraram. Imagens apresentam aumento de 100 vezes, inserts apresentam aumento de 400 vezes.

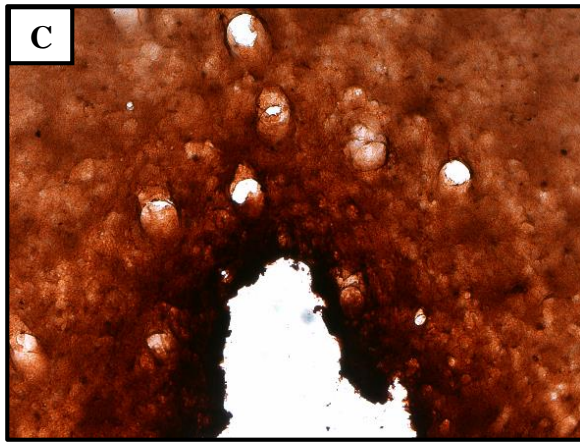
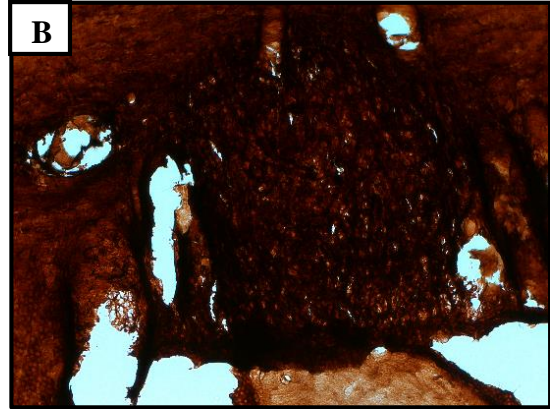
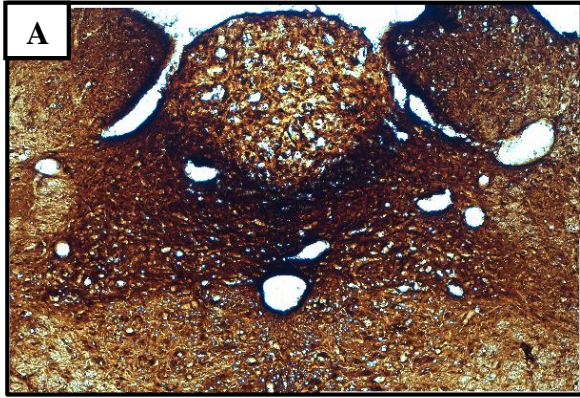


Figura 12. Fotos representativas do complexo dorso vagal (NTS, AP e DMX) (A); SFO (B); e OVLT (C) de animais CTRL. A intensa marcação, possivelmente devida a rica capilarização destas regiões, impossibilitou a contagem de neurônios imunorreativos para FOS/MAS. Imagens apresentam aumento de 100 vezes.

6 DISCUSSÃO

A volemia é mantida por um equilíbrio constante entre a ingestão de água e as perdas por micção, respiração, sudorese e defecação, em condições normais a ingestão é suficiente para compensar a perda. Por exemplo, um aumento da ingestão hídrica é compensado por um aumento da micção e, contrariamente, um aumento da micção é compensado por um aumento da ingestão, de forma que o volume de líquido intra- e extracelular é mantido dentro de uma estreita faixa de variação. A micção é o mais importante mecanismo de perda de água e sódio, uma vez que o volume e composição iônica da urina variam em função da necessidade do organismo. Em contrapartida, a sede e o consequente comportamento de ingestão de água, *per se* ou através da alimentação, são o mecanismo de aumento de água do meio interno. Quando se impede a ingestão hídrica este balanço entre ingestão e excreção é perturbado, levando a uma diminuição do volume sanguíneo, esta perda de água com pouca perda iônica faz com que a osmolaridade plasmática seja aumentada, ou seja, um quadro de desidratação. (BOURQUE, 2008). Neste estudo, a privação hídrica de 24 horas, foi capaz, de aumentar o hematócrito e osmolaridade plasmáticos, indicando uma diminuição do volume plasmático, evidenciando a desidratação causada pela privação hídrica.

Adicionalmente enquanto o peso corporal dos animais CTRL apresentou um pequeno aumento após 24 horas, nos animais PRIV o peso corporal diminuiu, provavelmente pela perda de água em conjunto com a anorexia causada pela osmolaridade aumentada. A privação hídrica *per se* é suficiente para diminuir a ingestão alimentar, e, conseqüentemente, o peso corporal (GREENWOOD et al., 2015).

Em suma, esses parâmetros demonstram que a privação de 24 horas foi suficiente para induzir desidratação neste estudo. A privação hídrica estimula o aumento da atividade do RAS, que induz a sede e o apetite ao sódio. E, adicionalmente, eleva a osmolaridade, o que gera a sede osmótica e inibe o apetite ao sódio. Isso culmina com a ingestão inicialmente de água, e, posteriormente, de salina hipertônica após a correção da osmolaridade (DE LUCA JR. et al., 2010). Nossos dados corroboram essas informações uma vez que demonstram aumento da ingestão de água, e posteriormente, de salina hipertônica.

A microinjeção de ANG-(1-7) não foi capaz de alterar a ingestão basal de água ou salina hipertônica, assim como estudos anteriores (COONEY; FITZSIMONS, 1993; MAHON et al., 1995). Em outros contextos já foi demonstrado que os efeitos da ANG-(1-7) são mais

proeminentes após algum desafio à homeostase, como a hipertensão (CERRATO et al., 2012; DOBRUCH et al., 2003). A ANG-(1-7) só afetou a ingestão de água e sal após a privação hídrica, onde aumentou a ingestão de água e apresentou uma tendência a inibir a de NaCl, ou seja, este peptídeo parece estar envolvido na mediação da sede à privação hídrica, uma vez que é capaz de aumentar a ingestão de água mesmo quando esta já se encontra elevada.

A privação hídrica aumenta a expressão de receptores AT1 potencializando a ação da ANG-II (COBLE et al., 2015), possivelmente, o mesmo ocorra para o receptor MAS potencializando o efeito da ANG-(1-7), de maneira similar ao observado com o receptor AT1. A técnica de imunistoquímica, no entanto, não foi capaz de identificar essa variação na densidade de receptores, uma vez que a maioria dos neurônios dos núcleos estudados apresenta marcação para MAS mesmo no CTRL. O MnPO e SON, núcleos onde poucos neurônios apresentavam imunorreatividade para MAS no CTRL, aumentam significativamente no PRIV. Ou seja, o PVN pode ter aumentado a expressão de MAS, o que não pôde ser verificado pela técnica de imunistoquímica, de forma que este núcleo, assim como os núcleos SFO, OVLT, AP e NTS, devem ser verificados através de técnicas como o *Western Blotting* ou PCR em tempo real para se clarificar essa questão.

Ainda neste sentido, após privação hídrica, ocorre aumento de ANG-II e ANG-(1-7) plasmáticas, no entanto, o aumento de ANG-(1-7) é proporcionalmente maior que o de ANG-II (BOTELHO et al., 1994). No hipotálamo, bulbo e amígdala, o rato apresenta níveis similares de ANG-I, ANG-II e ANG-(1-7) em condições basais (CHAPPEL, 1989), no entanto, não são conhecidas as alterações que a privação hídrica causa sobre esses níveis, possivelmente, a PRIV aumente ambos, com aumento maior na ANG-(1-7), seguindo o mesmo padrão do RAS sistêmico. Adicionalmente, a PRIV é capaz de aumentar ACE, sem aumento de AT1 (BOURASSA; SPETH, 2010), propiciando a formação de ANG-(1-7), o que corrobora a hipótese de que a ANG-(1-7) medeia as respostas à PRIV.

Apesar de a ANG-(1-7) demonstrar efeitos antagônicos à ANG-II em diversos sistemas, evidências apontam que em alguns núcleos elas apresentam ações sinérgicas, ou seja, quando utilizadas isoladamente alcançam um determinado efeito, mas quando utilizadas em conjunto alcançam um efeito mais potente do que a soma dos seus efeitos isolados. Esta ação sinérgica foi demonstrada no NTS onde a injeção de renina causa efeito hipertensor, que pode ser atenuado por administração concomitante de bloqueadores de ACE, AT1 ou MAS, e abolido apenas pelo uso concomitante de antagonistas de MAS e AT1 (CHENG et al., 2012). Apesar de ter sido demonstrado diretamente apenas no NTS, existe a possibilidade de que o

sinergismo entre esses dois peptídeos ocorra em outros núcleos, neste contexto é possível que ANG-II e ANG-(1-7) atuem sinergicamente para induzir a sede, enquanto a ANG-(1-7) reduz o apetite por sódio, balanceando a ação da ANG-II, de forma que durante a privação hídrica prevaleça a ingestão apenas de água. Em um segundo momento, a diminuição da osmolaridade deve levar a expressão de MAS aos níveis basais, nos quais a ANG-(1-7) não influencia o comportamento ingestivo de água e sódio, de forma que a ANG-(1-7) deixa de atuar centralmente e a inibição da mesma sobre a ingestão de sódio é retirada, demonstrando o aumento de apetite por sódio encontrado após a privação hídrica.

Alternativamente, a estimulação destes OCVs pode ser causada diretamente pelo aumento do sódio plasmático ao invés de atuação da ANG-(1-7) sistêmica. O sódio pode agir sobre os sensores de sódio presentes no SFO e OVLT ou através do vazamento osmótico de água desses neurônios induzindo a ativação de mecanorreceptores, levando a ativação destes núcleos (NODA; SAKUTA, 2013), estes podem, por sua vez, levar à ativação de projeções liberadoras de ANG-II e, possivelmente, de ANG-(1-7).

Este estudo é o primeiro a avaliar se a ANG-(1-7) afeta os comportamentos de ingestão de água e sódio após privação hídrica. A dose utilizada foi de 3 nmol, menor que a dose máxima utilizada por outros estudos que não encontraram efeitos sobre a ingestão de água e sódio em condições basais, no entanto, alta em comparação com as doses de ANG-II que alteram estes comportamentos (0,01nm e 0,1nm, respectivamente) (COONEY; FITZSIMONS, 1993; MAHON et al., 1995), porém as respostas encontradas após privação hídrica levantam a possibilidade de que este peptídeo esteja envolvido nesta resposta, no entanto, para se testar essa hipótese torna-se necessário a utilização de doses mais próximas do níveis fisiológicos, para construção de uma curva dose-resposta dos efeitos da ANG-(1-7). Outro ponto importante a ser verificado é a participação da ANG-(1-7) endógena na resposta de privação hídrica, para tal poderiam ser utilizados antagonistas de ANG-(1-7) após a privação hídrica.

A presença de ACE2 (DOOBAY et al., 2007) e MAS (BECKER et al., 2007; FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012) em diversas regiões relacionadas ao controle hidroeletrolítico e cardiovascular é um forte indicador de que a ANG-(1-7) seja importante na modulação dessas respostas. A privação hídrica aumenta FOS no SFO, OVLT, AP e NTS (YOSHIMURA et al., 2013), no entanto, a dupla marcação de FOS e MAS através da técnica de imunistoquímica não foi possível nestes núcleos, uma vez que a concentração de anticorpos utilizados neste estudo, apesar de funcionar para todas as

outras regiões, incorreu em uma marcação muito forte nesses núcleos. Possivelmente, a rica vascularização incorre nestes resultados, uma vez que MAS também é expresso em vasos sanguíneos.

No entanto, a presença de MAS já foi demonstrada na AP (BECKER et al., 2007), o que sugere uma possível atuação da ANG-(1-7) periférica neste núcleo, uma vez que este é desprovido de barreira hemato-encefálica. O receptor MAS também está presente no SFO (FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012) e, possivelmente, no OVLT, sendo sensível à ANG-(1-7) periférica e iniciando a resposta central consequente do aumento da ANG-(1-7) plasmática após PRIV, qual é essa resposta, no entanto ainda não foi esclarecido pela literatura científica.

Tanto SFO quanto OVLT se projetam para diversos núcleos relacionado ao controle de respostas hidroeletrólíticas, dentre eles o MnPO (MCKINLEY et al., 2015), sendo este último, portanto, uma região chave para integração de respostas neuroendócrinas a diversos desafios osmóticos (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2013). Interessantemente, quando o animal privado de água é rerepresentado à mesma, os níveis de FOS da maioria destes núcleos diminui, no entanto, se mantém alto por mais tempo apenas no MnPO, destacando a importância deste núcleo neste contexto (JI et al., 2005). Em condições basais o MnPO não apresenta marcação para MAS no CTRL, no entanto em PRIV há aumento de MAS, FOS e de duplas marcações para FOS e MAS, indicando que a privação hídrica sensibiliza esta região para a atuação da ANG-(1-7). A expressão de MAS no SFO em condições basais é baixa (FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012), o aumento de ANG-II e ANG-(1-7) periféricos podem aumentar a expressão deste receptor, de forma que a ação da ANG-(1-7) seja potencializada após privação hídrica.

Do PVN e SON partem as projeções magnocelulares que liberam OT e AVP. Em condições de hipovolemia e hipernatremia (dentre outros), AVP e OT são liberadas pela neurohipófise e alcançam a circulação sistêmica. A AVP atua em receptores V2 renais induzindo a translocação de canais de aquaporina para a membrana apical, aumentando a reabsorção de água; enquanto OT atua no coração liberando ANP, e ambos atuam sinergicamente no rim fechando os canais epiteliais de reabsorção de Na⁺ e, consequentemente, induzindo sua excreção (MECAWI et al., 2015). Durante a privação hídrica, a osmolaridade está aumentada e o volume sanguíneo diminuído (DE LUCA et al., 2007), de forma que após PRIV os níveis de AVP e OT estão elevados no plasma, enquanto

apenas o gene para síntese de AVP, e não de OT, é aumentado no SON (GREENWOOD et al., 2015).

O MnPO envia projeções excitatórias para o PVN e SON (modulando a liberação de AVP e OT), não se sabe, no entanto, se a ANG-(1-7) central é capaz de alterar a liberação de AVP e OT após a privação hídrica. O MnPO apresenta ainda projeções inibitórias ao DRN e LPBN (MCKINLEY et al., 2015), regiões que inibem a ingestão de água e sódio (MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014; REIS, 2007), de forma que uma maior atividade do MnPO, inibindo a via inibitória, irá permitir a manifestação destes comportamentos. No entanto, a administração central de ANG-(1-7) teve efeito inibitório sobre a ingestão de sódio, logo, possivelmente este estimula uma diferente população neuronal no MnPO ou apresenta efeito concomitante excitatório sobre o MNPO, LPBN e DRN, de forma que apesar de excitar o MnPO o efeito direto sobre o DRN e LPBN seja mais potente, e a soma dessas estimulações culmine com a inibição do apetite por sódio.

Tanto o PVN quanto o SON são ativados após PRIV, como demonstrado pelo aumento de FOS nestas regiões, interessante as duplas-marcações só foram significativamente mais altas no SON, o que sugere uma atuação direta da ANG-(1-7) apenas nesta região. Possivelmente esta ativação do PVN se dê pelas aferências excitatórias que este recebe do SFO, MnPO e OVLT, no entanto, a ubíqua presença de MAS nesta região indica que o eixo ANG-(1-7) / MAS possivelmente é importante em algum outro desafio.

Adicionalmente, no SON e MnPO houve aumento significativo de MAS após privação hídrica, o que, em conjunto com os resultados de ingestão, sustenta a hipótese de que a ação da ANG-(1-7) é menos pronunciada em condições basais, sendo mais importante após algum desafio sustentado à homeostase, ou seja, para que a ANG-(1-7) atue centralmente é necessário um aumento da expressão de MAS, de forma que esta será um modulador para um estímulo mais potente ou prolongado. Em outros contextos foi demonstrado que a atuação de ANG-(1-7) é mais pronunciada em desafios crônicos, como a hipertensão (FERRARIO et al., 2014).

O NO, que faz parte da via de atuação do receptor MAS (BADER et al., 2014), induz a diminuição da frequência de disparo de neurônios magnocelulares (RUGINSK et al., 2015). No entanto, a ANG-(1-7) aumenta a atividade neuronal em núcleos como PVN (HAN et al., 2012; SILVA; SANTOS; FONTES, 2005; SUN et al., 2012), RVLM (SANTOS et al., 2003b) e CVLM (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2002). Já foi proposto anteriormente, que o NO não esteja implicado nas ações da ANG-(1-7) sobre o receptor MAS

(ZHANG et al., 2012), o que vai diretamente contra o que foi encontrado por outros estudos (SAMPAIO et al., 2007; WHITAKER; MOLINA, 2013). Essas divergências da literatura dificultam a interpretação dos resultados obtidos, de forma que essas questões precisam ser detidamente avaliadas por estudos futuros. De forma a se elucidar os mecanismos através dos quais a ANG-(1-7) atua centralmente.

Nossos resultados são coerentes com uma maior estimulação dos neurônios do PVN e SON, no entanto, a liberação de NO como mediador da atuação da ANG-(1-7) sobre o receptor MAS neste contexto é pouco provável, tendo em vista que caso o NO fosse liberado este iria diminuir a frequência de disparo destes neurônios (RUGINSK et al., 2015). Para se elucidar essa questão diversas abordagens podem ser utilizadas. Pode-se avaliar a via intracelular ativada nestes núcleos após administração ICV de ANG-(1-7); a resposta eletrofisiológica dos neurônios magnocelulares; ou a resposta secretória de AVP para o plasma, resultante da maior ativação do PVN e SON.

A dupla marcação de FOS-MAS no SON, indutor da liberação de AVP, e do MnPO, que por suas projeções excitatórias ao PVN e SON, induz a liberação de AVP quando ativado, nos permitem levantar a hipótese de que a ANG-(1-7) faz parte da sinalização indutora do aumento da AVP e OT após privação hídrica (Fig. 12). Os estudos prévios que avaliaram a liberação de AVP por ANG-(1-7) foram feitos em condições basais (MAHON et al., 1995) ou em preparações *in vitro* (SCHIAVONE et al., 1988), de forma que esta hipótese neuroendócrina necessita ser investigada em estudos futuros.

Após a recuperação da osmolaridade os animais passam a ingerir salina hipertônica, ou seja, a atuação da ANG-(1-7) impedindo o apetite por sódio deve ser diminuída de maneira a permitir a ingestão de sódio. Já foi demonstrado que a ANG-(1-7) é capaz de induzir a endocitose do receptor MAS (GIRONACCI et al., 2011), logo, a própria ANG-(1-7) pode atuar para a dessensibilização e internalização de MAS, em um mecanismo de retroalimentação negativo que finaliza a sua ação após a recuperação da homeostase.

Apesar de não terem sido verificados diretamente neste estudo, os núcleos LPBN e DRN projetam neurônios serotoninérgicos envolvidos com uma extensa miríade de respostas, dentre as quais destacamos a modulação das respostas de ingestão de água e sódio, tonicamente inibindo o apetite por sódio (MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014; REIS, 2007), neste estudo a ANG-(1-7) ICV também foi capaz de inibir o apetite por sódio, indicando uma possível sinalização da ANG-(1-7) nestes núcleos. A relação entre a ANG-(1-

7) e o circuito serotoninérgico responsável pelo controle dos apetites por água e sódio ainda não foi investigada.

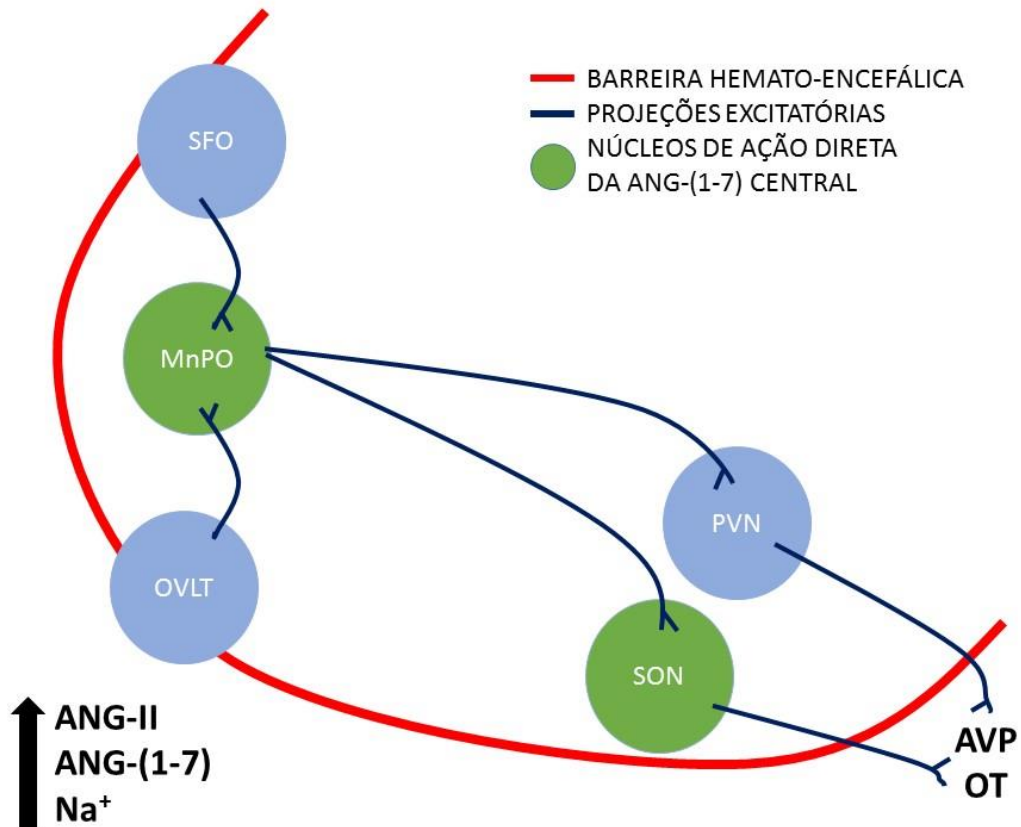


Figura 13. O aumento da concentração plasmática de ANG-II e ANG-(1-7) influencia a atividade do órgão vascular da lamina terminal (OVLT) e subfornicial (SFO), induzindo aumento da ANG-(1-7) central; esta atua diretamente nos núcleos pré-óptico mediano (MnPO) e supraóptico (SON) modulando a liberação de AVP, e indiretamente no núcleo paraventricular (PVN).

Outros desafios osmóticos podem afetar diferentemente este sistema, uma possível abordagem experimental seria aferir se a ANG-(1-7) ICV é capaz de alcançar efeitos em uma situação de osmolaridade diminuída e hipovolemia (após uso de diuréticos, por exemplo) ou de osmolaridade diminuída concomitante a hipervolemia (expansão hídrica, por exemplo), de forma a se avaliar se o sódio, o volume sanguíneo, ou ambos são responsáveis pelas alterações comportamentais encontradas. Tendo em vista que o efeito encontrado neste estudo foi de aumento da ingestão de água e diminuição da ingestão de salina hipertônica, o aumento da osmolaridade é um forte candidato para iniciar essa sinalização, ou seja, um aumento da

concentração plasmática de sódio aumenta a ANG-(1-7) central, e caso persista por um período mais longo, aumenta a expressão de MAS, permitindo a ação central da ANG-(1-7).

Em suma, possivelmente o aumento de ANG-II e ANG-(1-7) no plasma, causado pela privação hídrica, atuam sobre o SFO e OVLT, em conjunto com a estimulação dependente direta do aumento de Na⁺, aumentando a atividade do RAS cerebral. Este aumento sensibiliza os núcleos desta circuitaria à ação da ANG-(1-7), que neste contexto tem ação sinérgica à ANG-II quanto ao comportamento de ingestão de água, aumentando-o, porém antagônica quanto ao apetite por sódio, inibindo-o. Neste sentido, o MnPO e SON são possíveis locais para atuação da ANG-(1-7), já que nestes a expressão de MAS, bem como a dupla marcação FOS-MAS, são aumentadas após privação hídrica, indicando que os neurônios ativados após privação hídrica apresentam o aumento de MAS, sendo portanto, possíveis locais de atuação da ANG-(1-7). Enquanto a ANG-(1-7) pode atuar diretamente nos núcleos do sistema serotoninérgico, DRN e LPBN, aumentando sua ativação e agudamente levando a uma diminuição do apetite por sódio.

6.1 Perspectivas

- Curva dose-resposta para determinação do efeito de diversas doses de ANG-(1-7) ICV sobre parâmetros hidroeletrólíticos após privação hídrica;
- Dosagem de AVP e OT plasmática após microinjeção ICV de ANG-(1-7), em condições basais e após privação hídrica;
- Dupla marcação de FOS-MAS em núcleos não abordados neste estudo, porém relacionados aos comportamentos de sede e apetite por sódio (DRN, LPBN, RVLM, CVLM);
- Quantificação da expressão de MAS em núcleos envolvidos com a resposta hidroeletrólítica, a saber, SFO, OVLT, MnPO, PVN, SON, DRN, LPBN, RVLM, CVLM.

ENGLISH VERSION

1 INTRODUCTION

1.1 Body Fluid Homeostasis

The regulation of body fluid volume and osmolarity is conditional for the maintenance of life and is submitted to strict homeostatic control, so that the intra- and extra-cellular compartments maintain the volume of liquid and ionic concentration in a narrow range of variation. Thus small alterations in these variables are corrected by proper renal and behavioral responses (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; MECAWI et al., 2015).

The content of water and electrolytes in the interior milieu is maintained through the balance between its ingestion and excretion, primarily urinary. So that when water loss occurs, like after exercise or water deprivation, the osmolarity rises and is compensated by thirst and, consequently, water ingestion, in addition to the secretion of vasopressin (AVP) that acts on the kidneys causing water reabsorption, in order to decrease osmolarity and reestablish homeostasis (BOURQUE, 2008). After osmolarity decreases, sodium appetite is developed to compensate a possible hyposmolarity caused by water intake (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010).

If water loss progresses and water intake is not sufficient to compensate the loss, the extracellular fluid volume progressively decreases, then, consequently, increasing the concentration of ions. In turn, this increase induces the diffusion of water from the intra- to the extracellular medium, so that water deprivation induces dehydration of both fluid compartments (DE LUCA et al., 2007).

A complex neural network modulates these responses (Fig. 1). The concentration of sodium/plasmatic osmolarity is perceived by specialized cells present in regions lacking blood-brain barrier (circumventricular organs, OCVs), especially in the anterior wall of the third ventricle, such as subfornical organ (SFO) and *organum vasculosum* of the *lamina terminalis* (OVLT) (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2013). Neurons present on the SFO and OVLT possess NaX, a sodium channel, so that the increase in plasmatic sodium is perceived by these neurons initiating the inhibition of sodium appetite, conversely, the decrease of Na⁺ decreases this inhibition, inducing sodium appetite. Concomitantly to sodium increases

osmotic leakage of water occurs through aquaporin channels, dehydrating these cells, that activates neurons that culminate with water intake and AVP secretion in response to increased osmolarity (NODA; SAKUTA, 2013).

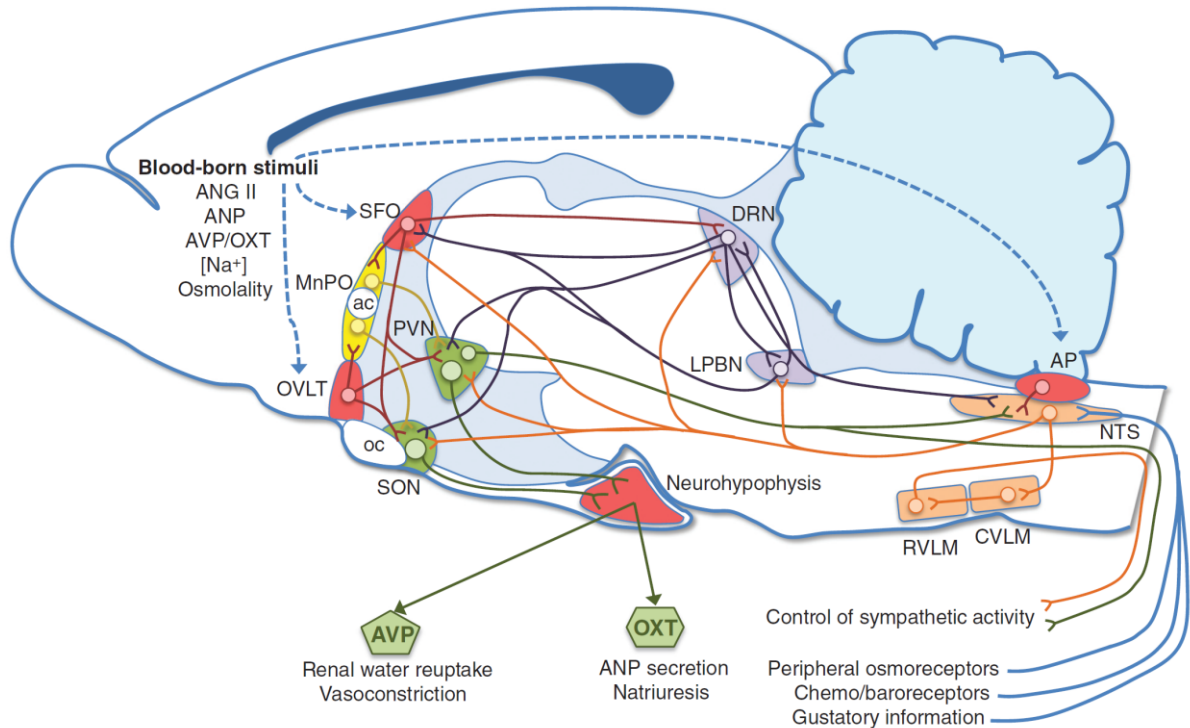


Figure 1: Schematic representation of the neural network involved in hydroelectrolytic balance (MECAWI et al., 2015). Sodium and plasmatic hormones reach the subfornical nucleus (SFO), *organum vasculosum of the lamina terminalis* (OVLT) and *area postrema* (AP), regions lacking blood-brain barrier. Whilst afferent information from quimo-, baro- and osmoreceptors reach the nucleus of the solitary tract (NTS). These regions connect to the serotonergic system (Dorsal rafe nucleus, DRN; and lateral parabrachial nucleus, LPBN) and regions involved in blood pressure (rostromedial medulla, RVLM; caudal ventrolateral medulla, CVLM) and neuroendocrine (Paraventricular hypothalamic nucleus, PVN; supra-optic nucleus, SON; and neurohypophysis) control. Incurring in adequate responses to alterations in blood volume/osmolarity.

The OVLT (BISLEY et al., 1996) and SFO (HIYAMA et al., 2002) possess cells sensible to alterations on omolarity/sodium concentration in the plasma or cerebral spinal fluid. These regions directly connect to median pre-optic nucleus (MnPO), paraventricular nucleus (PVN) and supra-optic nucleus (SON) of the hypothalamus (WEISS; HATTON, 1990a), mesencephalic rafe nuclei (LIND, 1986) and *Locus Coeruleus* (SLY et al., 1999).

The MnPO is protected by blood-brain barrier, however, it is reciprocally connected to the SFO and OVLT, with which it composes the anterior wall of the third ventricle,

intrinsically implicated in the control of thirst and sodium appetite (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2013). Additionally, the MnPO receives afferent projections from, amongst others, the SON, the nucleus of the solitary tract (NTS), rostral ventrolateral medulla (RVLM), lateral parabrachial nucleus (LPBN) and dorsal raphe nucleus (DRN), and sends projections to SON and PVN (both parvo- and magnocellular) (MCKINLEY et al., 2015).

The magnocellular projections to the neurohypophyseal system, responsible for the secretion of vasopressin (AVP) and oxytocin (OT), are located in the PVN and SON (ARMSTRONG, 1995). Additionally, the PVN communicates with several nuclei, among which are the DRN, LC, LPBN, ambiguous nucleus (NA), medial NTS, *area postrema* (AP) and dorsal motor of the *vagus* (DMX) (GEERLING et al., 2010). So that the PVN is essential for autonomic, behavioral and endocrine responses.

Furthermore, limbic integrative regions such as amygdala and bed nucleus of the *stria terminalis* (BNST) are implicated in the control of hydromineral balance, sending projections to LPBN and NTS (ANDRADE-FRANZE et al., 2010) whilst receiving serotonergic projections from the LPBN and angiotensinergic projections from the SFO (JOHNSON; THUNHORST, 1997). Lesions in these regions increase the consumption of hypertonic saline after sodium depletion, interestingly, water intake was not altered, indicating that these nuclei are related only with sodium appetite (ZARDETTO-SMITH; BELTZ; JOHNSON, 1994). The ventro-lateral BNST is implicated in the responses to osmotic stimuli (GEERLING et al., 2010).

The LPBN receives information from NTS and AP, acting as a point of integration between these areas and anterior regions – MnPO, PVN, amygdala – as such, an important relay between afferent signals related to blood pressure and volume. With an inhibitory activity on thirst and sodium appetite. O LPBN receives inhibitory projections from several nuclei, withdrawing its inhibition and culminating with the ingestive behavior. (MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014).

The DRN is a mesencephalic nucleus central to the serotonergic system, it communicates with the SFO, OVLT, MnPO, PVN, LPBN and SON, being directly implicated in several autonomic and endocrine functions, lesions in this nuclei increase thirst and sodium appetite, both in basal conditions and after physiological challenges (REIS, 2007). The acute pharmacologic blockade of this nucleus causes increased sodium appetite in basal conditions (FONSECA et al., 2009). Therefore, serotonergic neurons from the DRN tonically inhibit

sodium appetite; certain stimuli are capable of inhibiting this tonic activity, thus allowing the appearance of this behavior.

Additionally, high pressure receptors, located on the systemic and renal circulation, carry the information of alterations of plasma volume through ascending projections to the hindbrains (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). While structures like the NTS (that receives visceral and blood volume/pressure information) and AP (an OCV) also send noradrenergic (WEISS; HATTON, 1990b) or serotonergic, through LPBN (CIRIELLO; LAWRENCE; PITTMAN, 1984), projections to the PVN and SON.

An osmotic stimulus, such as water deprivation, causes hypernatremia, hypovolemia and activates the renin-angiotensin system (RAS). The RAS and osmoreceptors carry this information to the central nervous system, as a result several of these nuclei activate causing thirst and, posteriorly, sodium appetite (DE LUCA JR. et al., 2010).

24 hours of water deprivation increased the expression of FOS – a nuclear protein expressed when the neuron is activated – in the SON, MnPO and OVLT (DE LUCA JR. et al., 2002; JI et al., 2005; SLY; MCKINLEY; OLDFIELD, 2001). However, when the animal is allowed to drink FOS decreases only in the SON and continues high in OVLT and MnPO (JI et al., 2005). Additionally, 48 hours of water deprivation is capable of increasing FOS in the RVLM, NTS and AP, without alterations on the caudal ventro-lateral nucleus (CVLM) and parabrachial (PBN) nuclei; when water was reintroduced FOS increases were similar in AP and RVLM, greater in the NTS, and expressive on the PBN, whilst CVLM was unchanged (JI et al., 2007). So, these nuclei are activated in the induction of thirst and increased sympathetic activity, when water intake occurs, most of these decrease its activation, while OVLT and MnPO maintain its activity.

During water deprivation the increased sympathetic activity and vasopressin secretion maintain blood pressure in normal values (DE LUCA JR. et al., 2010). Aside from its neuroendocrine function, the PVN sends projections to the RVLM and spinal cord contributing to the pre-autonomic activation of cardiovascular mechanisms. The pharmacological blockade of the PVN decreases blood pressure, and this effect is more pronounced in water deprived animals (FREEMAN; BROOKS, 2007).

A similar study found indirect evidence of increased activity in these regions (OVLT, MnPO, SFO, SON, PVN, AP, NTS, RVLM) after 24 and 48 hours of water deprivation, that returned to basal values after 48 hours of water reintroduction (YOSHIMURA et al., 2013).

The control of fluid intake is modulated by several systems, amongst which we highlight the RAS, that culminates with the production of angiotensin II, its most notorious mediator, whose thirst-inducing potential has been demonstrated decades ago (EPSTEIN; FITZSIMONS; ROLLS, 1970; FITZSIMONS; SIMONS, 1969).

1.2 Renin-Angiotensin System

1.2.1 ACE / ANG-II / AT1

Angiotensinogen is liberated by the liver into the circulation and cleaved by renin, an enzyme secreted by the juxtaglomerular apparatus (JGA) into the circulation, and then transformed into angiotensin (ANG) I, that in turn becomes ANG-II by the action of the angiotensin converting enzyme (ACE) (Fig. 2) (HALL, 2003). The JGA is composed of the *macula densa* and juxtaglomerular and mesangial cells, and induces the production of renin in response to systemic (low blood pressure, low concentrations of Na⁺ and Cl⁻ or β -adrenergic stimulation) or local (nitrous oxide, NO; prostaglandins) factors as reviewed by Mecawi et al. (2015). The secretion of renin is the limiting factor in the activation of the peripheral RAS (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004). The classic effects of the RAS are obtained by ANG-II acting on the type 1 angiotensin receptor (AT1) (STEGBAUER; COFFMAN, 2011). The RAS is one of the most important modulators of the responses of blood volume and pressure regulation.

ANG-II acts on the control of cardiovascular, renal and behavioral functions (MECAWI et al., 2015) demonstrating vasoconstriction, increased cellular proliferation and cardiac hypertrophy (SANTOS; FERREIRA; SIMOES, 2008), aside from the dipsogenic behavior (EPSTEIN; FITZSIMONS; ROLLS, 1970; FITZSIMONS; SIMONS, 1969).

The RAS is implicated in the pathogenesis of most hypertension cases, so that drugs that antagonize its actions, such as ACE inhibitors and AT1 blockers, are broadly used in medical clinics (MOON, 2013). These drugs are efficient in decreasing blood pressure, however, are not more efficient than drugs that act on other systems implicated in the development of these diseases, contrary to the expected (BLOOD PRESSURE LOWERING TREATMENT TRIALISTS et al., 2008). This is possibly due to these drugs acting on the plasmatic RAS, not being capable of effectively acting on the several local RAS (FERRARIO et al., 2014). Aside from the peripheral RAS, the complete pathway to the generation of angiotensins is present in several tissues, so that its production may differ in each studied

tissue. Since the components of the RAS do not cross the blood-brain barrier, but act on the circumventricular organs increasing the central RAS, this becomes an important focus of study (PAUL; POYAN MEHR; KREUTZ, 2006).

The OVLT and SFO sense the plasmatic levels of ANG-II, leading to the activation of the central RAS when peripheral RAS is increased (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2013). Lind *et al.* (1984) demonstrated that ANG-II is present in the SFO, and that its expression is not altered after 72 hours of WD or nephrectomy that, respectively, increase or decrease peripheral ANG-II, and supposed that the SFO responds to systemic levels of ANG-II, and central afferent angiotensinergic projections modulating thirst. Posteriorly, demonstrated that the SFO possess bidirectional connections with the mesencephalic rafe, receiving serotonergic projections and sending angiotensinergic projections (LIND, 1986).

The induction of thirst by ANG-II has been known for decades, intravenous (FITZSIMONS; SIMONS, 1969) or central (EPSTEIN; FITZSIMONS; ROLLS, 1970) administration of ANG-II is capable of inducing dipsogenic behavior. ANG-II acts through AT1 receptors causing, in general terms, thirst and increased blood pressure. Decreased activity, due to lesion or pharmacological blockade, of the SFO, OVLT, and MnPO, prevent the dipsogenic response of peripheral or central ANG-II administration. The cellular dehydration, caused by water deprivation, furosemide or bleeding increases AT1 expression and water intake (COBLE et al., 2015).

Interestingly, water deprivation is capable of increasing ACE with no changes in AT1 expression in several nuclei of this system (BOURASSA; SPETH, 2010), suggesting that in this situation other components of the RAS may be involved with this response.

1.2.2 ACE2 / ANG-(1-7) / MAS

Several downstream mediators of the RAS were discovered, amongst which ANG-(1-7) and type two angiotensin receptor (AT2), that functionally antagonize the classical RAS in several situations (CHAPPELL et al., 2014; FERRARIO et al., 2014). There are evidence, however, that ANG-(1-7) centrally may show similar activity to ANG-II (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2002; CHENG et al., 2012; HAN et al., 2012; SANTOS et al., 2003a; SILVA; SANTOS; FONTES, 2005; SUN et al., 2012).

Angiotensin-(1-7) was considered an inactive metabolite of ANG-II, however the demonstration of effects on the secretion of AVP in hypothalamus-pituitary preparations (SCHIAVONE et al., 1988) stimulated a series of studies on this peptide. The following studies demonstrated the opposition of ANG-II and ANG-(1-7) in several responses (FERRARIO et al., 1991, 1997). Contrary to previous observations, in the *in vivo* animal, injection of ANG-(1-7) did not change plasmatic vasopressin (MAHON et al., 1995).

Posteriorly, the enzyme that produces ANG-(1-7) (DONOGHUE et al., 2000; TIPNIS et al., 2000) and the receptor in which it acts (SANTOS et al., 2003a, 2003b), respectively, type 2 angiotensin converting enzyme (ACE2) and MAS receptor were discovered. The opposition between the ACE / ANG-II / AT1 and ACE2 / ANG-(1-7) / MAS axes has been described in the heart (FERRARIO, 2006; FERREIRA; SANTOS, 2005), kidney (DILAURO; BURNS, 2009; PINHEIRO; SIMOES, 2012) and brain (XU; SRIRAMULA; LAZARTIGUES, 2011). Additionally, ACE hydrolysis ANG-(1-7) to ANG-(1-5) a metabolite with no described physiological activity (DEDDISH et al., 1998).

ACE2 may transform ANG-I in ANG-(1-9) (DONOGHUE et al., 2000), which is posteriorly converted to ANG-(1-7) through ACE or endopeptidases (RICE et al., 2004). Its main function, however, is the conversion of ANG-II directly in ANG-(1-7), that occurs with affinity 400 fold higher than the conversion of ANG-I (VICKERS et al., 2002). Therefore, ACE2 is a key enzyme for the production of ANG-(1-7). The pathway of synthesis is summarized in Figure 2.

Several studies demonstrated that ANG-(1-7) specifically binds to MAS receptor (GIRONACCI et al., 2011; JANKOWSKI V et al., 2011; PINHEIRO SV et al., 2004; SANTOS et al., 2003a; SAVERGNINI et al., 2010). Which in turn acts through two mechanisms: 1- stimulates the pathway of triphosphate inositol kinase (PI3K) / AKT increasing the activity of nitrous oxide synthase (NOs), an enzyme that produces NO; and 2- through stimulation of the phospholipase A2 (BADER et al., 2014). There is no evidence that ANG-(1-7) is involved in other intracellular MAS-activated pathways (calcium influx and accumulation of 1,4,5-triphosphate, for example), which implies that these may be constitutive actions of this receptor (ZHANG et al., 2012). This study, however, used a MAS agonist instead of ANG-(1-7) *per se*, which may indicate that this receptor shows different action for different ligands (BADER et al., 2014). There are two antagonists of the MAS receptor: A779, also known as D-Ala⁷-Ang-(1-7), and D-Pro⁷-Ang-(1-7).

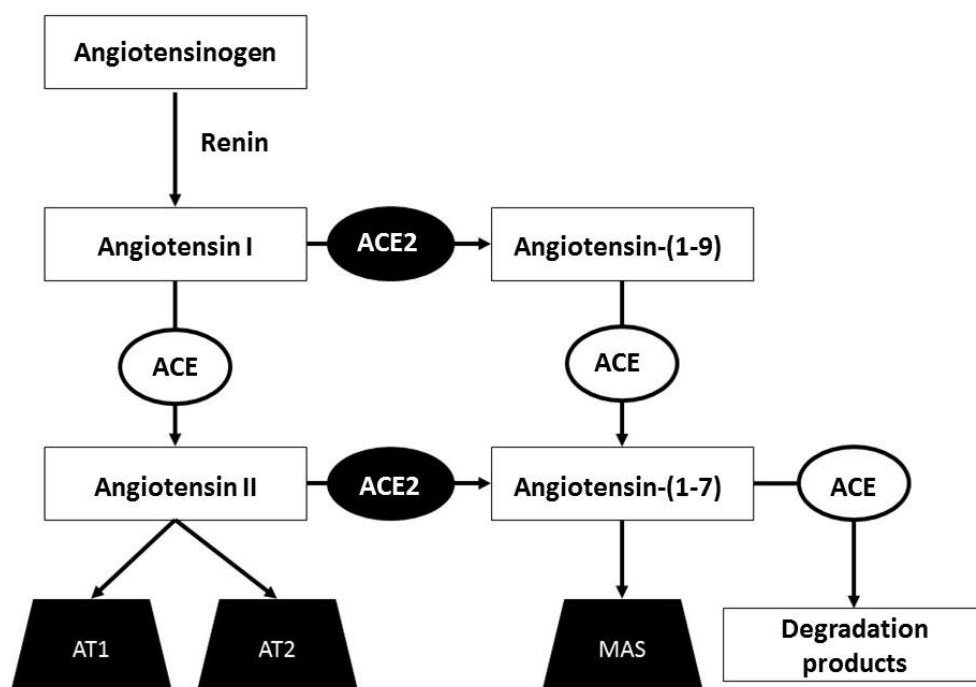


Figure 2: Simplified scheme of the main pathways of ANG-(1-7) formation. ANG-(1-7) is synthesized directly from ANG-II or indirectly through ANG-I and acts, primarily on the MAS receptor. ACE (angiotensin converting enzyme); AT1, AT2 (angiotensin receptors type 1 and 2). Adapted from Santos *et. al* (2008).

ANG-(1-7) increases the expression of the entire PI3K / AKT / NOs pathway and this effect may be blocked by A779, which implies that these actions are dependent on MAS activation (SAMPALIO *et al.*, 2007). Intra-cerebroventricular (ICV) injection of ANG-(1-7) induces increases in NO concentration on the PVN, and this effect is blocked by A779 (WHITAKER; MOLINA, 2013). Additionally, ANG-(1-7) decreases noradrenalin hypothalamic secretion, this effect is blocked not only by MAS antagonism, but also by AT2 and NOs antagonism, so that these are possibly mediators of this response (GIRONACCI *et al.*, 2000).

Additionally, ANG-(1-7) may act through MAS-related G protein coupled receptors (MRGPR), specially the D subtype (MRGPRD) (GEMBARDT *et al.*, 2008). The MRGPR are a family of orphan receptors, however, some ligands are considered as possible agonists of its actions. Of which the MRGPRD, that are present in neurons, where they cause excitation, and arteries where cause vasodilation are activated by ANG-(1-7) (SOLINSKI; GUDERMANN; BREIT, 2014).

Amidst the peripheral actions of ANG-(1-7) are: (I) in the heart, improved cardiac function, and decreased hypertrophy, arrhythmia and fibrosis; (II) in arteries, vasodilation and decreased angiogenesis, thrombosis and cell proliferation; (III) in the kidney, increased renal blood flow, natriuresis/diuresis; (IV) in the liver, local vasodilation and decreased fibrosis; and (V) in the brain baroreflex facilitation, modulation of the sympathetic tone and vasopressin secretion (SANTOS; FERREIRA; SIMOES, 2008).

Water deprivation is capable of increasing plasmatic ANG-(1-7) and ANG-II, with proportionally greater increase in ANG-(1-7) (BOTELHO et al., 1994). What is coherent with the results of other authors that demonstrated that water deprivation increases ACE, but not AT1 (BOURASSA; SPETH, 2010), in other words, ANG-II increases, in consequence of ACE increasing, possibly serving as substrate to ACE2, enabling the formation of ANG-(1-7) during water deprivation, indicating a possible participation of this peptide in this situation.

1.2.3 ANG-(1-7), MAS and the Central Nervous System

ACE2, a key enzyme in the production of ANG-(1-7), is present in several areas of the mouse brain and is expressed in neurons, not in glial cells, with more intensity in areas related to cardiovascular and hydroelectrolytic control, such as OVLT, SFO, PVN, AP, DMX, NTS, RVLM and NA (DOOBAY et al., 2007). Neurons immunoreactive to ANG-(1-7) were identified in the PVN (especially in the magnocellular portions), the SON and BNST (BLOCK et al., 1988). Becker *et al.* (2007) assessed, through immunofluorescence, the presence of MAS receptor in some regions of the rat brain, and found labeling in the CVLM, RVLM, NTS, inferior olive, PVN, amygdala and pre-optic area (related to hydroelectrolytic and cardiac responses) and in unrelated areas such as the hippocampus and cortex. In other study MAS has also been found in the cortex, hippocampus, amygdala, and basal ganglia, being expressed primarily in neurons and blood vessels (FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012), so that its ubiquitous expression suggests this axis is possibly involved in a myriad of physiological responses.

In normal conditions the rat shows similar levels of ANG-I, ANG-II and ANG-(1-7) in the hypothalamus, medulla and amygdala (CHAPPEL, 1989). ACE2 (DOOBAY et al., 2007), ANG-(1-7) (BLOCK et al., 1988) and MAS (BECKER et al., 2007) are present in several nuclei of the circuitry related to hydroelectrolytic balance, so that this peptide is possibly implicated in the neuroendocrine, behavioral and sympathetic responses to osmotic

challenges. However, surprisingly few studies have assessed the relationship between this axis and bodily fluid control.

These demonstrated that water and hypertonic saline intake is not altered after ANG-(1-7) microinjection in the diencephalon (FITZSIMONS, 1971); ICV in basal conditions (COONEY; FITZSIMONS, 1993; MAHON et al., 1995; SWANSON et al., 1973) or concomitant to ANG-II microinjection (COONEY; FITZSIMONS, 1993; SWANSON et al., 1973). Additionally, ICV ANG-(1-7) did not alter plasmatic AVP concentration or increased the expression of FOS on the SFO, SON and PVN; nonetheless, increased FOS in the MnPO and OVLT, with an increase smaller than the one achieved by ANG-II (MAHON et al., 1995). Conversely, Schiavone et al. (1988) demonstrated that ANG-(1-7) is equipotent to ANG-II in inducing AVP secretion in a hypothalamus-pituitary preparation and that an AT1 antagonist is also capable of inducing AVP secretion, although smaller than that of ANG-II and ANG-(1-7). Which means that increased ANG-II caused by the antagonist might have increased ANG-(1-7) and, in turn, increased vasopressin secretion.

Despite these conflicting results, ANG-(1-7) action is mediated by the increase in NO (BADER et al., 2014; SAMPAIO et al., 2007), which centrally decreases the firing frequency of magnocellular neurons of the SON and PVN, decreasing the secretion of AVP and OT (RUGINSK et al., 2015). ICV administration of L-NAME (a NOs blocker) increases the secretion of AVP, OT and atrial natriuretic peptide, meanwhile a NO precursor incur in the opposite effects, being capable of even blocking ANG-II (REIS et al., 2007). Possibly, the nitrenergic inhibition of AVP is mediated by ANG-(1-7) (WHITAKER; MOLINA, 2013). Therefore, ANG-(1-7) may increase (SCHIAVONE et al., 1988) or not alter (MAHON et al., 1995) AVP secretion, however, indirect information suggests it may be able to inhibit AVP secretion under certain stimuli.

Regardless of few studies having assessed the relationship between ACE2 / MAS / ANG-(1-7) axis and its relationship with hydroelectrolytic balance, several studies assessed its relationship to hemodynamic and cardiovascular responses.

When injected ICV, ANG-(1-7) does not influence blood pressure in normal animals, however, in transgenic animals with increased renin or after hemorrhage, decreases blood pressure (DOBRUCH et al., 2003). ANG-(1-7) possibly mediates the barorreflex caused by treatment with enalapril (an ACE antagonist) in spontaneous hypertensive rats, since the ICV administration of A779 blocks these effects (BRITTO et al., 1997), similarly to the study of Benter *et al.* (2011) where A779 administration reversed the cardiovascular protection caused

by ACE blockade. In this sense, Gilliam-Davis *et al.* (2011) demonstrated that chronic AT1 blockade increases the expression of mRNA for ACE2, neprilisin and MAS in the dorsomedial medulla of aged animals, suggesting the influence of ANG-(1-7) in this situation. Acute (FENG *et al.*, 2008) or chronic (FENG *et al.*, 2010) ICV microinjection of ANG-II causes hypertensive responses and increases water intake, however, in transgenic animals with increased ACE2, this response was attenuated. In the chronic treatment, administration of A779 abolishes these effects, this suggests that ANG-(1-7) is responsible for these responses (FENG *et al.*, 2010). Whilst acutely the administration of A779 did not alter this response, what suggests that these effects are mediated by the decrease of ANG-II that occurs by its conversion to ANG-(1-7) (FENG *et al.*, 2008).

Nonetheless, the actions of ANG-(1-7) in the brain differ in the region of administration. Presenting effects similar to ANG-II in some nuclei, for example, in the PVN administration of either ANG-(1-7) or ANG-II increase the activity of the renal sympathetic nerve, with no changes in blood pressure (SILVA; SANTOS; FONTES, 2005). Other study found that increased blood pressure, after PVN administration of ANG-(1-7) of hypertensive animals, in addition to increased expression of MAS in the nucleus and increased sympathetic drive to the heart (HAN *et al.*, 2012).

Similar results demonstrated that ANG-(1-7) or ANG-II, delivered to the PVN increased sympathetic modulation in hypertensive renovascular rats, and that its antagonists reversed these effects in basal conditions, suggesting an endogenous participation of these peptides (SUN *et al.*, 2012). In this context, Silva *et al.* (2005) demonstrated that the blockade of MAS receptor by A779 in basal conditions is sufficient to decrease the activity of the renal sympathetic nerve, which implicates ANG-(1-7) in the tonic maintenance of this activity. Besides, both show hypertensive effects when injected into the RVLM (SANTOS *et al.*, 2003a) and hypotensive when injected in the CVLM (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2002).

Cheng *et al.* (2012) demonstrated that the injection of renin in the NTS causes a hypotensive response that is attenuated by the administration of Lisinopril (an ACE inhibitor), losartan (an AT1 inhibitor) and A779, thus, in this nucleus ANG-II and ANG-(1-7) possibly show synergic effects. Additionally, this study also demonstrated that both are mediated by the pathway of Gq-PI3k-Akt-NOs (CHENG *et al.*, 2012).

Hence, although peripherally the effects of ANG-(1-7) antagonize the effects of ANG-II, centrally the effects of ANG-(1-7) are controversial, demonstrating actions similar or

synergic to that of ANG-II in some situations. Additionally, few is known about the effects of ANG-(1-7) in response to challenges to body fluid homeostasis, in other words, if ANG-(1-7) affects the behavioral, autonomic and neuroendocrine that occur due to blood volume/osmolarity alterations.

2 JUSTIFICATION

The maintenance of the internal medium is conditional for life, so that hypovolemia and/or increases in osmolarity incur in several neuroendocrine and behavioral alterations in the regulation of these components, amongst which are thirst and sodium appetite, sensations that lead to the behaviors of, respectively, water and sodium intake (MECAWI et al., 2015). ANG-II is implicated in the control of these behaviors, however, the relationship between ANG-(1-7) and thirst and sodium appetite is not established. The presence of ACE2 (DOOBAY et al., 2007), ANG-(1-7) (BLOCK et al., 1988) and MAS (BECKER et al., 2007) in regions that control these response, as well as the increase of ANG-(1-7) after water deprivation (BOTELHO et al., 1994), however, suggest that participation of ANG-(1-7) in this context. Hence, studies that assess the actions of ANG-(1-7), especially related to hydroelectrolytic response are warranted, since this question has not been answered by scientific literature.

3 OBJECTIVES

3.1 General Objective

Assessing if ANG-(1-7) influences the neuroendocrine responses to water deprivation.

3.2 Specific Objectives

- I. The behavior of water and hypertonic saline (1,8% NaCl) intake caused by ANG-(1-7) injection on the lateral ventricle, in basal or water deprivation conditions.
- II. The expression of FOS and MAS, as much as its double labeling, after water deprivation in nuclei involved with hydroelectrolytic regulation, such as OVLT, SFO, AP, PVN, SON, etc.

4 MATERIAL AND METHODS

4.1 Animals

All procedures were approved by Federal Rural University of Rio de Janeiro ethics committee (protocol: 23083.011701/2013-20) and are in accordance with current legislation. Male Wistar rats obtained from either Animal housing facilities of the UFRRJ's department of physiological sciences (DCFis – IB – UFRRJ) or Ribeirão Preto College of Medicine (FMRP – USP) were used in this study. They were housed in collective boxes (each with 4 or 5 animals) in DCFis maintenance animal facility (IB – UFRRJ), with 12/12 hours light-dark cycle (lights on between 6 AM and 6PM), $22 \pm 2^\circ\text{C}$ temperature and *ad libitum* access to water and chow. In order to decrease inespecific stress, these were handled daily during the week prior to the experiments.

The animals were then separated in two groups:

- I) Control (CTRL): that kept rest conditions, or;
- II) Water deprivation (WD): that had fluids removed for 24 hours prior to the experiment.

After which they were submitted to one of the three experiments.

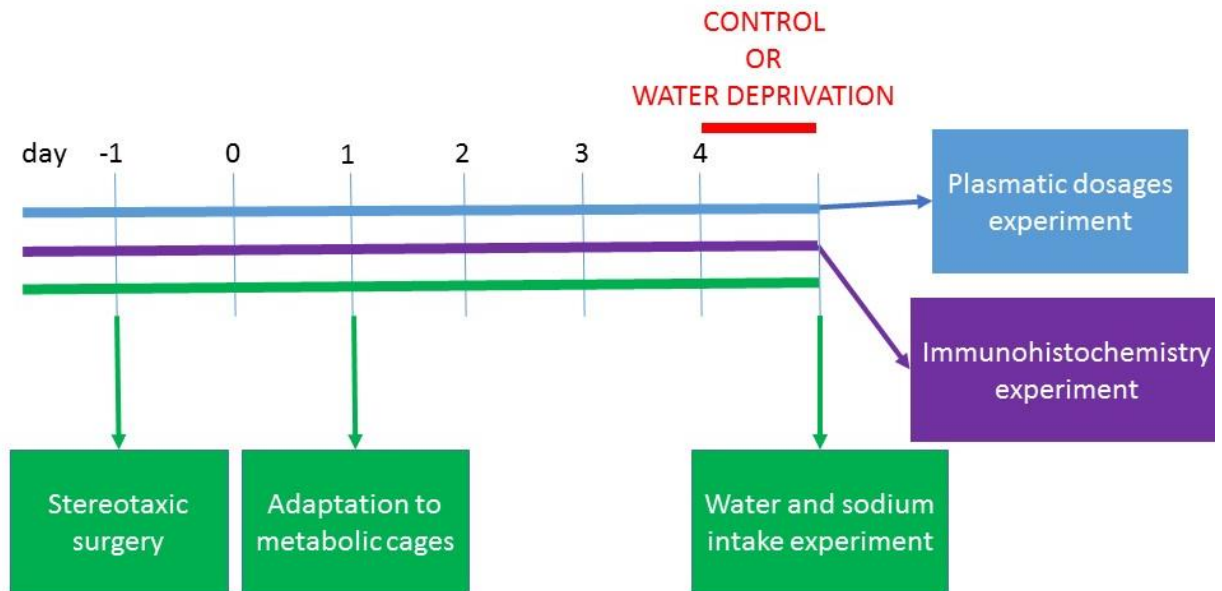


Figure 3. Timeline representative of the experiments performed. Details in text. Each color represents one of the 3 experiments: Blue – experiment 1; Green – experiment 2; Purple – experiment 3.

4.2 Experiment 1: Effects of Water Deprivation on Fluid Balance

This experiment was carried out to verify the dehydration caused by water deprivation. The animals were weighed and submitted to CTRL or WD protocols, after which they were weighed again and beheaded. The blood was collected by the trunk and stored in micro hematocrit tubes, aliquots with heparin (10µl/ml of blood) or peptidases inhibitors (PMSF 1 mM 10µl/ml of blood; EDTA 10% 50 µl/ml of blood; Pepstatin A 0.5 mM 10µl/ml of blood; Fenantrolina 30mM 50 µl/ml of blood).

The part stored in microhematocrit tubes was centrifuged (2000 RPM por 5 minutos) and the hematocrit assessed by the scale. The weights were used to calculate the variation of the weight after WD. For the determination of osmolarity 10 µl of plasma were used in an osmometer (OSMETTE II™, modelo 5005© Precision Systems Inc.)

4.3 Experiment 2: Effects of ICV Administration of ANG-(1-7) in water and hypertonic saline intake

Animals weighing $288,3 \pm 4,7$ g were used for stereotaxic procedure. These were anesthetized with ketamine and xylazine (75 and 25 mg / kg, respectively, intraperitoneal injection). When in anesthetic plane they were placed in a stereotaxic device for cannula implantation (inox steel, 12 mm, 0.6 mm of external diameter). The cannula was inserted in the left lateral ventricle, in the coordinates: antero-posterior = 0.5 mm posterior to bregma; latero-lateral = 1.4 mm; dorso-ventral = 3.6 mm from the skull, according to Paxinos & Watson (2005) atlas.

After surgery, ketoprofen (3mg/kg, subcutaneous) and veterinary pentabiotics (Fort Dodge Saúde Animal, 0,1ml/100g, intramuscular) were used. After two days of recovery, the animals were put in metabolic cages with water, chow and hypertonic saline (NaCl 1.8%) *ad libitum* for 5 days of adaptation. These cages possess graduated bottles as drinkers, which were filled with filtered water or hypertonic saline and used for the measurement of fluid intake.

After the adaptation period, the animals were submitted to CTRL or WD protocols. In the experiment they were briefly contained for microinjections of vehicle (0.9 % NaCl) or ANG-(1-7) in the concentration of 3nmol, both on the volume of 2 µl, for 30 to 60 seconds. For the administration of the drugs a 10 µl Hamilton syringe, connected to a polyethylen PE-10 tube and a gingival needle (3mm diameter and 0.6 mm longer than the cannula) were used. The CTRL and WD animals were submitted to saline 0.9% or 3 nmol / 2 µl of ANG-(1-7),

and water and sodium intake were reintroduced, and the animals allowed to drink, the intake measurement was done by the reading of the graduation of the bottles in the time of 30, 60, 120, 180, 240 and 300 minutes.

This experiment verified if ANG-(1-7) changes dipsogenic and natriorexigenic responses to WD.

4.4 Experiment 3: Effect of Water Deprivation on the Expression of FOS, MAS and FOS-MAS double labeling in Nuclei Related to Hydroelectrolytic Control

After the protocol the animals were anesthetized with lethal dose of thiopental (100 mg / kg, intraperitoneal) and submitted to transcardiac perfusion with, approximately, 150 ml of PBS (pH 7.2) followed with 500 ml of paraformaldehyde 4% diluted in phosphate buffer (PB) 0.1 M (pH 7.2) for the fixation of the brain. These were removed and post-fixed with the same paraformaldehyde solution for an hour, and stored in sucrose solution (30% in phosphate buffer) at 4°C, until the complete dehydration of the tissue. After which the brain was taken to a cryostat (Micron), sectioned in 30 µm slices and kept in triplicates at -20°C in anti-freezing solution (200 ml glycerol; 300 ml ethylene glycol; 500 ml of PBS, pH 7.2) until the procedures of immunohistochemistry. After labeling the slices were observed on the microscope and compared to the stereotaxic atlas (Paxinos, 2005), the slices which contained areas of interest were used in this study.

4.4.1. Immunohistochemistry

The immunohistochemistry was performed for the identification of FOS – a protein expressed in neurons activated after some stimulus – and the MAS receptor. For such, the slices were washed with PB 0,01M, after washing and blockade of endogenous peroxidases and nonspecific bindings, the slices were incubated with primary anti-FOS antibody (1:10000; Calbiochem - NovaBiochem, San Diego – CA, EUA) at 4°C for 16-20 hours. After which the slices were incubated with secondary anti-rabbit biotinilated anti-body (1:200, Vector Laboratories Inc, Burlingame – CA, EUA) and, after another cycle of washing, with the Avidin-Biotin-Peroxidase complex (ABC, Elite PK 6100, Vector Laboratories Inc, Burlingame – CA, EUA) for 60 minutes. After that diaminobenzidin (0,5 mg / mL, DAB; Sigma-Aldrich Co, St Louis – MO, EUA), cobalt chloride 5% and nickel sulfide 1% diluted in phosphate buffer 0,1 M (pH 7.2) along with hydrogen peroxide 30%, colored the nuclei of activated neurons that express FOS (dark-purple to black).

After another cycle of washing, the blockade of nonspecific bindings and the incubation with anti-MAS primary antibody (1:10000, 4 °C por 48 – 72 horas) were carried out. This antibody was produced as described elsewhere (BECKER et al., 2007; SAMPAIO et al., 2007) and kindly donated by Professor Robson Augusto Souza dos Santos – UFMG. After that, the slices were washed and incubated for 60 minutes with anti-mouse secondary antibody (1:200, Vector Laboratories Inc, Burlingame – CA, EUA) and, after another washing cycle, with Avidin-Biotin-Peroxidase complex (ABC, Elite PK 4000, Vector Laboratories Inc, Burlingame – CA, EUA) for 60 minutes. Then, after another washing cycle, diaminobenzidin (0,5 mg / mL, DAB; Sigma-Aldrich Co, St Louis – MO, EUA), diluted in phosphate buffer 0.1 M (pH 7.2) and 30% hydrogen peroxide was used to color the MAS-immunoreactive neurons (light brown).

The images were captured by a microscope (Zeiss), linked to a computer with Axiovision software. The photographs were used to: I) quantification of neurons immunoreactive to FOS protein; and II) neurons immunoreactive to MAS. Neurons that presented the nucleus visibly colored (dark-purple to black) were counted as FOS expressing, neurons with cytoplasm visibly colored light-brown were counted as MAS expressing and neurons with both marking were counted as double labeling. The count was performed by an evaluator blinded to the groups identification, and with individual patterns of color and delimitation in each slice. The determination of the nuclei was done with the coordinates described by Paxinos & Watson (2005).

4.5 Statistical Analysis

In the water and sodium intake analysis the two-way analysis of variance (Two-way ANOVA) was used, and Bonferroni post-hoc test. Meanwhile, for all other analysis Student T test was used. All differences were considered significant when $p < 0.05$. The analysis were carried out with Graphpad Prism, V6.0 software. All data is described as mean \pm mean standard error.

5 RESULTS

Hematocrit (38 ± 0.5 vs. 41.2 ± 0.7 %; $p=0.0042$) and plasmatic osmolarity (306.9 ± 2.9 vs. 323.1 ± 4 mOsm; $p=0.0032$) were significantly increased in the water-deprived animal (Figs. 4A and B). Body weight increased in CTRL and decreased in WD animals (1.8 ± 1.5 vs. -13.3 ± 0.8 ; $p < 0.0001$; Fig. 4C).

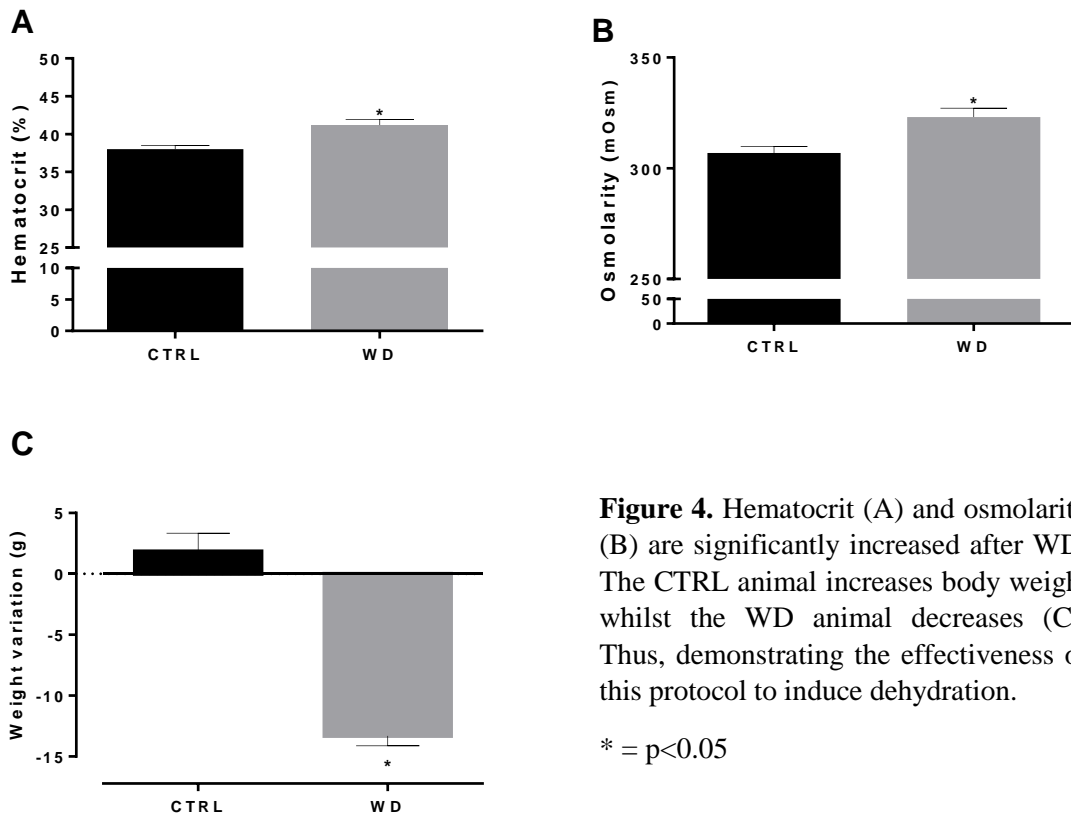


Figure 4. Hematocrit (A) and osmolarity (B) are significantly increased after WD. The CTRL animal increases body weight whilst the WD animal decreases (C). Thus, demonstrating the effectiveness of this protocol to induce dehydration.

* = $p < 0.05$

Regarding water intake (Figure 5A), ANG-(1-7) does not change intake in basal condition (at 300 minutes, CTRL-Vehicle = 6.1 ± 3 vs. CTRL-ANG-(1-7) = 17.8 ± 5.4 , $p > 0.05$). The PRIV-Vehicle animal ingest more water than CTRL-Vehicle after 240 minutes (CTRL-Vehicle = 5.9 ± 2.7 vs. PRIV-Vehicle = 25 ± 4.7) whilst the PRIV-ANG-(1-7) ingest more water than both controls at 120 minutes (CTRL-Vehicle = 5.1 ± 2.3 ; CTRL-ANG-(1-7) = 8.2 ± 3.1 ; PRIV-ANG-(1-7) = 29.1 ± 4.3). These differences remained until the end of the test (at 300 minutes, CTRL-Vehicle = 6.1 ± 3 ; CTRL-ANG-(1-7) = 17.8 ± 5.4 ; PRIV-Vehicle = 26.7 ± 5.1 ; PRIV-ANG-(1-7) = 42.2 ± 4.3).

Regarding hypertonic saline intake (Fig. 5B), ANG-(1-7) does not change water intake in basal conditions (at 300 minutes, CTRL-Vehicle = 1.6 ± 1.6 vs. CTRL-ANG-(1-7) = 0 ± 0). Water deprivation increases hypertonic saline intake at 120 minutes against CTRL-ANG-(1-7) (CTRL-ANG-(1-7) = 0 ± 0 vs. PRIV-Vehicle = 9 ± 2.4) and at 300 minutes against both controls (CTRL-Vehicle = 1.6 ± 1.6 ; CTRL-ANG-(1-7) = 0 ± 0 ; PRIV-Vehicle = 10.6 ± 2.9). The group PRIV-ANG-(1-7) did not differ from all other groups (at 300 minutes, CTRL-Vehicle = 1.6 ± 1.6 ; CTRL-ANG-(1-7) = 0 ± 0 ; PRIV-Vehicle = 10.6 ± 2.9 ; PRIV-ANG-(1-7) = 7.1 ± 2.4).

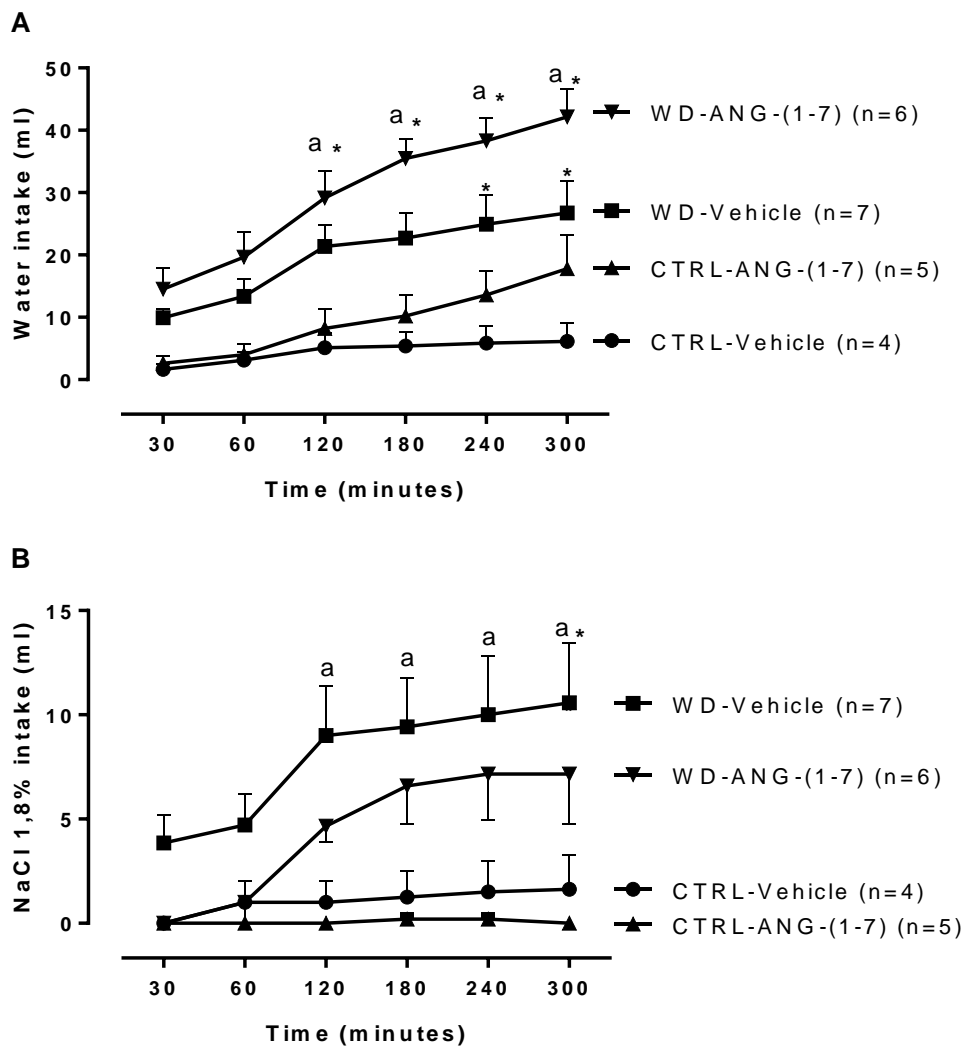


Figure 5. Effect of ICV microinjection of ANG-(1-7). ANG-(1-7) is capable of accelerating the water intake due to 24 hours of water deprivation (A) and blunting hypertonic saline intake (B). * = $p < 0.05$ vs. CTRL-Vehicle; a = $p < 0.05$ vs. CTRL-ANG-(1-7)

Regarding the image studies, in the MnPO (Fig. 6A) WD increases neurons labelled for FOS (5.8 ± 2 vs. 42 ± 8 ; $p = 0.0116$), MAS (11.7 ± 2.3 vs. 66.5 ± 9.5 ; $p = 0.0057$) or FOS-

MAS double labeling (2.2 ± 0.1 vs. 30.5 ± 1.5 ; $p = 0.0001$). In the SON (fig. 6B) WD increased FOS (4 ± 0.7 vs. 33.2 ± 1.1 ; $p < 0.0001$), MAS (2.6 ± 1.1 vs. 26.25 ± 1.7 ; $p < 0.0001$) and double labeling (2.1 ± 0.9 vs. 20 ± 2.9 ; $p = 0.0012$).

The PVN was photographed in its different portions, the results demonstrated that WD, in the lateral magnocellular portion (PALM, fig. 7A) increases FOS (14.5 ± 5.1 ; vs. 32.3 ± 3.5 ; $p = 0.0257$), with no alterations on MAS (59.9 ± 7.4 vs. 62.3 ± 13.6 ; $p = 0.8832$) or double labeling (10 ± 2.5 vs. 19.3 ± 5.8 ; $p = 0.1871$). In the parvocellular medial portion (PAMP, fig. 7B) FOS increases (20.2 ± 2.9 vs. 31 ± 3 ; $p = 0.0427$), with no changes on MAS (83.88 ± 16.1 vs. 96.5 ± 5.7 ; $p = 0.4426$) or double labeling (12.6 ± 2 vs. 15.1 ± 2.5 ; $p = 0.48$). In the posterior parvocellular portion (PAPO, figure 7C) FOS increases (25 ± 4.7 vs. 43.5 ± 4.3 ; $p = 0.0334$), with no changes on MAS (65.7 ± 7.5 vs. 98.7 ± 12.2 ; $p = 0.1027$) or double labeling (5.2 ± 2.9 vs. 18.9 ± 6.2 ; $p = 0.1602$).

Representative images from the MnPO (Fig. 8), SON (fig. 9), PALM and PAMP (Fig. 10) and PAPO (Fig. 11) are represented posteriorly, while in the circumventricular organs (SFO, AP and OVLT) and NTS, the double labeling was too strong, which prevented the interpretation of the images (Fig. 12).

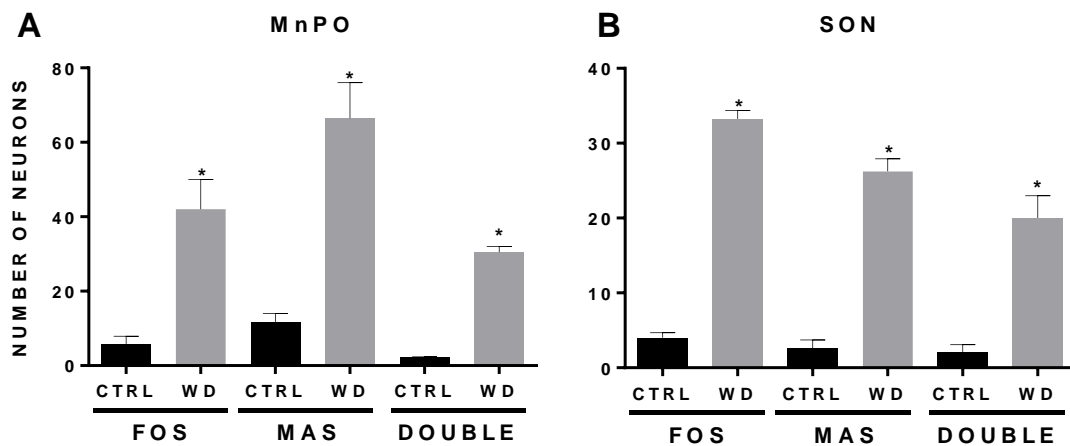


Figure 6. The data shows the number of immunoreactive neurons in the median pre-optic (MnPO, A) and supra-optic (SON, B) nuclei. Water deprivation increased FOS, MAS and double labeling, suggesting that WD sensitizes the nuclei to ANG-(1-7), which then directly affects these nuclei. * $p < 0,05$ when compared to control.

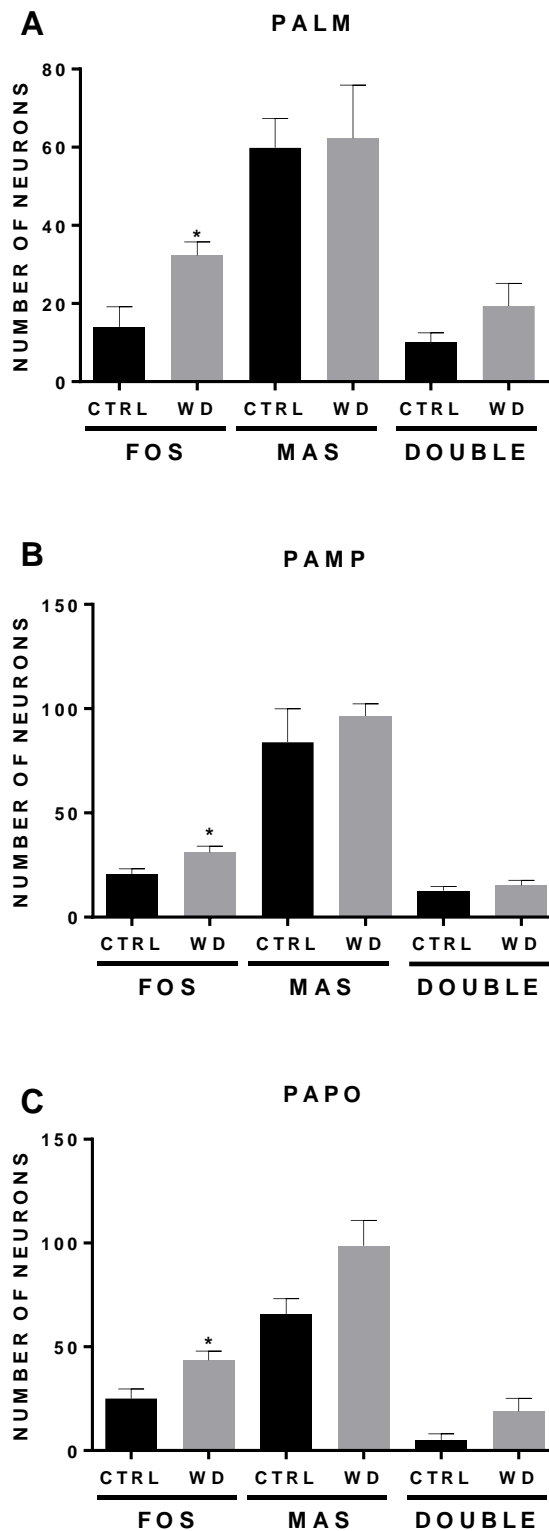


Figure 7. The PVN was divided in its several portions, the data represent the number of immunoreactive cells in the nuclei: paraventricular lateral magnocellular (PALM, A); paraventricular medial parvocellular (PAMP, B); e paraventricular posterior parvocellular (PAPO, C). Water deprivation induces increases in FOS; MAS is already highly expressed in control, being found in most cells of this region, and does not change after water deprivation; and the insignificant results on FOS-MAS double labeling indicate that despite the increase in FOS, this does not occur in MAS-expressing neurons.

* $p < 0.05$ when compared to control.

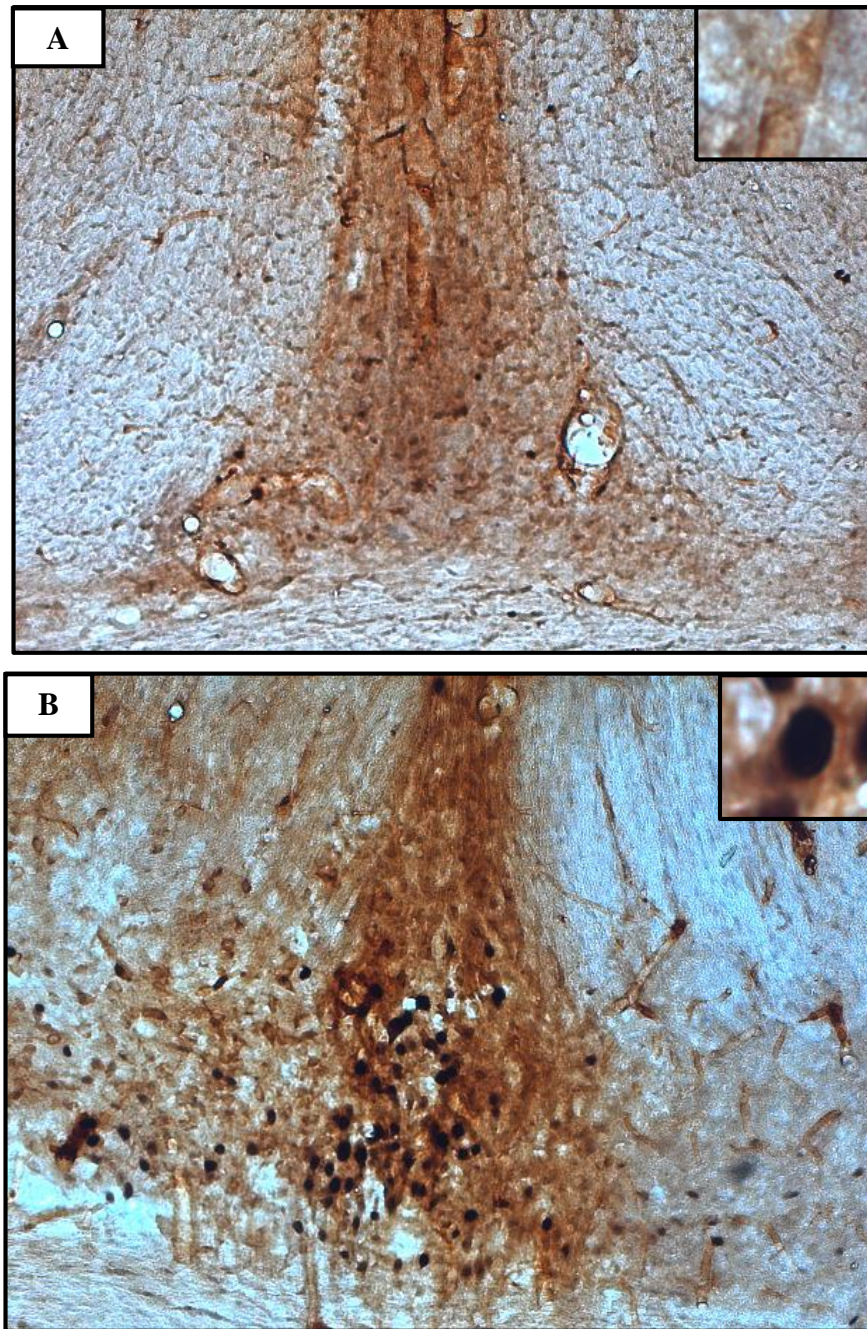


Figure 8. Representative images of the MnPO (CTRL, A1; WD, A2). The control animals show few neurons reactive to MAS or FOS, after water deprivation FOS, MAS, and FOS-MAS double labeling are highly expressed. Images present 100-fold magnification, inserts show 400-fold magnification.

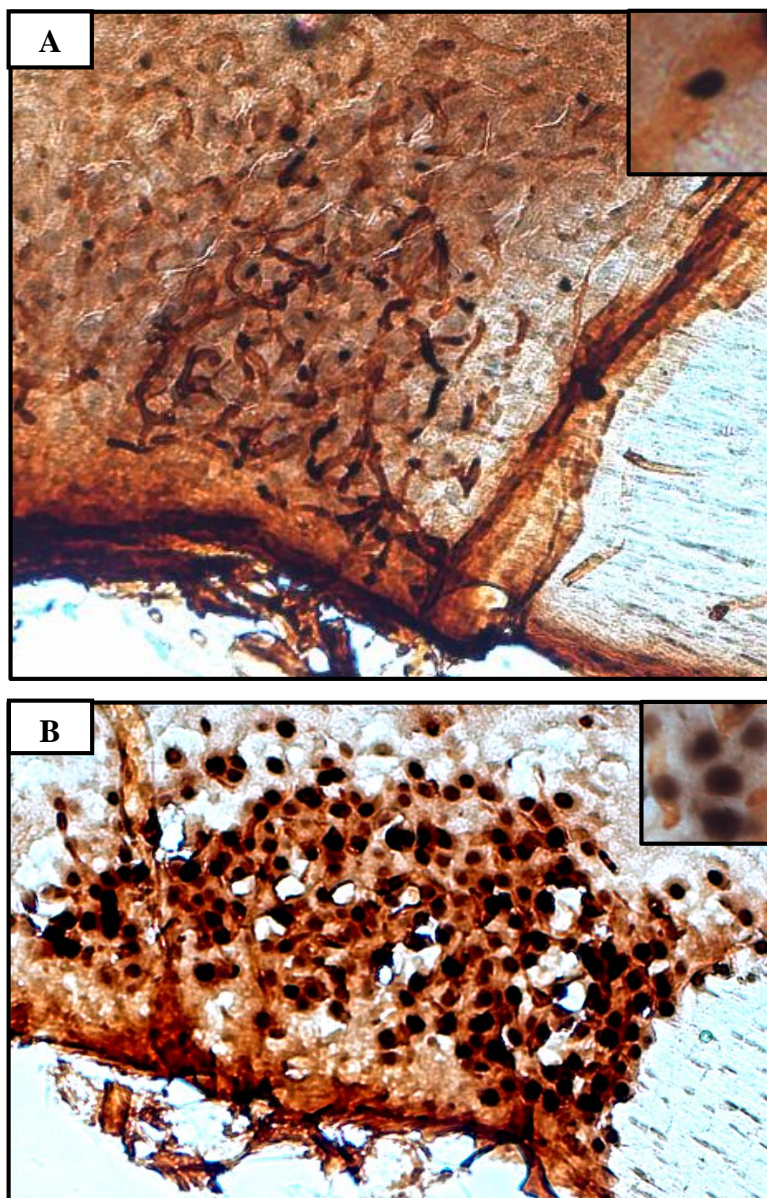


Figure 9. Representative images of the SON (CTRL, A1; WD, A2). The control animals show few neurons reactive to MAS or FOS, after water deprivation FOS, MAS, and FOS-MAS double labeling are highly expressed., similar to the results of the MnPO. Images present 100-fold magnification, inserts show 400-fold magnification.

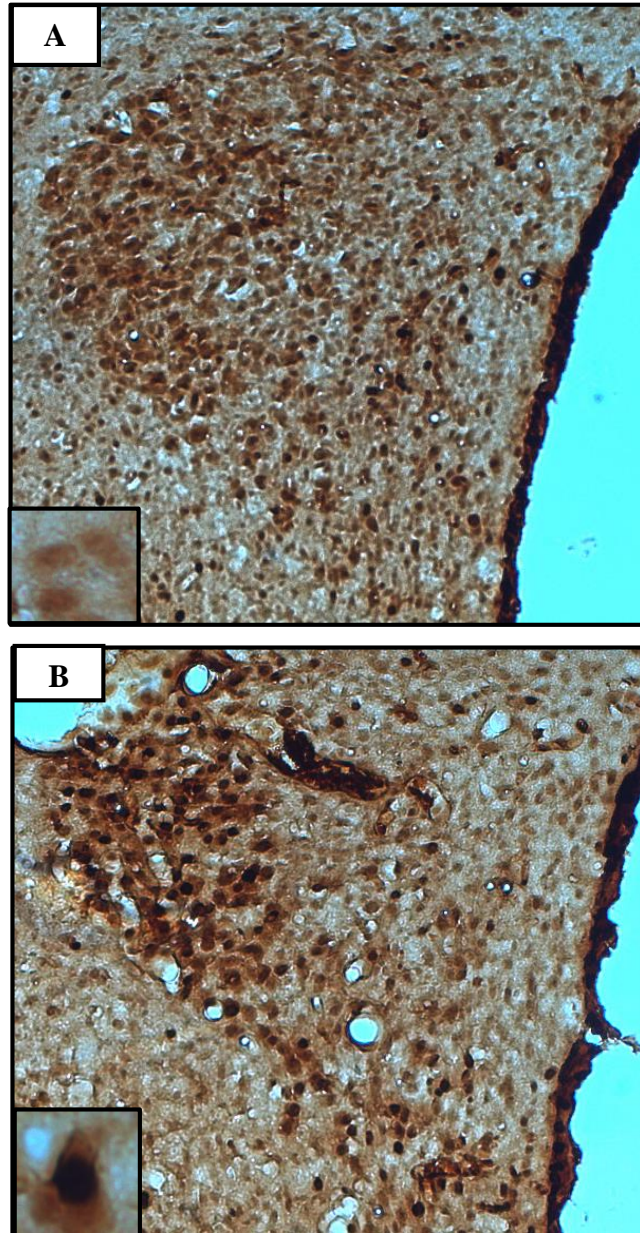


Figure 10. Representative images of the lateral magnocellular (PALM) e medial parvocellular (PAMP) paraventricular nuclei (A1 = CTRL; A2 = PRIV). Immunoreactivity to FOS increased, however, MAS and double labeling were not altered after water deprivation. Images present 100-fold magnification, inserts show 400-fold magnification.

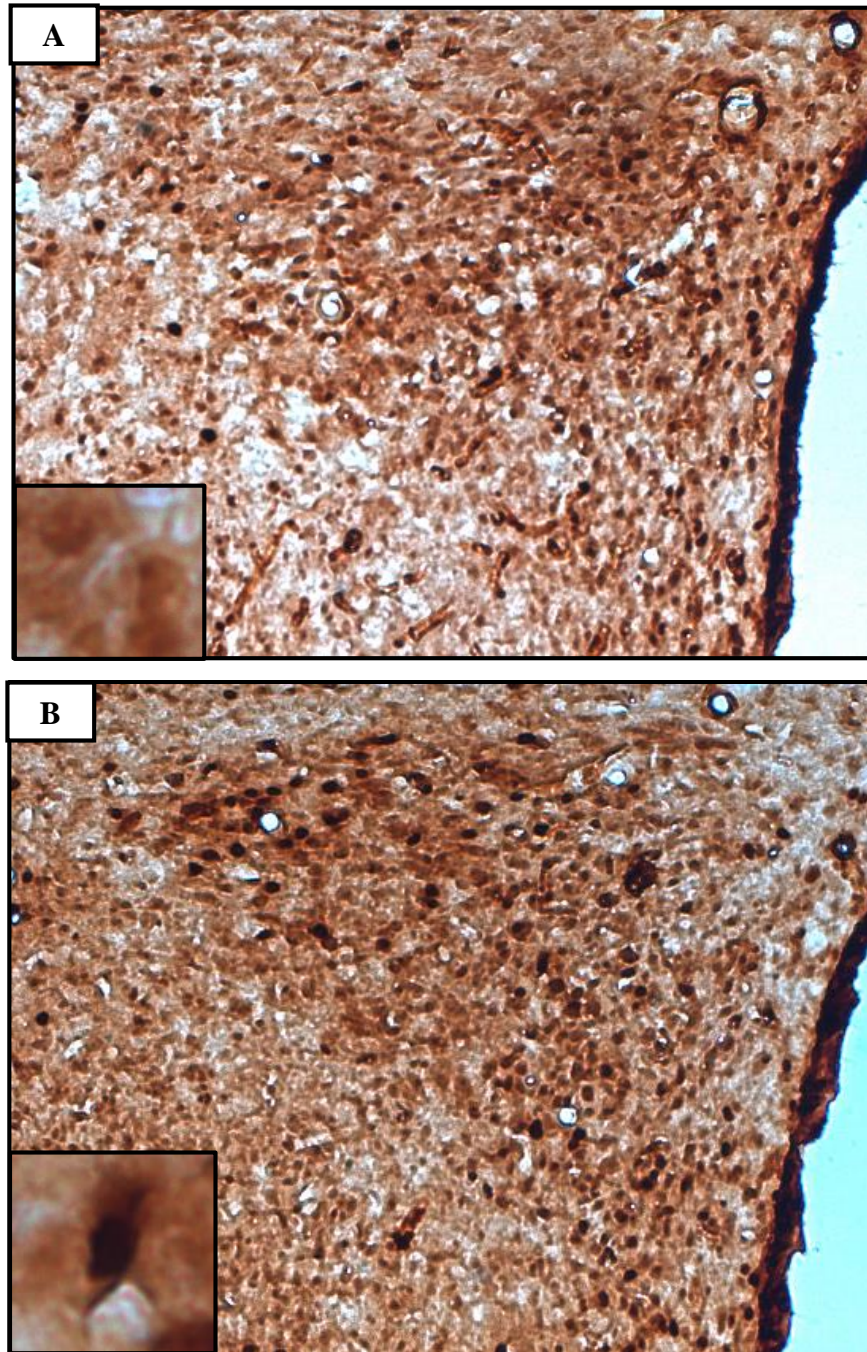


Figure 11. Representative images of the posterior parvocellular paraventricular nucleus (PAPO) (A1 = CTRL; A2 = PRIV). Immunoreactivity to FOS increased, however, MAS and double labeling were not altered after water deprivation. Images present 100-fold magnification, inserts show 400-fold magnification.

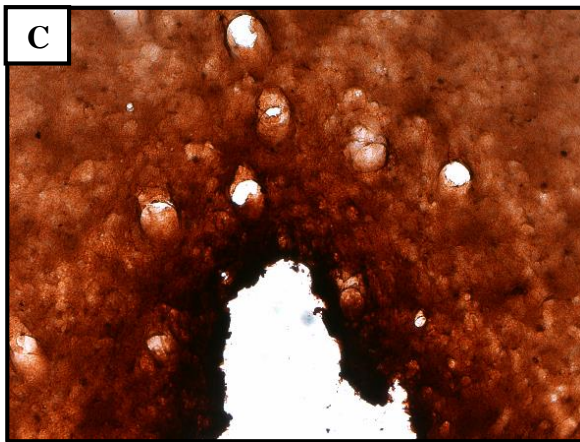
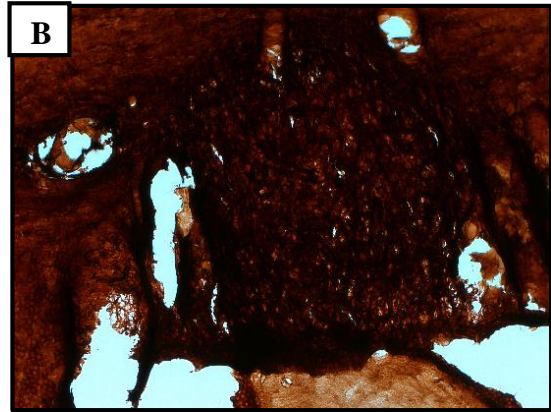
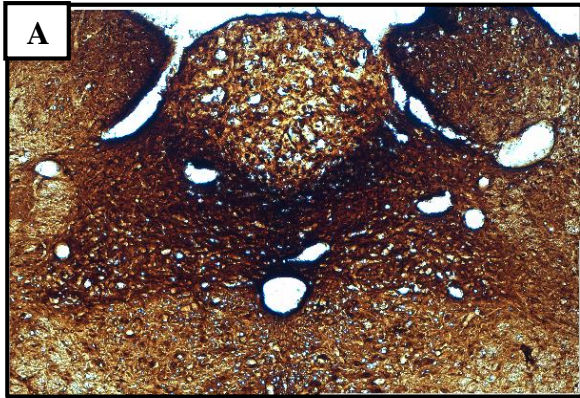


Figure 12. Representative images of the dorsovagal complex (NTS, AP and DMX; A); SFO (B); and OVLT (C) of control animals. The intense labeling, possibly due to the presence of MAS in blood vessels, which are abundant in these regions, prevented the count of immunoreactive neurons reactive to FOS / MAS. Images present 100-fold magnification.

6 DISCUSSION

Blood volume is maintained by a constant balance between water ingestion and loss through respiration, sweat, feces and urine, in normal conditions the balance between intake and excretion is sufficient to compensate for the loss. For example, an increase in water intake is compensated by an increase in urination, and conversely, an increase in water loss is compensated by a higher intake, so that the intra- and extracellular liquid is kept in a narrow range of variation. Urine is the most important component of water and sodium loss, since its ionic composition varies to meet the requirements of the organism. On the other hand, thirst and the consequent water intake, *per se* or through feeding, are used to increase the water of the internal milieu. When water intake is prevented this balance between intake and excretion is deregulated, inducing water loss with small ionic loss increasing blood osmolarity, in other words, causing dehydration (BOURQUE, 2008). In this study, 24 hour water deprivation was capable of increasing blood hematocrit and osmolarity, indicating a decrease in blood volume, as such showing the dehydration caused by water deprivation.

Additionally, while the body weight of CTRL animals slightly increased after 24 hours, in the WD animals the body weight decreased, probably due to the water loss associated to the anorexia caused by increased osmolarity. Water deprivation *per se* is sufficient to decreasing feeding and, consequently, body weight (GREENWOOD et al., 2015).

In short, these parameters demonstrate that 24 hours water deprivation was sufficient to induce dehydration in this study. Water deprivation stimulates the increase of RAS activity, which induces thirst and sodium appetite. Moreover, increases osmolarity which generates osmotic thirst and blocks sodium appetite. This culminates with the intake initially of water, and, posteriorly, of hypertonic saline after the correction of osmolarity (DE LUCA JR. et al., 2010). Our data corroborates this information, since we have shown increased water intake, prior to hypertonic saline intake.

The microinjection of ANG-(1-7) was not capable of altering water and sodium intake in basal conditions, as previous studies (COONEY; FITZSIMONS, 1993; MAHON et al., 1995). In other contexts it has already been shown that the effects of ANG-(1-7) are more prominent after a challenge to homeostasis, such as hypertension (CERRATO et al., 2012; DOBRUCH et al., 2003). ANG-(1-7) only affected water and sodium intake after water

deprivation, when it increased water intake and presented a tendency to blunt sodium appetite, thus, this peptide seems to be involved in the mediation of thirst to water deprivation, since it is capable of increasing water intake even when it is already high.

Water deprivation increases the expression of AT1 receptors, potentiating ANG-II actions (COBLE et al., 2015), possibly, the same occurs with MAS receptors potentiating the effects of ANG-(1-7), in a similar manner to the observed with AT1. The technique of immunohistochemistry, however, was not capable of identifying the variation in the density of this receptor, since MAS is broadly expressed even in CTRL. The MnPO and SON, nuclei that had few MAS-expressing neurons in CTRL, significantly increased after WD. Thus, the PVN may have increased MAS, which was not observable through the technique of immunohistochemistry, so that this nucleus, as much as SFO, OVLT, AP and NTS, should be verified by other techniques, such as western blotting or real time PCR, in order to clarify this issue.

In this sense, after water deprivation plasmatic ANG-II and ANG-(1-7) increase, however, the increase in ANG-(1-7) is proportionally greater than that of ANG-II (BOTELHO et al., 1994). In the hypothalamus, medulla and amygdala, the rat shows similar levels of ANG-I, ANG-II and ANG-(1-7) in basal conditions (CHAPPEL, 1989), however, the alterations that water deprivation induces on these levels is not known, possibly, WD increases both with a greater increase in ANG-(1-7), following the same pattern of the peripheral RAS. Additionally, WD is capable of increasing ACE, with no increase in AT1 (BOURASSA; SPETH, 2010), inducing the formation of ANG-(1-7), which corroborates the hypothesis that ANG-(1-7) influences the responses to WD.

Although ANG-(1-7) demonstrates effects opposed to ANG-II in several systems, evidences highlight that in some nuclei they show synergic actions, in other words, when used in isolation they achieve a determined effect, however when used together they achieve an effect that is greater than the sum of both isolate effects. This synergic action has been demonstrated in the NTS, where renin microinjection causes hypotensive effects, that may be attenuated by administration of ACE, AT1 or MAS blockers, and abolished by the concomitant use of MAS and AT1 antagonist (CHENG et al., 2012). Despite being demonstrated in the NTS, it is possible that this synergism occurs in other nuclei, so that ANG-II and ANG-(1-7) act synergistically to induce thirst, whilst ANG-(1-7) reduces sodium appetite, counterbalancing the action of ANG-II, so that only water intake occurs. Afterwards, the decrease of osmolarity leads the expression of MAS back to basal levels, in which ANG-

(1-7) does not influence water and sodium intake, so that ANG-(1-7) ceases to act centrally and its inhibition of sodium appetite is removed, allowing the increased sodium appetite after water deprivation.

Alternatively, the stimulation of the OCVs may be caused directly by the increased plasmatic sodium instead of peripheral ANG-(1-7). This sodium may act on sodium sensors present on SFO and OVLT, or through the osmotic leakage of water from these neurons inducing the activation of mechanoreceptors and, in turn, activating these nuclei (NODA; SAKUTA, 2013), which lead to the activation of projections that secrete ANG-II and, possibly, ANG-(1-7).

This study is the first to assess if ANG-(1-7) affects the behaviors of water and sodium intake after water deprivation. We used the dose of 3nmol, which is smaller than the maximum dose used in other studies that did not affect water and sodium intake in basal condition, however, high in comparison to the doses of ANG-II that alter these behaviors (0,01 and 0,1 nmol, respectively) (COONEY; FITZSIMONS, 1993; MAHON et al., 1995). However, the responses found after water deprivation raise the possibility that this peptide is involved in this response, in order to test this hypothesis its necessary to use doses closer to physiological levels in order to construct a dose-response curve of the effects of ANG-(1-7). Another important aspect to be verified is the endogenous participation of ANG-(1-7) on water deprivation, for such the injection of ANG-(1-7) antagonists after water deprivation is warranted.

The presence of ACE2 (DOOBAY et al., 2007) and MAS (BECKER et al., 2007; FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012) in several regions related to cardiovascular and hydroelectrolytic regulation is a strong indicator that ANG-(1-7) is important in the modulation of these responses. Water deprivation increases FOS in the SFO, OVLT, AP and NTS (YOSHIMURA et al., 2013), however, double labeling of FOS and MAS was not possible in these nuclei, since the concentration of antibodies used in this study, although effective in other regions, showed an much intense labeling in these nuclei. Possibly, the rich vascularization of these nuclei induces these results, since MAS is also expressed in blood vessels.

The presence of MAS was already demonstrated at the AP (BECKER et al., 2007) and SFO (FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012) and is also probably present in the OVLT. This suggests that peripheral ANG-(1-7) acts on these nuclei, since they are deprived of blood-brain barrier, and initiate the consequent central circuitry responses to

increased plasmatic ANG-(1-7) after WD. What is this response, however, has not been established by scientific literature.

Both SFO and OVLT project to several nuclei related to hydroelectrolytic control, amongst which the MnPO (MCKINLEY et al., 2015) that is a key region for the integration of neuroendocrine responses to several osmotic stimuli (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2013). Interestingly, when the water-deprived animal is allowed to drink, the levels of FOS decrease in most of these nuclei, but persists in the MnPO, highlighting the importance of this nucleus in this context (JI et al., 2005). In basal conditions, the MnPO does not show MAS expression in CTRL, nonetheless after WD MAS, FOS and double labeling increase in this region, indicating that water deprivation sensitizes this region for ANG-(1-7) actions. In basal condition, MAS is discretely expressed in the SFO (FREUND; WALTHER; VON BOHLEN UND HALBACH, 2012), the increase in plasmatic ANG-II and ANG-(1-7) may increase the expression of this receptor, enabling the action of ANG-(1-7) after water deprivation.

The PVN and SON send efferent magnocellular projections that secrete OT and AVP. In hypovolemia and hypernatremia (amongst others), AVP and OT are secreted by the neurohypophysis and reach the systemic circulation. AVP acts in renal V2 receptors inducing the translocation of aquaporin channels to the apical membrane, increasing water reabsorption; meanwhile OT acts on the heart secreting ANP, and both act in the kidney closing epithelial sodium reabsorption channels and, consequently, inducing its excretion (MECAWI et al., 2015). During water deprivation, the osmolarity is increased and blood volume decreased (DE LUCA et al., 2007), so that after WD the levels of AVP and OT are elevated in the plasma, meanwhile the gene for AVP, and not OT, synthesis is increased in the SON (GREENWOOD et al., 2015).

The MnPO sends excitatory projection to the PVN and SON, thus modulating the secretion of AVP and OT, it is not known, however, if central ANG-(1-7) is capable of changing the secretion of AVP and OT after water deprivation. The MnPO additionally, sends inhibitory projections to the DRN and LPBN (MCKINLEY et al., 2015), regions that inhibit sodium appetite (MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014; REIS, 2007), so that increased activity of the MnPO, inhibits the inhibitory nuclei, allowing the development of sodium intake. However, ICV administration of ANG-(1-7) inhibited sodium appetite, so it either stimulates only the nuclei projecting to PVN and SON, or presents concomitant excitatory effects on MnPO, DRN and LPBN, so that although acting on the MnPO, the excitatory

effects on DRN and LPBN are more potent, therefore culminating with the inhibition of sodium appetite.

Both PVN and SON are activated after WD, as demonstrated by the increase of FOS in these regions, interestingly the double labeling was only significantly higher in the SON, what suggests a direct action of ANG-(1-7) in this region. Possibly, the activation of the PVN is indirect through excitatory afferents from the SFO, MnPO and OVLT, however, the ubiquitous presence of MAS in this region indicates that the ANG-(1-7) / MAS axis is possibly important in another physiological challenge.

Additionally, the SON and MnPO significantly increased MAS after water deprivation, which, along with the results in intake behaviors, sustain the hypothesis that the action of ANG-(1-7) is less pronounced in basal conditions, being more important after a sustained or potent stimulus. Other contexts have shown that the action of ANG-(1-7) is more pronounced after chronic challenges, such as hypertension (FERRARIO et al., 2014).

NO, which is part of MAS receptor pathway (BADER et al., 2014), decreases firing frequency of magnocellular neurons (RUGINSK et al., 2015). However, ANG-(1-7) increases neuronal activity in nuclei such as the PVN (HAN et al., 2012; SILVA; SANTOS; FONTES, 2005; SUN et al., 2012), RVLM (SANTOS et al., 2003b) and CVLM (ALZAMORA; SANTOS; CAMPAGNOLE-SANTOS, 2002). It has been previously proposed that NO is not implicated in the actions of ANG-(1-7) through MAS (ZHANG et al., 2012), which directly contradicts other studies (SAMPAIO et al., 2007; WHITAKER; MOLINA, 2013). These divergences in the literature difficulties the interpretation of the obtained results, so that these questions need to be assessed by future studies, in order to address the mechanisms through which ANG-(1-7) acts centrally.

Nonetheless, our results are coherent with an increased activity of the PVN and SON, however, the mediation of NO in these responses is unlikely, since in these nuclei if NO was liberated they would be less active (RUGINSK et al., 2015). This question may be assessed through different methodological approaches, such as evaluating: the intracellular pathway activated in these nuclei after ICV administration of ANG-(1-7); the electrophysiological pattern of activation of magnocellular neurons; or the plasmatic AVP secretory response, results of increased activation of the PVN and SON.

The FOS-MAS double labeling in the SON, inductor or AVP secretion, and MnPO, that sends excitatory projection to PVN and SON, inducing the secretion of AVP when activated, allows us to hypothesize that ANG-(1-7) is part of the signaling involved in AVP

and OT secretion after WD (Fig. 12). Previous studies that assessed the secretion of AVP by ANG-(1-7) were made either in basal condition (MAHON et al., 1995) or in *in vitro* preparations (SCHIAVONE et al., 1988), so that this neuroendocrine hypothesis needs to be investigated in future studies.

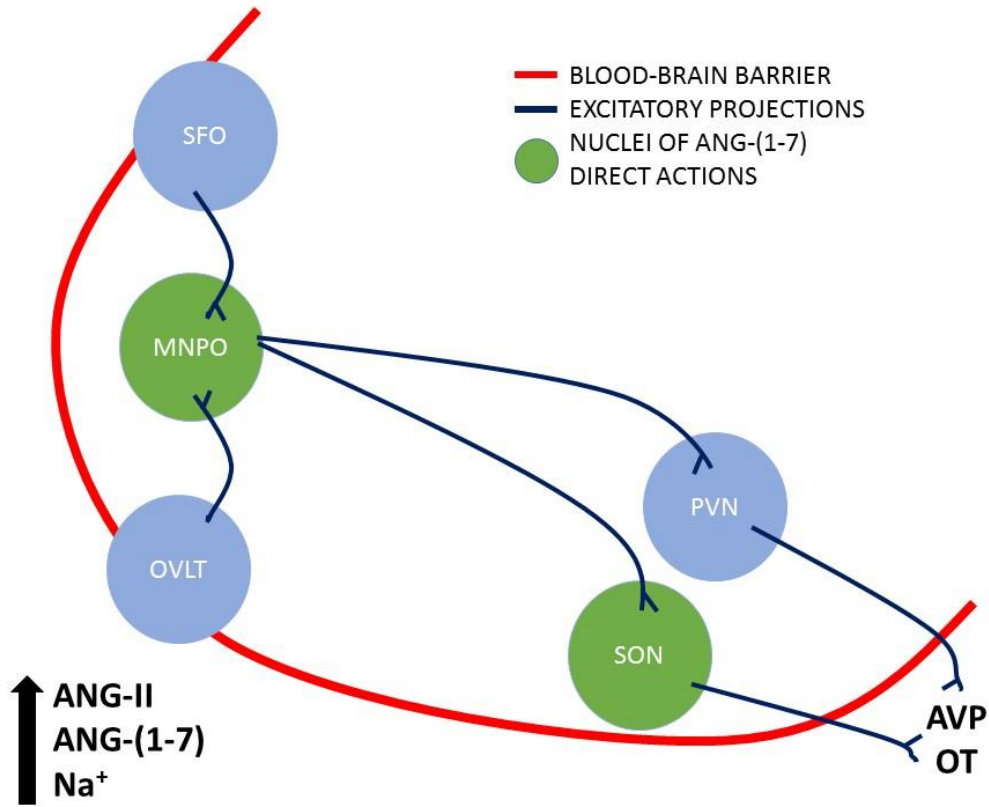


Figure 13. The increased plasmatic concentration of ANG-II, ANG-(1-7) or sodium influence the activity of the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) and subfornical (SFO), increasing central ANG-(1-7); which, in turn, act directly on median pre-optic (MnPO) and supra-optic (SON) nuclei, and indirectly in the paraventricular nucleus (PVN) modulating the secretion of AVP and OT.

After the recovery of normal osmolarity the animals start drinking hypertonic saline, hence, the inhibition of sodium appetite caused by ANG-(1-7) should have decreased. Previous studies demonstrated that ANG-(1-7) is capable of inducing endocytosis of MAS receptor (GIRONACCI et al., 2011), so, ANG-(1-7) itself may desensitize and internalize MAS, in a negative feedback mechanism that ends its actions after the recovery of homeostasis.

Although not directly verified in this study, the LPBN and DRN nuclei project serotonergic neuron involved in a myriad of responses, amongst which we highlight the

modulation of water and sodium intake (MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014; REIS, 2007). In this study ANG-(1-7) was also capable of inhibiting sodium appetite, indicating a possible action of ANG-(1-7) in these nuclei. The relationship between ANG-(1-7) and the serotonin circuit regarding water and sodium appetite has not been investigated.

Other osmotic challenges may directly affect this system, a possible methodological approach would be to assess if ICV ANG-(1-7) is capable of acting in a situation of decreased osmolarity and hypovolemia (after diuretics, for example) or decreased osmolarity concomitant to hypervolemia (hydric expansion, for example). In order to evaluate if sodium, blood volume, or both are responsible for this altered responsiveness to ANG-(1-7). Since the effect found in this study was an increased water intake and blunted sodium intake, the increase in osmolarity is a strong candidate to initiate this signaling, therefore, an increase in plasmatic sodium concentration increases central ANG-(1-7) and, if it persists for a longer period, increases the expression of MAS, allowing its central actions.

In conclusion, the increase of ANG-II and ANG-(1-7) in the plasma, allied to direct stimulation of sodium increase, caused by water deprivation, act on the SFO and OVLT, increasing brain RAS. This increase sensitizes some nuclei of this circuitry to the actions of ANG-(1-7), that in this context acts along with ANG-II to induce water intake, and against ANG-II to inhibit sodium appetite. In this sense, the MnPO and SON are responsible for the local acting of ANG-(1-7), since in these the expression of MAS, as much as the double labeling FOS-MAS, are increased after water deprivation, these are possible targets of ANG-(1-7) action. While ANG-(1-7) may act directly on the serotonergic system, DRN and LPBN, increasing its activation and acutely decreasing sodium appetite.

6.1 Perspectives

- Dose-response curve for the determination of the effects of several doses of ICV ANG-(1-7) on hydroelectrolytic parameters after water deprivation;
- Dosage of plasmatic AVP and OT after ICV microinjection of ANG-(1-7), in basal conditions and after water deprivation;
- double labeling of FOS-MAS in nuclei not assessed in this study, but related to the behaviors of thirst and sodium appetite (DRN, LPBN, RVLM, CVLM);
- quantification of Mas expression in several nuclei involved with hydroelectrolytic responses (SFO, OVLT, MNPO, PVN, SON, DRN, LPBN, RVLM, CVLM).

7 REFERÊNCIAS / REFERENCES

- ALZAMORA, A. C.; SANTOS, R. A.; CAMPAGNOLE-SANTOS, M. J. Hypotensive effect of ANG II and ANG-(1-7) at the caudal ventrolateral medulla involves different mechanisms. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 283, n. 5, p. R1187–95, 2002.
- ANDRADE-FRANZE, G. M. et al. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. **Neuroscience**, v. 165, n. 3, p. 633–641, 2010.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 169–208, 2004.
- ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Mapping and signaling of neural pathways involved in the regulation of hydromineral homeostasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 46, n. 4, p. 327–338, 2013.
- BADER, M. et al. MAS and its related G protein-coupled receptors, Mrgprs. **Pharmacological reviews**, v. 66, n. 4, p. 1080–105, out. 2014.
- BECKER, L. K. et al. Immunofluorescence localization of the receptor Mas in cardiovascular-related areas of the rat brain. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 293, n. 3, p. H1416–24, 2007.
- BENTER, I. F. et al. Angiotensin-(1-7) blockade attenuates captopril- or hydralazine-induced cardiovascular protection in spontaneously hypertensive rats treated with NG-nitro-L-arginine methyl ester. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 57, n. 5, p. 559–567, 2011.
- BISLEY, J. W. et al. Identification of osmosensitive neurons in the forebrain of the rat: a Fos study at the ultrastructural level. **Brain Research**, v. 720, n. 1-2, p. 25–34, 1996.
- BLOCK, C. H. et al. Immunocytochemical localization of angiotensin-(1-7) in the rat forebrain. **Peptides**, v. 9, n. 6, p. 1395–401, 1988.
- BLOOD PRESSURE LOWERING TREATMENT TRIALISTS, C. et al. Effects of different regimens to lower blood pressure on major cardiovascular events in older and younger adults: meta-analysis of randomised trials. **BMJ**, v. 336, n. 7653, p. 1121–1123, 2008.
- BOTELHO, L. M. et al. Plasma angiotensin(1-7) immunoreactivity is increased by salt load, water deprivation, and hemorrhage. **Peptides**, v. 15, n. 4, p. 723–9, jan. 1994.
- BOURASSA, E. A.; SPETH, R. C. Water deprivation increases angiotensin-converting enzyme but not AT1 receptor expression in brainstem and paraventricular nucleus of the hypothalamus of the rat. **Brain Research**, v. 1319, p. 83–91, 2010.
- BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 519–31, jul. 2008.

BRITTO, R. R. et al. Role of angiotensin-(1-7) in the modulation of the baroreflex in renovascular hypertensive rats. **Hypertension**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 549–556, 1997.

CERRATO, B. D. et al. Angiotensin-(1-7) upregulates central nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. **Brain research**, v. 1453, p. 1–7, 9 maio 2012.

CHAPPEL, M. C. Identification of Angiotensin-(1-7) in Rat Brain: EVIDENCE FOR DIFFERENTIAL PROCESSING OF ANGIOTENSIN PEPTIDES*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 264, n. 28, p. 16518–16523, 1989.

CHAPPELL, M. C. et al. Update on the Angiotensin converting enzyme 2-Angiotensin (1-7)-MAS receptor axis: fetal programming, sex differences, and intracellular pathways. **Front Endocrinol (Lausanne)**, v. 4, p. 201, 2014.

CHENG, W.-H. et al. Renin activates PI3K-Akt-eNOS signalling through the angiotensin AT₁ and Mas receptors to modulate central blood pressure control in the nucleus tractus solitarius. **British journal of pharmacology**, v. 166, n. 7, p. 2024–35, ago. 2012.

CIRIELLO, J.; LAWRENCE, D.; PITTMAN, Q. J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Res**, v. 322, n. 2, p. 388–392, 1984.

COBLE, J. P. et al. Mechanisms of brain renin angiotensin system-induced drinking and blood pressure: importance of the subfornical organ. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 308, n. 4, p. R238–49, 15 fev. 2015.

COONEY, A. S.; FITZSIMONS, J. T. The effect of the putative AT₂ agonist, p-aminophenylalanine⁶ angiotensin II, on thirst and sodium appetite in rats. **Experimental physiology**, v. 78, n. 6, p. 767–774, 1993.

DE LUCA JR., L. A. et al. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 2, p. R552–9, 2002.

DE LUCA JR., L. A. et al. Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiol Behav**, v. 100, n. 5, p. 535–544, 2010.

DE LUCA, L. A. et al. Water deprivation and the double- depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. **Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas médicas e biológicas / Sociedade Brasileira de Biofísica ... [et al.]**, v. 40, n. 5, p. 707–12, maio 2007.

DEDDISH, P. A. et al. N-domain-specific substrate and C-domain inhibitors of angiotensin-converting enzyme: angiotensin-(1-7) and keto-ACE. **Hypertension**, v. 31, n. 4, p. 912–917, 1998.

DILAURO, M.; BURNS, K. D. Angiotensin-(1-7) and its effects in the kidney. **TheScientificWorldJournal**, v. 9, p. 522–35, jan. 2009.

- DOBRUCH, J. et al. Hypotensive function of the brain angiotensin-(1-7) in Sprague Dawley and renin transgenic rats. **J Physiol Pharmacol**, v. 54, n. 3, p. 371–381, 2003.
- DONOGHUE, M. et al. A novel angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase (ACE2) converts angiotensin I to angiotensin 1-9. **Circ Res**, v. 87, n. 5, p. E1–9, 2000.
- DOOBAY, M. F. et al. Differential expression of neuronal ACE2 in transgenic mice with overexpression of the brain renin-angiotensin system. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 1, p. R373–81, 2007.
- 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.
- FENG, Y. et al. Angiotensin-converting enzyme 2 overexpression in the subfornical organ prevents the angiotensin II-mediated pressor and drinking responses and is associated with angiotensin II type 1 receptor downregulation. **Circ Res**, v. 102, n. 6, p. 729–736, 2008.
- FENG, Y. et al. Brain-selective overexpression of human Angiotensin-converting enzyme type 2 attenuates neurogenic hypertension. **Circ Res**, v. 106, n. 2, p. 373–382, 2010.
- FERRARIO, C. M. et al. Angiotensin-(1-7): a new hormone of the angiotensin system. **Hypertension**, v. 18, n. 5 Suppl, p. III126–33, 1991.
- FERRARIO, C. M. et al. Counterregulatory actions of angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 30, n. 3 Pt 2, p. 535–541, 1997.
- FERRARIO, C. M. Angiotensin-converting enzyme 2 and angiotensin-(1-7): an evolving story in cardiovascular regulation. **Hypertension**, v. 47, n. 3, p. 515–521, 2006.
- 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.
- FERREIRA, A. J.; SANTOS, R. A. Cardiovascular actions of angiotensin-(1-7). **Braz J Med Biol Res**, v. 38, n. 4, p. 499–507, 2005.
- FITZSIMONS, J. T. The effect on drinking of peptide precursors and of shorter chain peptide fragments of angiotensin II injected into the rat's diencephalon. **The Journal of physiology**, v. 214, n. 2, p. 295–303, 1971.
- FITZSIMONS, 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. **The Journal of physiology**, v. 203, n. 1, p. 45–57, 1969.
- FONSECA, F. V. et al. Role of the 5-HT(1A) somatodendritic autoreceptor in the dorsal raphe nucleus on salt satiety signaling in rats. **Experimental neurology**, v. 217, n. 2, p. 353–60, jun. 2009.

- FREEMAN, K. L.; BROOKS, V. L. AT(1) and glutamatergic receptors in paraventricular nucleus support blood pressure during water deprivation. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 292, n. 4, p. R1675–R1682, 2007.
- FREUND, M.; WALTHER, T.; VON BOHLEN UND HALBACH, O. Immunohistochemical localization of the angiotensin-(1-7) receptor Mas in the murine forebrain. **Cell and Tissue Research**, v. 348, n. 1, p. 29–35, 2012.
- GEERLING, J. C. et al. Paraventricular hypothalamic nucleus: axonal projections to the brainstem. **J Comp Neurol**, v. 518, n. 9, p. 1460–1499, 2010.
- GEMBARDT, F. et al. Angiotensin metabolites can stimulate receptors of the Mas-related genes family. **Mol Cell Biochem**, v. 319, n. 1-2, p. 115–123, 2008.
- GILLIAM-DAVIS, S. et al. Long-term systemic angiotensin II type 1 receptor blockade regulates mRNA expression of dorsomedial medulla renin-angiotensin system components. **Physiol Genomics**, v. 43, n. 13, p. 829–835, 2011.
- GIRONACCI, M. M. et al. Angiotensin-(1-7) Reduces Norepinephrine Release Through a Nitric Oxide Mechanism in Rat Hypothalamus. **Hypertension**, v. 35, n. 6, p. 1248–1252, 1 jun. 2000.
- GREENWOOD, M. P. et al. A comparison of physiological and transcriptome responses to water deprivation and salt loading in the rat supraoptic nucleus. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 308, n. 7, p. R559–68, 1 abr. 2015.
- HALL, J. E. Historical perspective of the renin-angiotensin system. **Mol Biotechnol**, v. 24, n. 1, p. 27–39, 2003.
- HAN, Y. et al. Angiotensin-(1-7) in paraventricular nucleus modulates sympathetic activity and cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e48966, 2012.
- HIYAMA, T. Y. et al. Nax channel involved in CNS sodium-level sensing. **Nature Neuroscience**, v. 5, n. 6, p. 511–512, 2002.
- Jl, L. L. et al. Effects of water deprivation and rehydration on c-Fos and FosB staining in the rat supraoptic nucleus and lamina terminalis region. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 288, n. 1, p. R311–21, 2005.
- Jl, L. L. et al. Differential effects of water deprivation and rehydration on Fos and FosB/DeltaFosB staining in the rat brainstem. **Exp Neurol**, v. 203, n. 2, p. 445–456, 2007.
- JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, v. 18, n. 3, p. 292–353, 1997.
- LIND, R. W. Bi-directional, chemically specified neural connections between the subfornical organ and the midbrain raphe system. **Brain research**, v. 384, n. 2, p. 250–261, 1986.

LIND, R. W.; SWANSON, L. W.; GANTEN, D. Angiotensin II immunoreactivity in the neural afferents and efferents of the subfornical organ of the rat. **Brain Research**, v. 321, n. 2, p. 209–215, 1984.

MAHON, J. M. et al. The association of thirst, sodium appetite and vasopressin release with c-fos expression in the forebrain of the rat after intracerebroventricular injection of angiotensin II, angiotensin-(1-7) or carbachol. **Neuroscience**, v. 69, n. 1, p. 199–208, 1995.

MCKINLEY, M. J. et al. The median preoptic nucleus: front and centre for the regulation of body fluid, sodium, temperature, sleep and cardiovascular homeostasis. **Acta physiologica (Oxford, England)**, p. 1–25, 9 mar. 2015.

MECAWI, A. DE S. et al. Neuroendocrine Regulation of Hydromineral Homeostasis. **Comprehensive Physiology**, v. 5, n. 3, p. 1465–516, 1 jul. 2015.

MENANI, J. V; DE LUCA, L. A; JOHNSON, A. K. Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 306, n. 4, p. R201–10, 2014.

MOON, J. Y. Recent Update of Renin-angiotensin-aldosterone System in the Pathogenesis of Hypertension. **Electrolyte Blood Press**, v. 11, n. 2, p. 41–45, 2013.

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

NODA, M.; SAKUTA, H. Central regulation of body-fluid homeostasis. **Trends Neurosci**, v. 36, n. 11, p. 661–673, 2013.

PAUL, M.; POYAN MEHR, A.; KREUTZ, R. Physiology of local renin-angiotensin systems. **Physiol Rev**, v. 86, n. 3, p. 747–803, 2006.

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

PEREIRA-DERDERIAN, D. T. B. et al. Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. **American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 298, n. 5, p. R1298–R1309, 2010.

PINHEIRO, S. V; SIMOES, E. S. A. C. Angiotensin converting enzyme 2, Angiotensin-(1-7), and receptor MAS axis in the kidney. **Int J Hypertens**, v. 2012, p. 414128, 2012.

REIS, L. C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, n. 2, p. 261–83, jun. 2007.

REIS, W. L. et al. Central nitric oxide blocks vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide release and antidiuretic and natriuretic responses induced by central angiotensin II in conscious rats. **Experimental physiology**, v. 92, n. 5, p. 903–11, set. 2007.

- RICE, G. I. et al. Evaluation of angiotensin-converting enzyme (ACE), its homologue ACE2 and neprilysin in angiotensin peptide metabolism. **Biochem J**, v. 383, n. Pt 1, p. 45–51, 2004.
- RUGINSK, S. G. et al. Gaseous modulators in the control of the hypothalamic neurohypophyseal system. **Physiology (Bethesda, Md.)**, v. 30, n. 2, p. 127–38, mar. 2015.
- SAMPAIO, W. O. et al. Angiotensin-(1-7) through receptor Mas mediates endothelial nitric oxide synthase activation via Akt-dependent pathways. **Hypertension**, v. 49, n. 1, p. 185–192, 2007.
- SANTOS, R. A. et al. Angiotensin-(1-7) is an endogenous ligand for the G protein-coupled receptor Mas. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8258–8263, 2003a.
- SANTOS, R. A. et al. Characterization of a new selective antagonist for angiotensin-(1-7), D-pro7-angiotensin-(1-7). **Hypertension**, v. 41, n. 3 Pt 2, p. 737–743, 2003b.
- SANTOS, R. A.; FERREIRA, A. J.; SIMOES, E. S. A. C. Recent advances in the angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin(1-7)-Mas axis. **Exp Physiol**, v. 93, n. 5, p. 519–527, 2008.
- SCHIAVONE, M. T. et al. Release of vasopressin from the rat hypothalamo-neurohypophysial system by angiotensin-(1-7) heptapeptide. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 85, n. 11, p. 4095–4098, 1988.
- SILVA, A. Q.; SANTOS, R. A.; FONTES, M. A. Blockade of endogenous angiotensin-(1-7) in the hypothalamic paraventricular nucleus reduces renal sympathetic tone. **Hypertension**, v. 46, n. 2, p. 341–348, 2005.
- SLY, D. J. et al. Identification of neural projections from the forebrain to the kidney, using the virus pseudorabies. **Journal of the Autonomic Nervous System**, v. 77, n. 2-3, p. 73–82, 1999.
- SLY, D. J.; MCKINLEY, M. J.; OLDFIELD, B. J. Activation of kidney-directed neurons in the lamina terminalis by alterations in body fluid balance. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 281, n. 5, p. R1637–46, 2001.
- SOLINSKI, H. J.; GUDERMANN, T.; BREIT, A. Pharmacology and signaling of MAS-related G protein-coupled receptors. **Pharmacol Rev**, v. 66, n. 3, p. 570–597, 2014.
- STEGBAUER, J.; COFFMAN, T. M. New insights into angiotensin receptor actions: from blood pressure to aging. **Curr Opin Nephrol Hypertens**, v. 20, n. 1, p. 84–88, 2011.
- SUN, H. J. et al. Angiotensin II and angiotensin-(1-7) in paraventricular nucleus modulate cardiac sympathetic afferent reflex in renovascular hypertensive rats. **PLoS One**, v. 7, n. 12, p. e52557, 2012.
- SWANSON, L. W. et al. Characterization of central angiotensin II receptors involved in the elicitation of drinking in the rat. **Brain research**, v. 49, n. 2, p. 441–446, 1973.

TIPNIS, S. R. et al. A human homolog of angiotensin-converting enzyme. Cloning and functional expression as a captopril-insensitive carboxypeptidase. **J Biol Chem**, v. 275, n. 43, p. 33238–33243, 2000.

VICKERS, C. et al. Hydrolysis of biological peptides by human angiotensin-converting enzyme-related carboxypeptidase. **J Biol Chem**, v. 277, n. 17, p. 14838–14843, 2002.

WEISS, M. L.; HATTON, G. I. Collateral input to the paraventricular and supraoptic nuclei in rat. I. Afferents from the subfornical organ and the anteroventral third ventricle region. **Brain Res Bull**, v. 24, n. 2, p. 231–238, 1990a.

WEISS, M. L.; HATTON, G. I. Collateral input to the paraventricular and supraoptic nuclei in rat. II. Afferents from the ventral lateral medulla and nucleus tractus solitarius. **Brain Res Bull**, v. 25, n. 4, p. 561–567, 1990b.

WHITAKER, A. M.; MOLINA, P. E. Angiotensin (1-7) contributes to nitric oxide tonic inhibition of vasopressin release during hemorrhagic shock in acute ethanol intoxicated rodents. **Life sciences**, v. 93, n. 17, p. 623–9, 17 out. 2013.

XU, P.; SRIRAMULA, S.; LAZARTIGUES, E. ACE2/ANG-(1-7)/Mas pathway in the brain: the axis of good. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 300, n. 4, p. R804–17, 2011.

YOSHIMURA, M. et al. A c-fos-Monomeric Red Fluorescent Protein 1 Fusion Transgene is Differentially Expressed in Rat Forebrain and Brainstem after Chronic Dehydration and Rehydration. **Journal of Neuroendocrinology**, v. 25, n. 7, p. 478–487, 2013.

ZARDETTO-SMITH, A. M.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Role of the central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. **Brain Res**, v. 645, p. 123–134, 1994.

ZHANG, T. et al. Inhibition of Mas G-protein signaling improves coronary blood flow, reduces myocardial infarct size, and provides long-term cardioprotection. **American journal of physiology. Heart and circulatory physiology**, v. 302, n. 1, p. H299–311, 1 jan. 2012.