

Gracieli Ana Leme

*Insuficiência aórtica subcrônica e crônica e vias centrais
relacionadas à regulação da ingestão de sódio*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, do Instituto de Biociências de Botucatu, UNESP, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana I. Fratucci De Gobbi

Botucatu

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Leme, Gracieli Ana.

Insuficiência aórtica sub-crônica e crônica e vias centrais relacionadas à ingestão de sódio / Gracieli Ana Leme. – Botucatu : [s. n.], 2012

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Juliana Irani Fratucci De Gobbi

Capes: 20702000

1. Insuficiência aórtica- Estudos experimentais. 2. Sódio. 3. Coração – Doenças.

Palavras-chave: Insuficiência aórtica; Ingestão de sódio; Sobrecarga cardíaca; Proteína c-fos; Receptores cardíacos de volume.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
UNESP, Campus de Botucatu
Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada

*Insuficiência aórtica subcrônica e crônica e vias centrais
relacionadas à regulação da ingestão de sódio*

Gracieli Ana Leme

Orientadora: Profa. Dra. Juliana I. Fratucci De Gobbi

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais e familiares pelo apoio e carinho.

Agradecemos aos funcionários do Departamento de Fisiologia pelo apoio, paciência e ajuda em todos os momentos no decorrer destes dois anos para o preparo da dissertação. Nosso muito obrigada para: Luciana, pelos serviços de secretaria, Junior, pelos cuidados com os animais, Janete, pela limpeza e alegria, Hélio, pelo auxílio com o laboratório, e Tardivo, nosso “Prof. Pardal”, pelas invenções que nos facilitaram alguns procedimentos e pela dosagem do sódio e potássio das amostras de urina. Mais recentemente, contamos com a ajuda da Lilian, a nova técnica de laboratório do Departamento, que nos auxiliou com seus serviços.

À Profa. Dra. Beatriz B. Matsubara e Prof. Dr. Luiz S. Matsubara pelo apoio, paciência e auxílio com conselhos e vivência experimental, clínica e administrativa da Universidade, que auxiliaram a enriquecer a discussão da presente dissertação. À Profa. Dra. Meliza Goi Roscani que realizou os ecocardiogramas e nos auxiliou no entendimento dos mesmos.

Aos funcionários da seção de Pós-Graduação que nos auxiliaram nos esclarecimentos de dúvidas, preenchimentos de formulários, entre outros entraves burocráticos.

Aos órgãos de fomento CAPES e FAPESP pelos insumos, e em especial à CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

Sumário

RESUMO	5
ABSTRACT	7
1. Introdução	
1.1. <i>Insuficiência aórtica como sobrecarga de volume</i>	9
1.2. <i>Comportamento de ingestão de sódio e água</i>	11
1.3. <i>Receptores cardíacos de volume e ingestão de sódio</i>	13
2. Objetivos	17
3. Materiais e métodos	
3.1. <i>Animais</i>	18
3.2. <i>Indução da Insuficiência aórtica – IAo</i>	18
3.3. <i>Exame ecocardiográfico</i>	19
3.4. <i>Ingestão de água e de NaCl 0,3M e excreção</i>	20
3.5. <i>Tratamento combinando Furo/Cap - depleção aguda de líquidos</i>	20
3.6. <i>Determinação da expressão para a proteína c-fos</i>	21
3.7. <i>Análise dos resultados</i>	22
4. Resultados	
4.1. Situação Subcrônica - Quatro semanas após a indução da IAo4	
4.1.1. <i>Alterações morfofuncionais do coração</i>	23
4.1.2. <i>Comportamento de ingestão e excreção</i>	25
4.1.3. <i>Expressão para proteína c-fos - IAo4</i>	29
4.2. Situação crônica - Oito semanas após a indução da IAo8	
4.2.1. <i>Alterações morfofuncionais do coração</i>	31
4.2.2. <i>Comportamento de ingestão e excreção</i>	33
4.2.3. <i>Expressão para proteína c-fos - IAo8</i>	37
5. Discussão	39
6. Conclusão	45
7. Referências Bibliográficas	46
ANEXO 1	53

RESUMO

A insuficiência aórtica (IAo) é uma patologia que cursa com sobrecarga cardíaca de volume e consequente hipertrofia tipo excêntrica. As principais causas são febre reumática e forma degenerativa senil. O paciente com IAo se mantém assintomático por décadas e quando há falha nos mecanismos compensatórios, ocorre aparecimento de disfunção sistólica e sintomas. Vários fatores neurohumorais contribuem no desenvolvimento da IAo, entre eles o sistema renina-angiotensina II-aldosterona, o principal sistema envolvido no controle da ingestão de água e sódio. Contudo, o comportamento de ingestão de água e sódio, bem como as vias centrais relacionadas a este comportamento, ainda não foram explorados na IAo. Os objetivos da presente dissertação foram verificar em ratos submetidos a IAo subcrônica (4 semanas; IAo4), e crônica (8 semanas; IAo8), a: a) ingestão de água e NaCl 0.3M diárias; b) ingestão de água e NaCl 0.3M após o tratamento combinando Furosemida (Furo, 10mg/kg pc) associado a baixa dose do inibidor da enzima conversora da angiotensina II, captopril (Cap, 5 mg/kg pc); e c) possível alteração da expressão para a proteína *c-fos* em estruturas prosencefálicas, pontinas e bulbares após o tratamento combinando Furo/Cap. Para tanto foram utilizados dois grupos de ratos Wistar (280 - 300g) submetidos à IAo ou controle. A cirurgia da indução de IAo foi realizada através da punção retrógrada dos folhetos valvares. Exames de ecocardiogramas (ECO) foram realizados 4 (IAo4) e 8 (IAo8) semanas após a cirurgia para IAo. Durante este período a ingestão de água e NaCl 0,3M foi acompanhada doravante. Dois dias após os ECOs os animais receberam o tratamento Furo/Cap para a quantificação do volume ingerido. Quatro dias após os animais foram novamente submetidos ao tratamento Furo/Cap para a coleta dos encéfalos segundo os procedimentos para imunistoquímica. Como resultados, tanto para a IAo4 como para IAo8, o ECO

revelou diminuição na fração de ejeção (IAo4: $50,7 \pm 2,8$ vs. controle: $61,7 \pm 1,9$ %, $P < 0,001$; IAo8: $48,8 \pm 2,0$ vs. controle: $57,7 \pm 1,9$ %, $P < 0,01$). IAo4 aumentou a ingestão de NaCl 0.3M ($8,1 \pm 1,3$ vs. controle: $4,1 \pm 1,6$ ml/2 h, $P = 0,04$), e a IAo8 aumentou a ingestão de NaCl 0.3M ($9,9 \pm 1,1$ vs. controle: $4,8 \pm 0,8$ ml/2 h, $P = 0,04$) e água ($14,8 \pm 1,1$ vs. controle: $11,0 \pm 1,5$ ml/2 h, $P = 0,04$), após tratamento combinando Furo/Cap. A ingestão diária de água e NaCl 0,3M não foram modificadas em nenhum dos grupos estudados. Na IAo4 houve redução do número de células *c-fos* positivas no órgão subfornical (OSF: $12,5 \pm 0,7$ vs controle: $44,5 \pm 13,0$ células *c-fos* positivas/secção $\text{mm}^2 \cdot 10^{-5}$), enquanto que na IAo8 houve redução no número destas células no órgão vascular da lâmina terminalis e amígdala (OVLT: $2,3 \pm 0,4$ vs controle: $25,5 \pm 4,5$; AMG: $0,8 \pm 0,2$ vs controle: $1,8 \pm 0,3$ células *c-fos* positivas/secção $\text{mm}^2 \cdot 10^{-5}$, respectivamente). Nossos dados sugerem que a progressão da IAo, de subcrônica para crônica determina disfunção sistólica e aumenta a ingestão de líquidos frente uma depleção aguda. Em adição, altera a expressão da proteína *c-fos* induzida pela depleção aguda em importantes áreas prosencefálicas, OVLT, OSF e AMG, envolvidas na regulação da ingestão de água e sódio.

Palavras chave: insuficiência aórtica, sobrecarga cardíaca, ingestão de sódio, excreção de sódio, proteína *c-fos*, receptores cardíacos de volume

ABSTRACT

Aortic regurgitation (AR) is a condition that courses with volume overload and excentric hypertrophy. Main causes are rheumatic fever and degenerative vascular disease. Patients remain asymptomatic for decades and only when there is failure of compensatory mechanisms, systolic dysfunction and symptoms appear. Several neurohural factors contribute to the development of AR, among them the renin-angiotensin-aldosterone system, the main system involved in the control of sodium and water intake. However, water and sodium intake, as well as the central pathways related to this behavior, were not yet explored in AR model. The aims of the present dissertation were to verify in rats following a sub chronic (4 weeks; AR4), and chronic (8 weeks; AR8): a) the daily water and 0.3M NaCl intake; b) the water and 0.3M NaCl intake after the combined treatment of Furosemide (Furo, 10mg/kg bw) associated to low dose of the inhibitor of the enzyme conversor of the angiotensin II, captopril (Cap, 5 mg/kg bw); and c) the possible alteration of c-fos protein expression in fore- and hindbrain structures by following Furo/Cap treatment. We used two groups of Wistar rats (280 - 300g) submitted to AR or sham. AR procedure was shaped by retrograde puncture of the aortic valve leaflets. Transthoracic echocardiograms (ECO) were performed in AR4 and AR8 weeks after surgery. During this period of time, daily water and 0.3M NaCl intake were measured. Two days after the ECO the animals received the combined treatment of Furo/Cap for the quantification of the volume intake. Four days later, the animals were again submitted to Furo/Cap treatment to collect the brains to imunohistochemical procedures. As results, either for AR4 and AR8, the ECO revealed decrease in fractioned shortened (AR4: 50.7 ± 2.8 vs. sham: $61.7 \pm 1.9\%$, $P < 0.001$; AR8: 48.8 ± 2.0 vs. sham: $57.7 \pm 1.9\%$, $P < 0.01$). AR4 produced an increase in 0.3M NaCl intake (8.1 ± 1.3 vs. sham: 4.1 ± 1.6 ml/2 h, $P =$

0.04), and AR8 increased 0.3M NaCl (9.9 ± 1.1 vs. control: 4.8 ± 0.8 ml/2 h, $P = 0.04$) and water intake (14.8 ± 1.1 vs. control: 11.0 ± 1.5 ml/2 h, $P = 0.04$), induced by Furo/Cap treatment. C-fos protein cell levels in the organ subfornical (12.5 ± 0.7 vs sham: 44.5 ± 13.0 positive cells/section $\text{mm}^2 \cdot 10^{-5}$) was reduced in AR4. While in AR8 *c-fos* levels in the organum vasculosum of lamina terminalis and amygdala (2.3 ± 0.4 vs sham: 25.5 ± 4.5 ; 0.8 ± 0.2 vs sham: 1.8 ± 0.3 positive cells/section $\text{mm}^2 \cdot 10^{-5}$, respectively) were reduced. Our data suggest that the progression of AR causes left ventricular systolic dysfunction that is increased from the sub chronic phase to the chronic of the disease and increases the amount of sodium and water intake. In addition, the progression of the sub chronic to chronic condition changes the pattern of *c-fos* protein expression in the forebrain structures involved in the fluid regulation, OVLT, SFO and AMG.

Keywords: aortic regurgitation, volume overload, sodium intake, sodium excretion, *c-fos* protein, cardiac volume receptors

1. Introdução

1.1. Insuficiência aórtica como sobrecarga de volume

A insuficiência aórtica (IAo) é uma doença valvar que cursa com sobrecarga hemodinâmica, e em resposta a essa agressão há instalação de hipertrofia miocárdica tipo excêntrica. A IAo é caracterizada pelo refluxo diastólico do sangue da aorta refluindo para o ventrículo esquerdo (VE) devido ao mal fechamento das cúspides aórticas, o que caracteriza a insuficiência. As causas da IAo mais comuns são febre reumática, degeneração senil, endocardite, anormalidades congênitas, dilatação da aorta e drogas anoréticas (BORER et al., 1998; OLSON et al., 1984; WALLER et al., 1990; TARASOUTCHI et al., 2003; VAHANIAN et al., 2011). A febre reumática é ainda um grande problema de saúde pública, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil (WHO, 2001). A faringoamigdalite e o impetigo são as infecções mais frequentes causadas pelo estreptococo beta-hemolítico do grupo A, produzindo anticorpos reativos ao tecido cardíaco (BARBOSA et al., 2009). Estes anticorpos por reação cruzada com antígenos do estreptococo se fixam à parede do endotélio valvar, favorecendo a infiltração celular principalmente por linfócitos T, gerando inflamação local, destruição tecidual e necrose (CUNNINGHAM, 2000; GUILHERME et al., 2007).

A IAo crônica cursa com coexistência de sobrecarga de volume e pressão. A sobrecarga de volume é uma consequência do próprio volume regurgitado bem como da severidade da regurgitação. Na fase inicial da doença, o VE se adapta a sobrecarga de volume devido à hipertrofia excêntrica, na qual os sarcômeros em série

e as miofibrilas são alongados (RICCI, 1982; ROSS; MCCULLAGH, 1972). A hipertrofia excêntrica preserva a complacência diastólica do VE, e a pressão de preenchimento do VE permanece normal ou levemente aumentada apesar do grande volume regurgitante (BEKEREDJIAN; GRAYBURN, 2005). A fase descompensada da doença se caracteriza por sinais de disfunção sistólica e diastólica, na ausência de fenômenos congestivos (ROSCANI, 2011). A resposta do coração a esta sobrecarga hemodinâmica tem sido bem estudada com relação ao remodelamento cardíaco, mas não sobre outros aspectos, como o comportamento de ingestão e excreção de água e sódio. Os pacientes com IAo permanecem assintomáticos por vários anos, mas quando ocorre falha dos mecanismos compensatórios, ou seja, a hipertrofia excêntrica não consegue mais manter a tensão parietal do VE, a insuficiência cardíaca (IC) se instala (BEKEREDJIAN; GRAYBURN, 2005, TARASOUTCHI et al., 2003). No Brasil, a principal causa de internação entre os pacientes com mais de 60 anos é a IC respondendo por 11,7% das internações hospitalares (ALBANESI FILHO, 2005).

A fisiopatologia da IC é extensa, e os sintomas e sinais variam de moderados a severos, sendo a descompensação a principal causa de hospitalizações. Em adição, existe uma série de comorbidades, tornando mais difícil o acompanhamento dos sintomas. A piora da função renal também é partilhada nos pacientes com IC (HAVRANEK et al., 2002, HUNT et al., 2001, STEVENSON et al., 2005), o que pode conduzir a síndrome cárdio-renal, especialmente em pacientes com histórico longo de IC e exposição crônica a altas doses de diuréticos (STEVENSON et al., 2005). Sabe-se que a excessiva ingestão de sal e líquidos são fatores importantes para deteriorar os sintomas de IC e favorecer as hospitalizações (BENNETT et al., 1998; KUEHNEMAN et al., 2002). Restrições na ingestão de sódio melhoram o estado clínico e a qualidade de vida dos pacientes com IC (BEICH; YANCY, 2008, NEILY et al., 2002).

Vários fatores neurohumorais estão ativados na IC, sendo o de maior destaque é o sistema renina-angiotensina II-aldosterona (DiBONA et al., 1995, FELDER et al., 2003, ZUCKER et al., 1995, ZUCKER, 2004). Esse sistema é o principal alvo para tratamentos medicamentosos com drogas na IC (PACKER et al., 1999, GILES, 1990, POOL, 1998). Nesta síndrome também é observado um aumento da atividade simpática (FRANCIS et al., 2001, KOPEL; LAGE, 2000, ZUCKER et al., 1995), e esse aumento parece ser modulado por receptores do tipo AT1 da angiotensina II (ANG II, ZHU et al., 2004), assim como mineralocorticóides centrais (FRANCIS et al., 2001).

Entre os modelos experimentais para indução de sobrecarga de volume temos a insuficiência mitral em cães (KATAYAMA et al., 1988), fístula aorto-cava em cães e ratos (WANG et al., 2003 ; ZUCKER et al., 1977, 1979) e IAo em ratos (ARSENAUT et al., 2002; PLANTE et al., 2003). O modelo de IAo determina um desenvolvimento de hipertrofia muito semelhante ao que ocorre clinicamente em pacientes.

1.2. Comportamento de ingestão de sódio e água

A homeostase dos líquidos corporais é crítica para a preservação da vida. A ingestão de água e cloreto de sódio, o cátion predominante nos líquidos extracelulares, é controlada pelo sistema nervoso central. Os rins colaboram na preservação de líquidos, pela reabsorção de água e sódio, porém o comportamento de ingestão é o único meio pelo qual o animal pode repor carências de água e sódio. O controle da ingestão de água e sódio é necessário para a manutenção de um volume de sangue suficiente para uma ótima perfusão tecidual pelo coração (VERBALIS, 2003).

Com relação ao apetite ao sódio é interessante destacar que este comportamento é inato para ratos, ovelhas e coelhos, e parece ser inato para mamíferos em geral. A primeira vez que um animal é exposto a uma carência de sódio, e o animal tem acesso a este íon, ele o ingere rapidamente, além de ser esse o único íon capaz de satisfazê-lo (KRIECKHAUS, 1970, LESHEM, 1998; 1999). Curiosamente, a ingestão de sódio também pode ocorrer quando o animal está repleto, neste caso uma ingestão não-regulatória (SAKAI et al., 1987; 1989). Em adição, o apetite ao sódio não decorre de hiponatremia (STRICKER; WOLF, 1966). A maioria dos modelos que induzem apetite ao sal o faz após algumas horas após o retorno da concentração de sódio plasmático aos níveis normais (FERREYRA; CHIARAVIGLIO, 1977). Assim, algum sinal fisiológico deve ser responsável por acionar o comportamento de procura e ingestão pelo íon sódio.

Dois são os principais sinais conhecidos por atuar em mecanismos cerebrais que conduzem à ingestão de sódio e água, tanto em animais quanto em humanos, a angiotensin II (ANG II) e a aldosterona (FITZSIMONS, 1998; JOHNSON; THUNHORST, 1997; SAKAI et al., 1987; WEISINGER et al., 1996; TAKAMATA et al., 1994). A ANG II circulante atua em estruturas cerebrais, especialmente nos órgãos circunventriculares (OCVs), que estão livres da barreira hematoencefálica e são altamente vascularizados (BUGGY; JOHNSON, 1978, FITZSIMONS, 1998, WEISINGER et al., 1996). Injeções centrais e periféricas do mineralocorticóide aldosterona em ratos ativam o apetite ao sódio via o núcleo central da amígdala, uma estrutura do sistema límbico (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983, GALAVERNA et al., 1991, SAKAI et al., 1996). Em ratos com IC induzida por ligação da coronária descendente, foi observado aumento da ingestão de sódio diária (FRANCIS et al., 2001). Do ponto de vista de saúde pública, ainda existe a

importância de um maior entendimento sobre os determinantes neurobiológicos da ingestão de sódio e água em situações patológicas.

1.3. Receptores cardíacos de volume e ingestão de sódio

Um aspecto interessante para o estudo das vias envolvidas com o comportamento de ingestão de água e sódio é a participação dos receptores cardiovasculares de volume, especialmente os localizados próximo ao coração e nas grandes veias, que informam o cérebro momento a momento sobre o volume de líquido circulante. Em cachorros, a distensão da veia pulmonar esquerda com a junção do átrio esquerdo reduz a ingestão de água em resposta à privação de água durante o período noturno, injeção subcutânea de isoproterenol, infusão intravenosa de NaCl hipertônico, e ingestão de água *ad libitum* sem alterar a ingestão de alimentos (MOORE-GILLON; FITZSIMONS, 1982), o que sugere a participação dos receptores cardíacos de volume modulando o comportamento de ingestão. Susan Kaufman (1984) desenvolveu um elegante método para estudar os receptores de volume cardíacos. Este método consiste no posicionamento de um pequeno balão na junção da veia cava superior com o átrio direito (JVCS-AD). A distensão deste pequeno balão estimula os receptores de baixa pressão sem interferir com o retorno venoso para o coração, devido a uma particularidade anatômica no rato, que possui uma colateral da veia jugular esquerda que desemboca na veia cava inferior (KAUFMAN, 1984).

A distensão do balão na JVCS-AD em ratos inibe a ingestão de água em resposta a diferentes tratamentos: 1) privação hídrica (24 horas), 2) ingestão de água *ad libitum* no período noturno, 3) diálise peritoneal com polietilenoglicol (um colóide hiperosmótico), e 4) tratamento com isoproterenol sc (KAUFMAN, 1984). Em adição, também foi demonstrado que a distensão do balão na JVCS-AD reduz a

ingestão de sódio após: 1) 17 horas da administração intraperitoneal de polietilenoglicol, e 2) o tratamento sc com DOCA, um análogo da aldosterona, por 8 dias consecutivos, ambos os estudos realizados em ratos previamente mantidos com dieta deficiente de sódio (TOTH et al., 1987).

Convém ressaltar que os modelos de indução da ingestão de sódio utilizados por Kaufman e cols. são protocolos que necessitam de dias para que o apetite ao sódio seja expresso. Outro artifício para desafiar os animais a ingerirem sódio, consiste do tratamento combinando o diurético furosemida (Furo) e baixas doses do inibidor da enzima conversora da ANG II, o captopril (Cap, FITTS; MASON, 1989). Este protocolo baseia-se no fato do Furo ser um diurético e natriurético, produzindo uma depleção de sódio e água, e no fato de que doses baixas do Cap bloqueiam a conversão periférica de angiotensina (ANG) I a ANG II, mas não a central, elevando assim a concentração plasmática de ANG I disponível para ser convertida em ANG II no cérebro. O tratamento combinando injeções subcutâneas de Furo (10 mg/kg de peso corporal) + Cap (5 mg/kg de peso corporal), induz uma ingestão de sódio que se inicia num curto período de tempo, uma hora após o tratamento, devido à hipotensão associada a um aumento da formação de ANG II central (FITTS; MASSON, 1989; THUNHORST; JOHNSON, 1994). O tratamento combinando Furo/Cap depende de redução na pressão arterial para aumentar a ingestão de sódio, uma vez que a injeção intravenosa do vasoconstritor fenilefrina prejudica o aumento da ingestão de sódio, mas não de água, enquanto o vasodilatador minoxidil aumenta a ingestão de sódio, o que mostra que a pressão arterial modula o comportamento de ingestão de sódio (THUNHORST; JOHNSON, 1994). A inflação do balão na JVCS-AD também reduziu a ingestão de sódio no modelo Furo/Cap (DE GOBBI et al., 2008).

O mapeamento funcional de vias neurais ativas pode ser realizado por

técnicas de imunistoquímica que permitem é a detecção do produto protéico do protooncogene (*c-fos*). A *c-fos* é um marcador de ativação neuronal em curto prazo, pois se degrada frente a uma exposição crônica. As principais vantagens desta técnica são: 1) o estudo de populações inteiras de neurônios em diferentes regiões cerebrais simultaneamente, 2) o experimento pode ser executado em animais acordados, e 3) a técnica pode ser combinada com outras técnicas neuroanatômicas que permitem evidenciar subpopulações de neurônios a partir de conexões anatômicas e/ou seu conteúdo neuroquímico (PRIESTLEY, 1987; HUGHES; DRAGUNOW, 1995). Alguns estudos com marcação para a expressão da proteína *c-fos* mostraram a participação dos receptores de volume após tratamentos com sobrecarga de volume (BADOER et al., 1997, RANDOLPH et al., 1998; PYNER et al., 2002), o que determina ativação não apenas dos receptores cardíacos de volume, mas de outros sistemas de detecção de volume, por exemplo, fígado e rins. Em adição a distensão balão na JVCS-AD, em ratas (DENG; KAUFMAN, 1995) e ratos (PYNER et al., 2001) exibiu aumento da expressão para proteína *c-fos* nos neurônios da porção parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico (NPV), uma estrutura associada com a regulação do volume e pressão sanguíneos.

Com relação a participação destes mecanorreceptores cardíacos de volume em situações de sobrecarga, cabe ressaltar que cães com fístula aorta-cava mostraram deformações destas terminações (ZUCKER et al., 1977, 1979). Assim, podemos postular que em uma situação de sobrecarga de volume como a IAo, os mecanorreceptores cardíacos de volume falhem em informar o encéfalo sobre o volume extracelular. Por outro lado, o SRAA está aumentado, ativando mais áreas envolvidas com a ingestão hidromineral. Isto pode colaborar para aumentar a preferência pelo sal nos animais e modificar o padrão da expressão da proteína *c-fos* após uma depleção aguda de líquidos. Em ratos saudáveis e que receberam o

tratamento combinando Furo/Cap, a expressão da proteína *c-fos* foi aumentada no órgão vascular da lâmina terminalis (OVLT) e órgão subfornical (OSF), estruturas conhecidas pelas ações da ANG II e envolvidas no comportamento de ingestão, bem como o NPV (THUNHORST et al., 1998). Este mesmo tratamento combinando Furo/Cap foi utilizado em ratos saudáveis que sofreram a inflação do balão na JVCS-AD. Como resultados, ocorreram diminuição da expressão da proteína *c-fos* no OVLT e OSF, e aumento da proteína *c-fos* no núcleo parabraquial lateral uma estrutura pontina relacionada à inibição da ingestão de sódio (DE GOBBI et al., 2008).

A pesquisa de vias centrais envolvidas em uma situação de IAo ainda não foi explorada, alguns estudos focaram estas vias em outras situações de sobrecarga de volume ao coração. Assim, torna-se interessante entender melhor o papel da IAo sobre o comportamento de ingestão e excreção de água e sódio, bem como, qual o padrão da expressão para a proteína *c-fos* em diferentes núcleos cerebrais.

2. OBJETIVOS

Portanto, considerando os pontos apresentados, os objetivos da presente dissertação foram verificar em ratos submetidos a IAo4 e IAo8 a:

- (a) ingestão de água e NaCl 0.3M diárias;
- (b) ingestão de água e NaCl 0.3M após o tratamento combinando Furo/Cap;
- (c) possível alteração da expressão da proteína c-fos em estruturas prosencefálicas, pontinas e bulbares após o tratamento combinando Furo/Cap;
- (d) avaliar a presença de remodelação miocárdica na IAo subcrônica e crônica.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos fornecidos pelo Biotério Central do Campus de Botucatu. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em ambiente com temperatura controlada ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro (12-12 h). Ração e água foram ofertadas *ad libitum*. Toda a metodologia seguiu normas da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (CEEA-protocolo 141/09) local.

3.2. Indução da Insuficiência aórtica – IAo

O modelo de regurgitação aórtica foi realizado através de uma modificação da técnica descrita por Arsenault e colaboradores (ARSENAULT et al., 2002). Inicialmente, sob anestesia com cloridrato de cetamina (200 mg/kg, Dopalen®, Vetbrands) associada a cloridrato de xilazina (100 mg/kg, Anasedan®, Vetbrands), a artéria carótida comum direita foi dissecada e canulada com cateteres de polietileno (0,05mm de diâmetro), preenchidos com solução fisiológica heparinizada. Um fio guia de aço (próprio do cateter de anestesia epidural -0,34mm) foi introduzido através do cateter carotídeo de modo a lesar a valva aórtica com várias perfurações e o processo foi finalizado quando não houve mais resistência com as perfurações. O grupo de cirurgia fictícia foi constituído de animais submetidos aos mesmos procedimentos, porém sem as perfurações da valva aórtica. A presença e quantificação da gravidade da insuficiência aórtica foram confirmadas por ecocardiogramas. Os ecocardiogramas foram realizados na 1ª semana para confirmação, na 4ª e 8ª para coleta de dados morfofuncionais.

3.3. Exame ecocardiográfico

O estudo in vivo dos animais foi efetuado por meio de Doppler-ecocardiografia transtorácica convencional. O equipamento utilizado foi o Phillips (TDI 5500) dotado de transdutor eletrônico setorial multifrequencial (7,5 a 12 MHz), seguindo-se a padronização descrita na literatura (SANH et al., 1978).

Animais controles ou com insuficiência aórtica foram anestesiados com cloridrato de cetamina (50mg/kg, Dopalen®, Vetbrands) associada a cloridrato de xilazina (1mg/kg, Dopalen®, Vetbrands) por via intraperitoneal. Após tricotomia da região anterior do tórax, os ratos foram posicionados em decúbito dorsal, em suporte próprio de madeira para permitir discreto decúbito lateral esquerdo. Os exames foram efetuados por um único examinador. Foram analisadas imagens monodimensionais obtidas com o feixe de ultra-som orientado pela imagem bidimensional, obtida com o transdutor na posição para-esternal eixo menor. A imagem da cavidade ventricular esquerda foi obtida posicionando o cursor do modo-M logo abaixo do plano da valva mitral entre os músculos papilares. As medidas, em milímetros, do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE), diâmetro sistólico do ventrículo esquerdo (DSVE), espessura da parede posterior (PP), diâmetro do átrio esquerdo (AE) e diâmetro da aorta (AO) foram realizadas diretamente no monitor, por meio do cursor do próprio equipamento, durante o exame. Três a cinco ciclos consecutivos foram utilizados para a realização das medidas, utilizando-se a média aritmética dessas medidas. A regurgitação aórtica foi considerada significativa quando, no mapeamento de fluxo a cores, observava-se fluxo retrógrado e holodiastólico na porção proximal da aorta descendente e o jato regurgitante ocupava mais de 50% do diâmetro da via de saída do VE (PLANTE et al., 2008). Os exames de ecocardiografia foram conduzidos por uma médica experiente nas análises e acompanhados pela mestranda.

3.4. Ingestão de água e de NaCl 0,3M e excreção

A ingestão de água e de NaCl 0,3M foi medida diariamente pelo período de 24 horas, utilizando-se tubos graduados com divisão de 1 ml fixados à frente das gaiolas. O volume urinário também foi monitorado a cada 24 horas. Durante os testes o volume ingerido de água e NaCl 0,3M foi monitorado em intervalos de 30 minutos por duas horas após as injeções subcutâneas. Nestes experimentos foram utilizados tubos graduados com divisão de 0,1 ml fixados à frente das gaiolas. Durante o período de experimentos, os ratos não tiveram acesso à ração. Quatro dias antes do término das observações, tanto para IAo4 quanto IAo8, amostras de urina foram coletadas para análise do sódio e potássio excretado durante o período noturno. Para tanto, as gaiolas foram lavadas, e foi oferecido apenas água aos animais, entre o período das 17:30h às 8:00h da manhã seguinte, quando o volume urinário foi anotado e amostras de urina guardadas para quantificação. As amostras de urina foram analisadas em fotômetro de chama (Digmed modelo NK2000) e quantificadas em microequivalentes (μEq) que foram multiplicados pelo volume urinário excretado.

3.5. Tratamento combinando Furo/Cap - depleção aguda de líquidos

A ingestão de água e NaCl 0,3M foi induzida pelo tratamento combinando furosemida (Furo, 10 mg/kg) associado à baixas doses do inibidor da enzima conversora da angiotensina, o captopril (Cap, 5 mg/kg). Este tratamento de Furo/Cap induz uma ingestão de sódio em um curto período de tempo devido à hipotensão associada a maior formação de ANG II no sistema nervoso central (FITTS; MASSON, 1989; THUNHORST; JOHNSON, 1994). Imediatamente após o tratamento combinando Furo/Cap, os ratos foram mantidos sem ração, água ou NaCl 0,3M por uma hora. O volume urinário excretado neste período foi medido, e uma amostra da urina guardada. Após esse período, foi oferecida água e solução de NaCl

0,3M aos ratos em buretas graduadas (0,1ml de divisões) para registro da ingestão a cada 30 min durante 2 horas. Novamente, o volume urinário excretado foi medido, e uma nova amostra da urina guardada. As amostras de urina foram analisadas em fotômetro de chama, conforme exposto acima.

3.6. Determinação da expressão para a proteína *c-fos*

Um grupo de ratos para cada uma das semanas de experimentação (4^a e 8^a semanas após regurgitação aórtica) foi submetido ao tratamento combinando Furo/Cap e após um período de duas horas sem acesso à água ou NaCl 0.3M, os animais foram sacrificados, sendo profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (50-75 mg/rato) e perfundidos transcardiacamente com salina em tampão fosfato 0,1 M (PBS - pH = 7,4, ~ 200 ml), seguida de perfusão com paraformaldeído (PFA) 4% ~ 200 ml. Os encéfalos foram removidos e mantidos numa solução de PFA 4% por 4 h em geladeira e a seguir em uma solução de sacarose 30% (diluída em PBS) por ~ 12 h na temperatura ambiente sob agitação. Em seguida os encéfalos foram seccionados transversalmente (30 µm de espessura) pelo auxílio de um micrótomo de congelamento, selecionando-se os cortes que apresentaram estruturas prosencefálicas (órgão vasculoso da lâmina terminalis = OVLT, órgão subformical = OSF, NSO, NPV), pontinas (NPBL) e do tronco cerebral (AP, NTSm).

Os cortes obtidos foram lavados com uma solução de metanol, peróxido de hidrogênio e PBS 0,01M (pH = 7,4) para bloqueio das peroxidases teciduais; lavados (três vezes/5 min) com PBS 0,01M e transportados para uma solução contendo o soro bloqueador (Vector Laboratories), e o anticorpo para proteína *c-fos* (Santa Cruz Biotechnology) numa proporção de 1:4000, permanecendo sob agitação (22 horas na temperatura ambiente). Os cortes serão então lavados (três vezes/5 min) com PBS 0,01M e transferidos para outra solução contendo soro bloqueador, e o anticorpo

secundário anti-coelho biotilado (Vector Laboratories) numa proporção de 1:200 pelo período de uma hora. Novamente, os cortes foram lavados (três vezes/5 min) com PBS 0,01M e transferidos para o complexo de solução avidina-biotina peroxidase (Vectastain Elite – ABC Kit, Vector Laboratories), pelo período de mais uma hora. A seguir os cortes foram novamente lavados (três vezes/5 min) e submetidos à reação de revelação da proteína *c-fos* com diaminobenzidina (DAB) dissolvida em PBS 0,01M com peróxido de hidrogênio 3%, marcando o núcleo celular de marrom. Os cortes foram montados em lâminas e deixados para secar por 12 h, quando foram desidratados e cobertos com lamínulas para análise ao microscópio.

→ *Contagem das células c-fos positivas*

As células expressando núcleo *c-fos* positivo foram contadas à mão. Com auxílio do uso de um sistema para captação de imagens (Nikon) foram obtidas fotos das áreas cerebrais analisadas. Usando-se um sistema de análise de imagens (Image J – NIH – National Institute of Health) as regiões contadas e fotografadas foram delineadas pelo auxílio do programa e a área dessas regiões expressa em mm^2 . Após esta conversão o número de células *c-fos* positivas foram divididas pela área correspondente aquela região. Os resultados estão expressos como número de células *c-fos* positivas por mm^2 .

3.7. Análise dos resultados

Os resultados individuais de cada animal foram organizados em planilhas utilizando-se o programa Excel (Microsoft Cooperation), para cálculo da média e o erro padrão da média que foram apresentados em gráficos, utilizando-se o programa Sigma Plot, ou tabelas. Análise de variância uma via (ANOVA) e teste-t foram usados para comparações. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Situação Subcrônica - Quatro semanas após a indução da IAo4

4.1.1. Alterações morfofuncionais do coração

Os resultados mostraram que uma sobrecarga de volume subcrônica, 4 semanas após a indução da IAo, determinou modificações morfofuncionais do VE, tabela 1. Algumas das alterações mais expressivas na morfometria do VE estão destacadas na figura 1: aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE, mm), diâmetro sistólico do átrio esquerdo normalizado para o diâmetro diastólico da válvula aorta (AE/Ao), índice de esfericidade e fração de encurtamento na situação de IAo4.

Tabela 1. Variáveis morfofuncionais cardíacas e de função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (VE) obtidos por meio de ecocardiografia com Doppler colorido e cursor em Modo-M para os grupos IAo4 e controle.

<i>Variáveis ECO</i>	<i>IAo(4)</i>	<i>controle</i>
DSVE (mm)	4,2 ± 0,3 *	2,7 ± 0,2
2PP/DDVE (mm)	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,03
AAE/AAD	1,4 ± 0,1	1,2 ± 0,1
VAomáx (cm/s)	134,56 ± 7,1*	105,87 ± 6,4
VAo/VTI (cm)	7,9 ± 0,5*	6,0 ± 0,4
DC (ml/min)	124,9 ± 10,0*	90,5 ± 9,8
E (cm/s)	85,0 ± 3,0	87,0 ± 6,0
A (cm/s)	68,8 ± 5,5	61,6 ± 8,4
E / A	1,30 ± 0,11	1,50 ± 0,10
Peso (g)	374 ± 8	388 ± 12
FC (bpm)	303 ± 20	295 ± 11

DSVE = diâmetro sistólico do VE ($p < 0,01$); 2PP/DDVE = espessura relativa da parede posterior do VE ($p = 0,36$); AAE/AAD = área do átrio esquerdo normalizada pela área do átrio direito ($p = 0,73$); VAomáx (cm/s) = velocidade máxima do sangue ao passar pela válvula aorta ($p < 0,01$); VAo/VTI (cm) = velocidade máxima do sangue normalizado pela área sobre a curva que o sangue ocupa ao passar pela válvula aorta ($p = 0,01$); DC (ml/min) = débito cardíaco ($p = 0,03$), volume de sangue que passar pelo coração em um minuto; E e A = velocidade das ondas de enchimento E (passivo) e A (ativo) do fluxo transmitral ($p = 0,75$, $p = 0,47$); peso corporal em gramas ($p = 0,33$); FC (bpm) = frequência cardíaca em batimentos por minuto ($p = 1,00$). Os dados estão expressos como média ± EPM. Comparações entre os grupos foram feitas através do teste-t. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$.

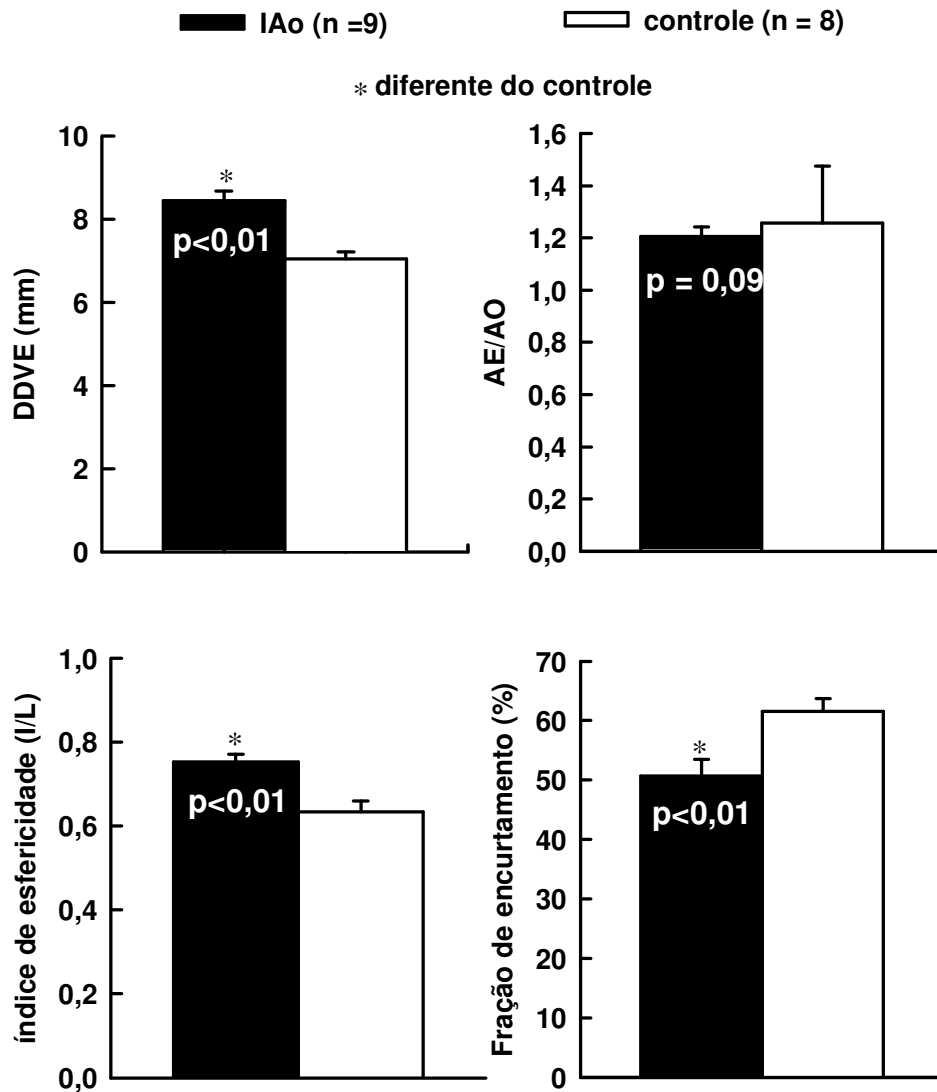


Figura 1. Variáveis morfofuncionais de função sistólica e diastólica do VE obtidos por meio de ecocardiografia com Doppler colorido e cursor em Modo-M para os grupos IAo4 e controle. DDVE (mm) = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ($p < 0,01$); AE/Ao = diâmetro sistólico do átrio esquerdo no modo M normalizado para o diâmetro diastólico da aorta ($p = 0,09$); índice de esfericidade (I/L) = normalização do comprimento do eixo menor do VE pelo comprimento do eixo maior do VE ($p < 0,01$); e a fração de encurtamento (%) = porcentagem de encurtamento do VE, dado pela diferença entre o DDVE e o DSVE ($p < 0,01$). Os dados estão expressos como média \pm EPM. Comparações entre os dois grupos foram feitas através do teste-t.

4.1.2. Comportamento de ingestão e excreção

O tratamento combinando Furo/Cap em ratos com IAo4 aumentou a ingestão de NaCl 0,3M ($8,1 \pm 1,3$ vs controle: $4,2 \pm 1,6$ ml/2h), e não modificou a ingestão de água ($14,7 \pm 2,0$ vs controle: $12,1 \pm 1,5$ ml/2h). A figura 2 representa a ingestão cumulativa de líquidos, sendo que a diferença para a ingestão de NaCl 0,3M ocorre aos 60 minutos de observação, $F_{(1,15)} = 2,34$; $p < 0,05$, $p = 0,04$. O volume de líquidos total ingerido foi maior no grupo IAo4 em relação ao controle, $F_{(1,15)} = 4,92$; $p < 0,05$, $p = 0,04$. A análise das amostras de urina colhidas durante o tratamento Furo/Cap não foram diferentes para a diurese, natriurese ou caliurese, figura 3. Em contrapartida, a tabela 2 mostra redução da excreção de sódio nestes animais durante o período noturno, sem o efeito de nenhum tratamento, sem modificações na diurese ou caliurese. A ingestão diária de NaCl 0,3 M e água, bem como o volume urinário, não foram alterados em animais com IAo subcrônica, figura 4.

Tabela 2. Medida do volume, sódio e potássio urinários em animais dos grupos controle e IAo4 durante o período noturno, sem qualquer tratamento.

<i>Grupos</i>	<i>Volume urinário</i>	<i>mEq Na⁺</i>	<i>mEq K⁺</i>
<i>IAo4</i>	16.0 ± 2.2	$136 \pm 27^*$	106.8 ± 19.5
<i>Controle</i>	19.0 ± 2.1	283 ± 86	208.7 ± 54.5

n = 6. Teste-t foi utilizado para comparações. *diferente do controle. $P < 0,05$.

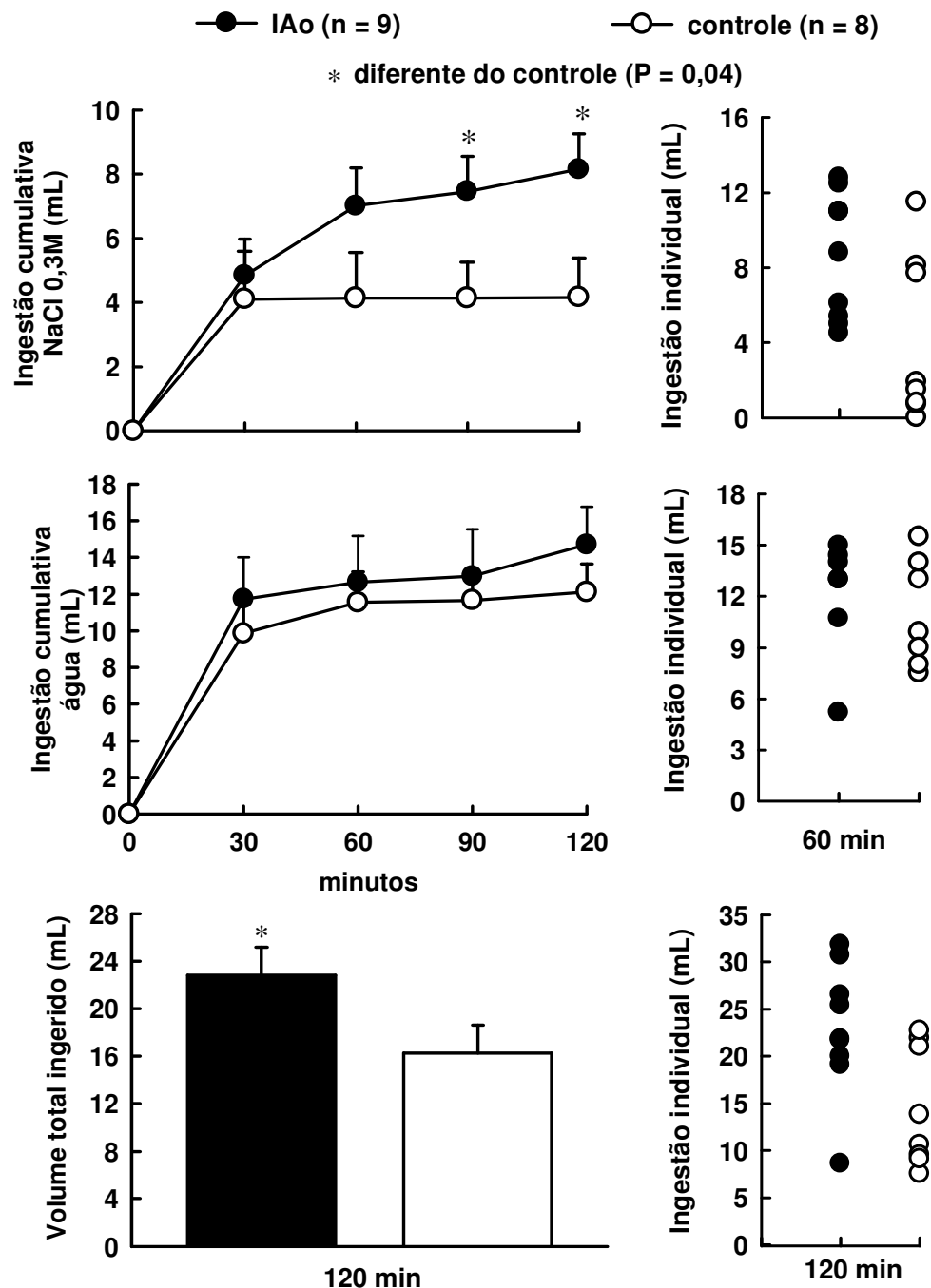


Figura 2. Ingestão cumulativa (esquerda) e ingestão individual (direita) de NaCl 0,3 M e água em animais com IAo4 ou controle que receberam tratamento combinando Furo/Cap. O gráfico em barras (abaixo) mostra o volume total ingerido, somatória da ingestão de NaCl 0,3 M e água, ao final das 2 horas de observação. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Análise de variância uma via mostrou diferença significativa entre os grupos $F_{(1,15)} = 4,92$; $p < 0,05$, $p = 0,04$.

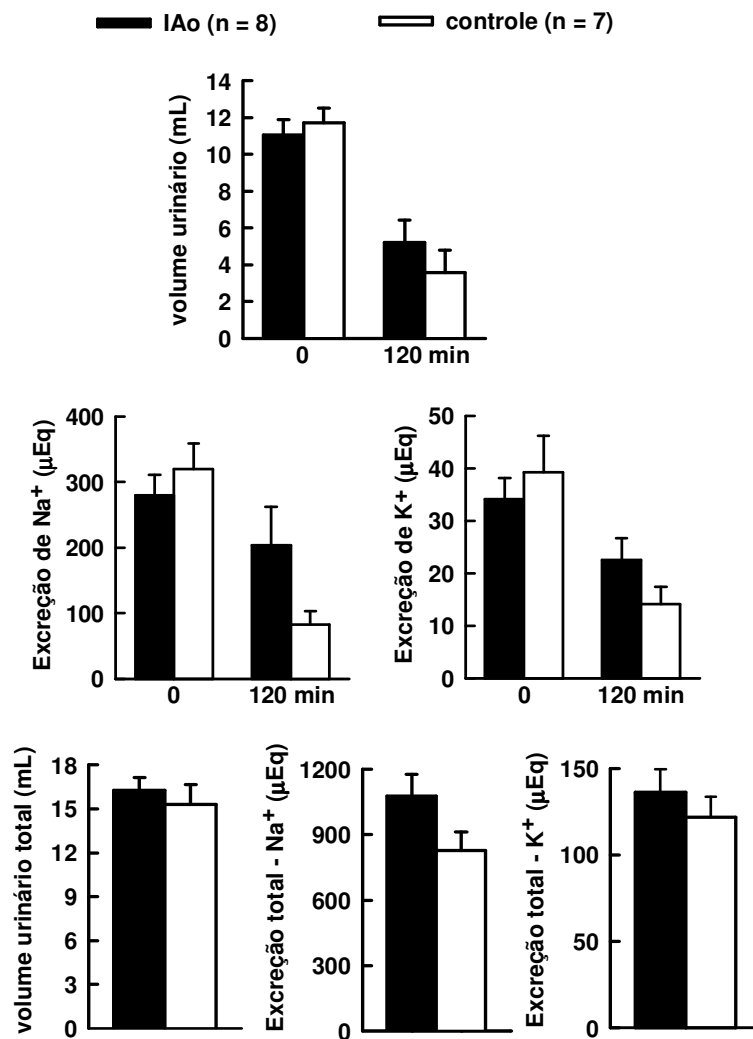


Figura 3. Diurese (acima), natriurese (esquerda) e kaliurese (direita) em animais IAo4 subcrônica ou controle que receberam o tratamento combinando Furo/Cap, ao início da ingestão de líquidos (0 min) e ao término (120 min). Os gráficos abaixo mostram a somatória do volume excretado, natriurese e kaliurese dos animais. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Análise de variância uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos para nenhuma das variáveis.

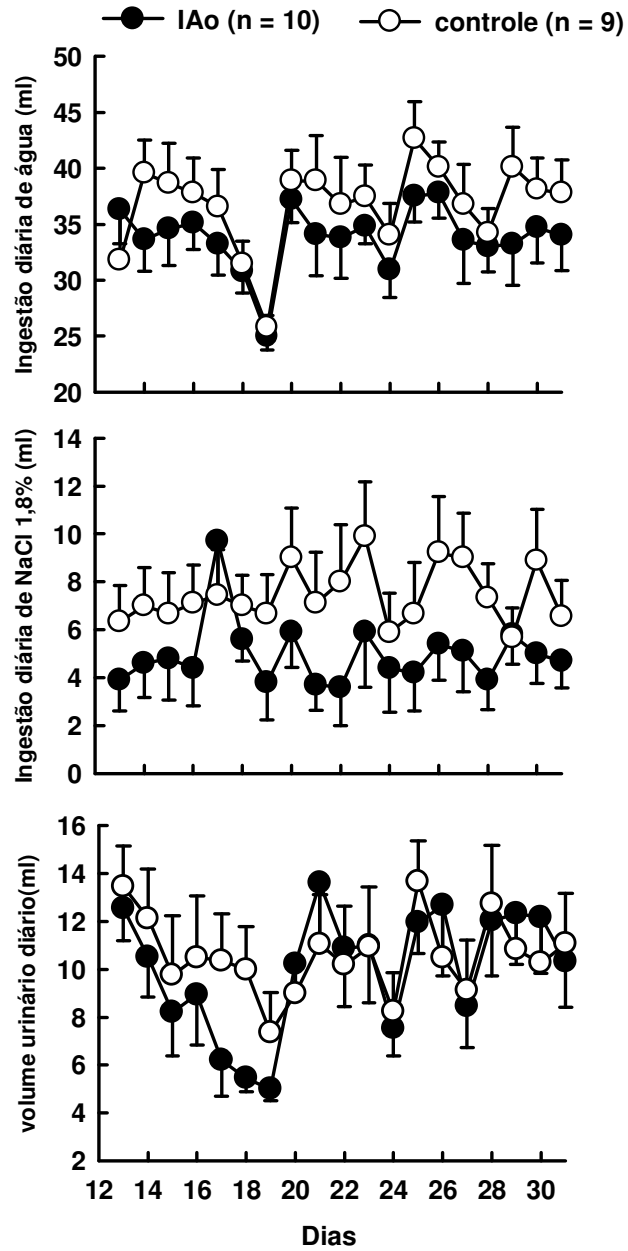


Figura 4. Ingestão diária de água (acima) e NaCl 0,3M (meio) e volume urinário em 24 h (abaixo) pelo período de 3 semanas em animais com IAO4 ou controle. Os dados estão expressos como média \pm EPM.

4.1.3. Expressão para proteína *c-fos* - IAo4

Na tabela 3 temos os pesos dos corações dos animais que sofreram a IAo4 e foram sacrificados para a retirada dos encéfalos de acordo com os procedimentos para imunistoquímica. Como pode ser observado não houve diferença entre o peso corporal dos grupos, porém houve aumento do peso dos corações nos ratos IAo4. A contagem das células *c-fos* positivas revelou diminuição da expressão para a proteína *c-fos* no OSF, tabela 4. A figura 5 mostra a marcação da expressão *c-fos* em um animal representativo do grupo IAo4 e o controle.

Tabela 3. Peso corporal e peso do coração dos animais dos grupos controle e com 8 semanas após a indução da IAo4 ao término dos experimentos.

<i>Relação peso / coração</i>	<i>IAo4</i>	<i>controle</i>
Peso corporal (g)	384 ± 26	388 ± 11
Peso coração (g)	2.1 ± 0.30*	1.6 ± 0.02
Peso coração / 100 g de pc	0.53 ± 0.03*	0.41 ± 0.01

n = 6. Teste-t foi utilizado para comparações. *diferente do controle. P < 0,05.

Tabela 4. Células *c-fos* positivas/secção em mm²x10⁻⁵ nas áreas analisadas, e o valor estatístico para cada comparação.

<i>áreas</i>	<i>IAo4</i>	<i>controle</i>	<i>p</i>
OVLТ	19.3 ± 5.7	21.9 ± 4.1	0,72
MnOP	1.4 ± 0.7	1.9 ± 0.9	0,69
OSF	12.5 ± 0.7*	44.5 ± 13.0	0,05
NSO	16.8 ± 7.5	7.8 ± 0.6	0,30
NPV	4.1 ± 1.6	10.2 ± 2.5	0,10
AMG	7.0 ± 2.4	5.1 ± 0.8	0,49
NPBL	4.0 ± 0.8	9.4 ± 6.7	0,46
mNTS	9.2 ± 4.2	14.9 ± 0.8	0,40
AP	4.8 ± 1.2	7.8 ± 1.4	0,17

OVLТ = órgão vascular da lâmina terminalis, MnPo = núcleo pré-óptico medial, OSF = órgão subforminal, NOS = núcleo supra-óptico, NPV = núcleo paraventricular do hipotálamo, AMG = amígdala, NPBL = núcleo parabraquial lateral, mNTS = núcleo do trato solitário medial e AP = área postrema; n = 3. Os dados estão corrigidos 10⁻⁵ e expressos como média ± EPM. Comparações entre os grupos foram feitas através do teste-t. * diferença significativa em relação ao controle, p < 0,05.

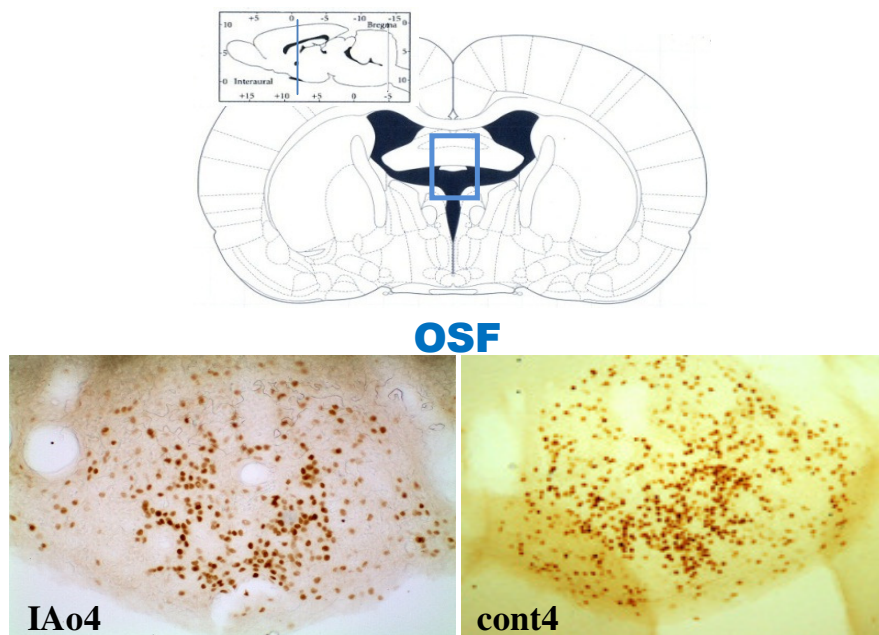


Figura 5. Esquema representativo do OSF segundo *The Rat Brain: in Stereotaxic Coordinates, 2nd Edition* by George Paxinos & Charles Watson, -0,84 mm do Bregma. Foto representativa de um animal IAo4 –esquerda- e cont4 –direita- mostrando a marcação da expressão para a proteína *c-fos*. O aumento utilizado foi de 20x.

4.2. Situação crônica - Oito semanas após a indução da IAo8

4.2.1. Alterações morfofuncionais do coração

Os resultados da tabela 5 mostram modificações morfofuncionais do VE. A figura 6 ressalta as principais alterações dos exames morfofuncionais: aumento do diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo (DDVE, mm), diâmetro sistólico do átrio normalizado para o diâmetro diastólico da válvula aorta (AE/Ao), índice de esfericidade e diminuição na fração de encurtamento na situação de IAo8, todos estes parâmetros indicando disfunção sistólica do VE, com indícios de falência cardíaca.

Tabela 5. Variáveis morfofuncionais cardíacas e de função sistólica e diastólica do ventrículo esquerdo (VE) obtidos por meio de ecocardiografia com Doppler colorido e cursor em Modo-M para os grupos IAo8 e controle.

<i>Variáveis ECO</i>	<i>IAo8</i>	<i>controle</i>
DSVE (mm)	4,8 ± 0,3*	2,9 ± 0,2
2PP/DDVE (mm)	0,33 ± 0,02	0,38 ± 0,01
AAE/AAD	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
VAomáx (cm/s)	137 ± 8*	99 ± 4
VAo/VTI (cm)	9,6 ± 0,7*	6,5 ± 0,3
DC (ml/min)	124,1 ± 12,0*	74,9 ± 5,3
E (cm/s)	81,7 ± 11	83 ± 5,3
A (cm/s)	65,5 ± 7,3	53,7 ± 4,9
E / A	1,36 ± 0,16*	1,60 ± 0,11
Peso (g)	429,2 ± 15,9	448,2 ± 18
FC (bpm)	218 ± 13	245 ± 10

DSVE = diâmetro sistólico do VE ($p < 0,01$); 2PP/DDVE = espessura relativa da parede posterior do VE ($p = 0,07$); AAE/AAD = área do átrio esquerdo normalizada pela área do átrio direito ($p = 0,12$); VAomáx (cm/s) = velocidade máxima do sangue ao passar pela válvula aorta ($p < 0,01$); VAo/VTI (cm) = velocidade máxima do sangue normalizado pela área sobre a curva que o sangue ocupa ao passar pela válvula aorta ($p < 0,01$); DC (ml/min) = débito cardíaco, volume de sangue que passa pelo coração em um minuto ($p < 0,01$); E e A = velocidade das ondas de enchimento E (passivo) e A (ativo) do fluxo transmitral ($p = 0,93$, $p = 0,22$); peso corporal em gramas ($p = 0,43$); FC (bpm) = frequência cardíaca em batimentos por minuto ($p = 0,12$). Os dados estão expressos como média ± EPM. Comparações entre os grupos foram feitas através do teste-t. * diferença significativa em relação ao controle, $p < 0,05$.

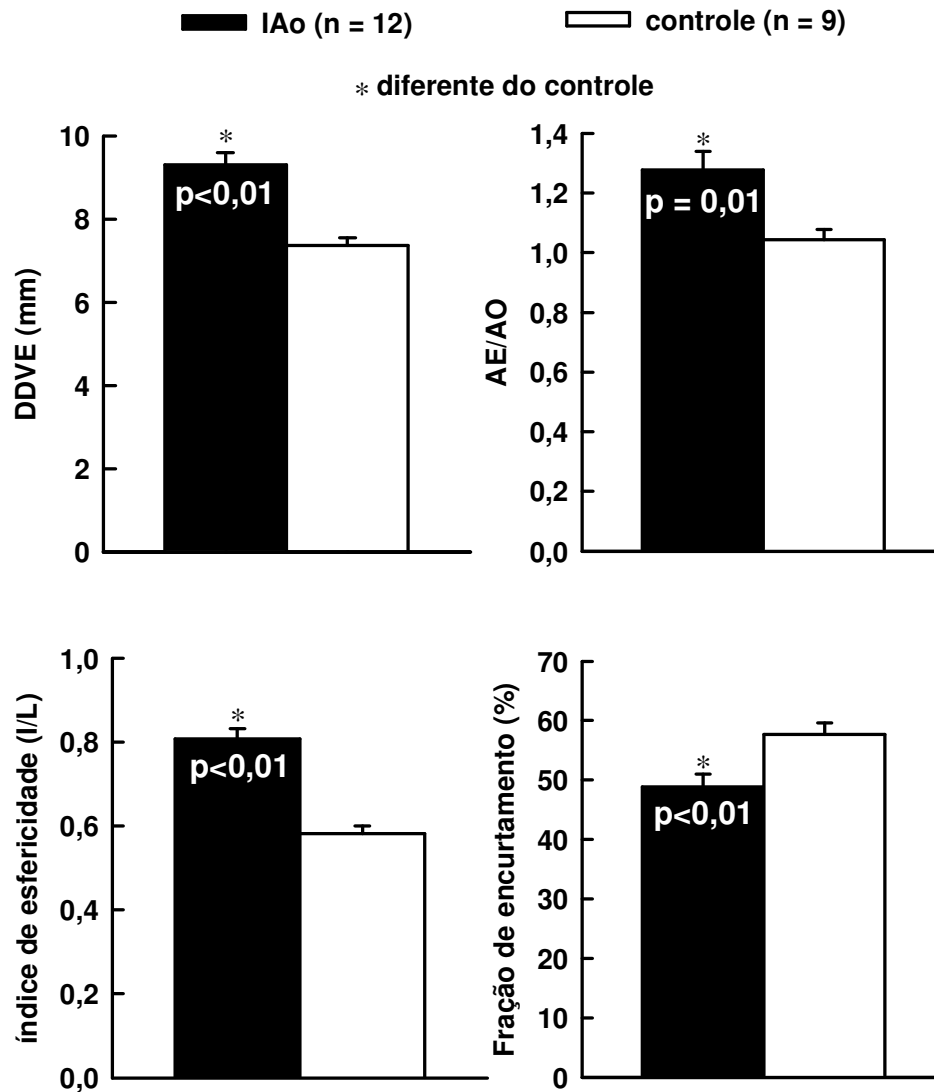


Figura 6. Variáveis morfofuncionais de função sistólica e diastólica do VE obtidos por meio de ecocardiografia com Doppler colorido e cursor em Modo-M para os grupos IAo8 e controle. DDVE (mm) = diâmetro diastólico do ventrículo esquerdo ($p < 0,01$); AE/Ao = diâmetro sistólico do átrio esquerdo no modo M normalizado para o diâmetro diastólico da aorta ($p = 0,09$); índice de esfericidade (I/L) = normalização do comprimento do eixo menor do VE pelo comprimento do eixo maior do VE ($p < 0,01$); e a fração de encurtamento (%) = porcentagem de encurtamento do VE, dado pela diferença entre o DDVE e o DSVE ($p < 0,01$). Os dados estão expressos como média \pm EPM. Comparações entre os dois grupos foram feitas através do teste-t.

4.2.2. Comportamento de ingestão e excreção

O teste de depleção aguda de líquidos, induzido pelo tratamento combinando Furo/Cap, em ratos IAo8 aumentou a ingestão de NaCl 0,3M ($9,9 \pm 1,1$ vs controle: $4,9 \pm 0,8$ ml/2h), e de água ($14,9 \pm 1,2$ vs controle: $11,1 \pm 2,2$ ml/2h). A figura 7 representa a ingestão não cumulativa de líquidos, sendo que a diferença para a ingestão de NaCl 0,3M ocorre aos 30 minutos de observação, $F_{(1,19)} = 7,86$; $p < 0,01$, e para a água aos 60 minutos $F_{(1,19)} = 3,98$; $p < 0,05$. O volume total de líquidos ingerido foi maior no grupo IAo8 em relação ao controle, $F_{(1,19)} = 5,29$; $p < 0,05$, $p = 0,03$. A diurese, natriurese e caliurese não foram alteradas nas duas amostras de urina (tempo 0 e tempo 120 min) colhidas juntamente com o teste de depleção, figura 8. Por outro lado, a urina coletada durante o período noturno mostrou redução do sódio excretado em relação ao grupo controle, tabela 6. A ingestão diária de NaCl 0,3 M e água, bem como o volume urinário também não foram alterados em animais com IAo8, figura 9.

Tabela 6. Medida do volume, sódio e potássio urinários em animais dos grupos controle e IAo8 durante o período noturno, sem qualquer tratamento.

<i>Grupos</i>	<i>Volume urinário</i>	<i>mEq Na⁺</i>	<i>mEq K⁺</i>
<i>IAo8</i>	21.7 ± 1.7	$258 \pm 1.7^*$	39.5 ± 10.6
<i>Controle</i>	22.5 ± 0.4	316 ± 68	33.6 ± 4.1

n = 5. Teste-t foi utilizado para comparações. *diferente do controle. $P < 0,05$.

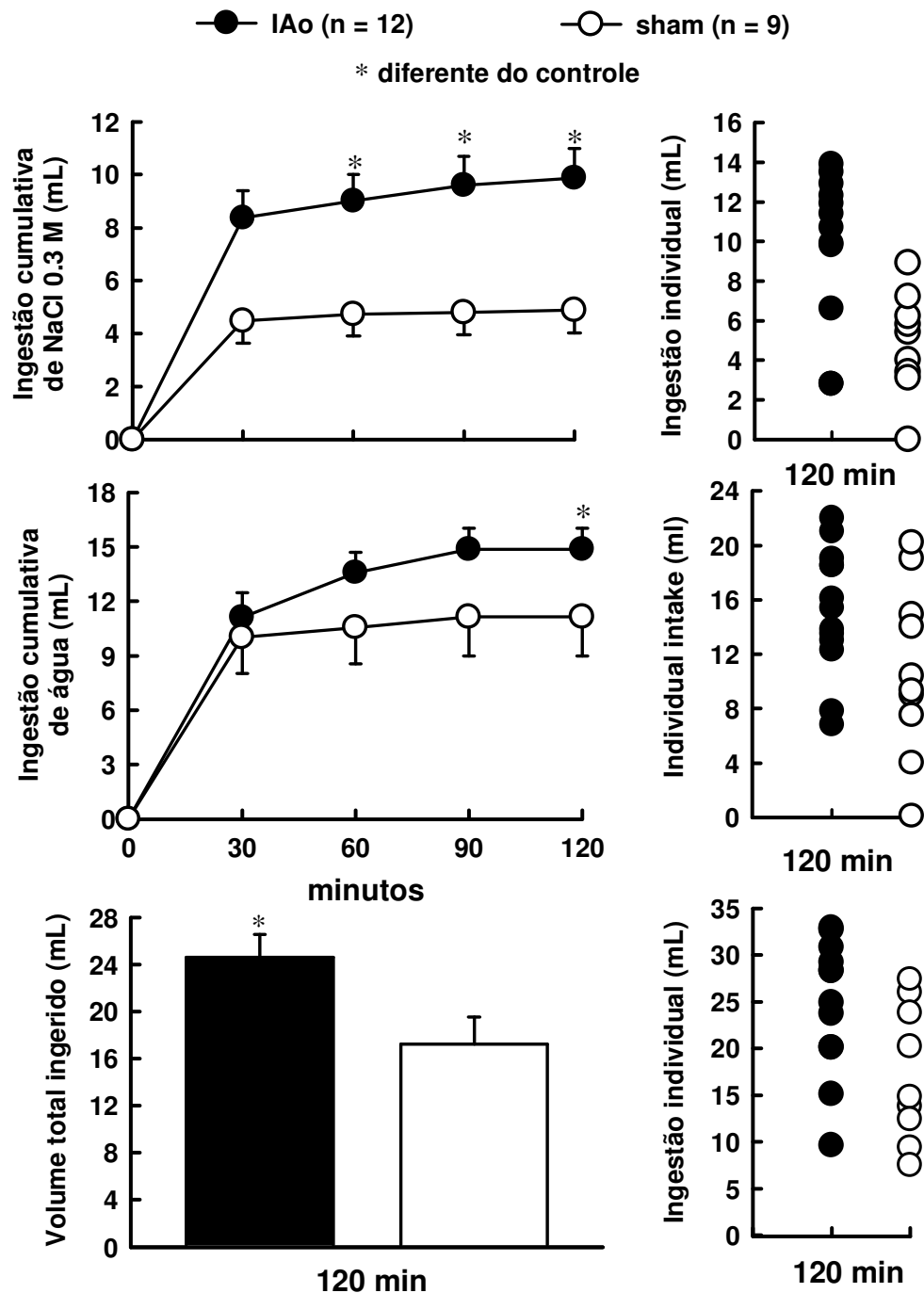


Figura 7. Ingestão não cumulativa (esquerda) e ingestão individual (direita) de NaCl 0,3 M e água nos grupos IAO e controle que receberam tratamento combinando Furo/Cap. O gráfico em barras (abaixo) mostra o volume total ingerido (somatória da ingestão de NaCl 0,3 M e água) nos grupos ao final das 2 horas de observação. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Análise de variância uma via mostrou diferença significativa entre os grupos para a ingestão de NaCl 0,3M $F_{(1,19)} = 7,86$; $p < 0,01$, e água $F_{(1,19)} = 3,98$; $p < 0,05$.

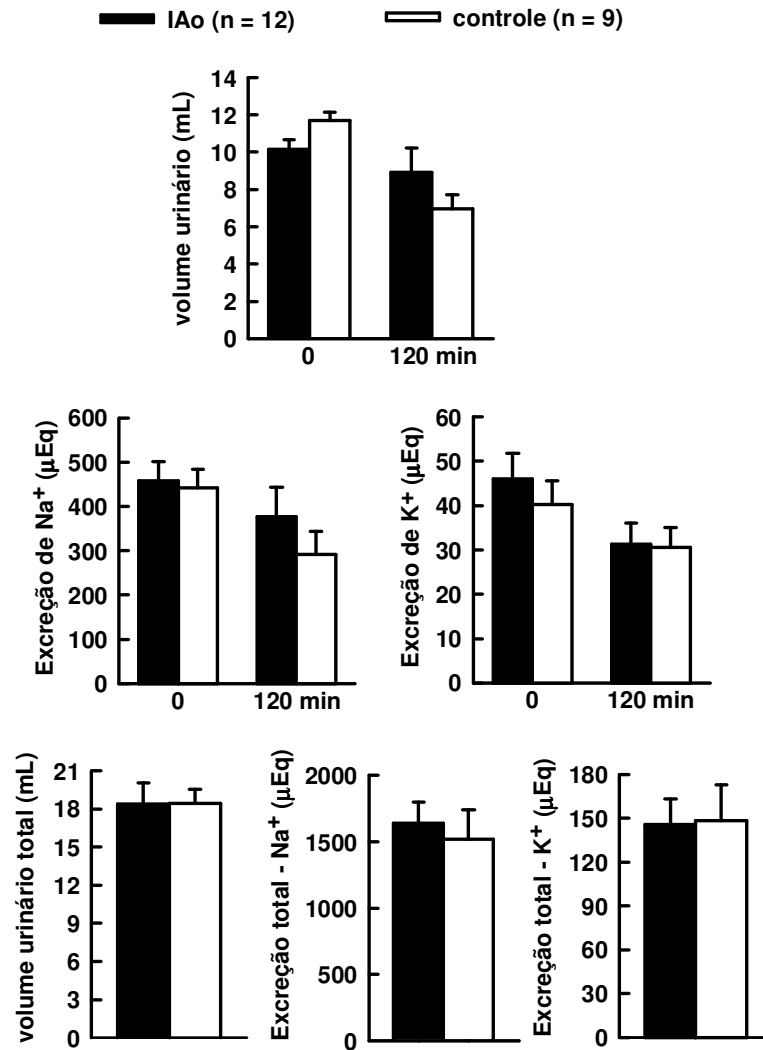


Figura 8. Diurese (acima), natriurese (esquerda) e caliurese (direita) em animais IAo8 subcrônica ou controle que receberam o tratamento combinando Furo/Cap, ao início da ingestão de líquidos (0 mim) e ao término (120 mim). Os gráficos abaixo mostram a somatória do volume excretado, natriurese e caliurese dos animais. Os dados estão expressos como média \pm EPM. Análise de variância uma via não mostrou diferenças significantes entre os grupos para nenhuma das variáveis.

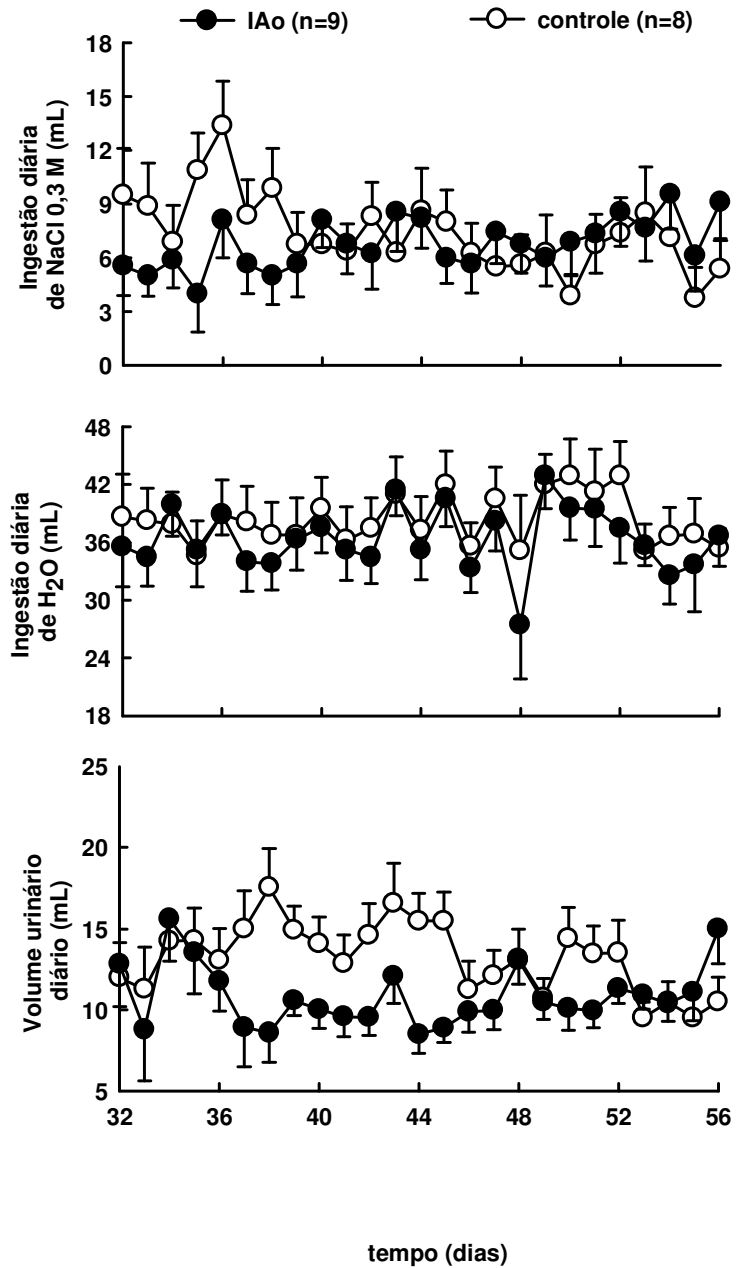


Figura 9. Ingestão diária de água (acima) e NaCl 0,3M (meio) e volume urinário em 24 h (abaixo) pelo período de uma semana em animais com IAo8 ou controle. Os dados estão expressos como média \pm EPM.

4.2.3. Expressão para proteína *c-fos* - IAo8

Na tabela 7 temos os pesos dos corações dos animais que sofreram a IAo8 e foram eutanasiados para a retirada dos encéfalos de acordo com os procedimentos para imunistoquímica. Como pode ser observado não houve diferença entre o peso corporal dos grupos, porém houve aumento do peso dos corações nos ratos IAo8. A contagem das células *c-fos* positivas revelou diminuição da expressão para a proteína *c-fos* no OVLT e AMG do grupo IAo8 em comparação ao controle, tabela 8. A figura 10 mostra a marcação da expressão *c-fos* em um animal representativo do grupo IAo8 e o controle.

Tabela 7. Peso corporal e peso do coração dos animais dos grupos controle e IAo8 ao término dos experimentos.

<i>Relação peso / curacao</i>	<i>IAo8</i>	<i>controle</i>
Peso corporal (g)	455,2 ± 20,2	436,2 ± 0,4
Peso coração (g)	2,2 ± 0,1*	1,7 ± 0,1
Peso coração / 100 g de pc	0,50 ± 0,02*	0,40 ± 0,02

n = 5. Teste-t foi utilizado para comparações. *diferente do controle. P < 0,05.

Tabela 8. Células *c-fos* positivas/secção em mm²x10⁻⁵ nas áreas analisadas, e o valor estatístico para cada comparação.

<i>áreas</i>	<i>IAo8</i>	<i>controle</i>	<i>p</i>
OVLT	2.3 ± 0.4*	25.5 ± 4.5	0,008
MnOP	10.8 ± 5.2	5.1 ± 1.3	0,90
OSF	5.9 ± 1.0	5.6 ± 0.5	0,76
NSO	4.9 ± 1.3	3.8 ± 0.5	0,47
NPV	2.3 ± 1.0	1.7 ± 0.8	0,69
AMG	0.8 ± 0.2*	1.8 ± 0.3	0,03
NPBL	0.7 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0,83
mNTS	3.7 ± 0.6	5.4 ± 0.9	0,79
AP	1.5 ± 0.3	1.6 ± 0.3	0,15

OVLT = órgão vasculoso da lâmina terminalis, MnPo = núcleo pré-óptico medial, OSF = órgão subforminal, NOS = núcleo supra-óptico, NPV = núcleo paraventricular do hipotálamo, AMG = amígdala, NPBL = núcleo parabraquial lateral, mNTS = núcleo do trato solitário medial e AP = área postrema; n = 3. Os dados estão corrigidos 10⁻⁵ e expressos como média ± EPM. Comparações entre os grupos foram feitas através do teste-t. * diferença significativa em relação ao controle, p < 0,05.

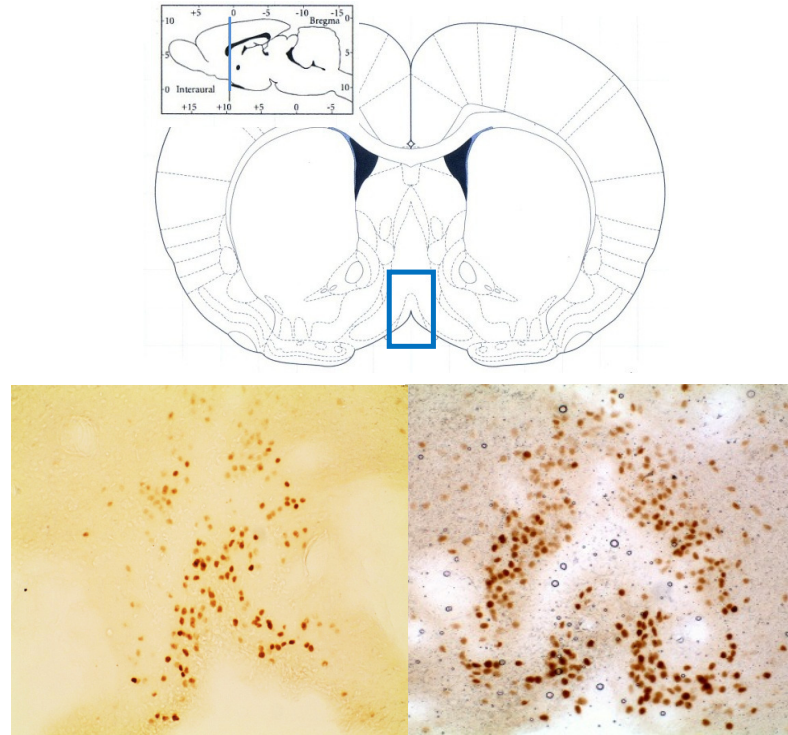


Figura 10. Esquema representativo do OVLT segundo *The Rat Brain: in Stereotaxic Coordinates, 2nd Edition* by George Paxinos & Charles Watson, 0,60 mm a partir do Bregma. Foto representativa de um animal IAo4 –esquerda- e cont4 –direita- mostrando a marcação da expressão para a proteína *c-fos*. O aumento utilizado foi de 20x.

5. DISCUSSÃO

Os resultados mostram que a IAo é um modelo eficiente de sobrecarga de volume cardíaco, que produz remodelação cardíaca com disfunção ventricular esquerda e aumentos da ingestão de água e de sódio hipertônico em diferentes momentos, além de modificar a expressão para a proteína *c-fos* no prosencéfalo. O aumento da ingestão de sódio ocorre a partir da quarta semana de observação, antes do coração entrar em franca falência cardíaca. Na literatura alguns estudos mostram aumentos da ingestão de sódio em modelos de infarto do miocárdio (IM) por ligadura da artéria coronária esquerda (FRANCIS et al., 2001). A sobrecarga de volume numa situação de infarto conduz ao aumento do volume diastólico final do coração em 4 semanas com uma acentuada redução na fração de ejeção. Os resultados presentes mostram que a ingestão de sódio determinada pela RA é anterior ao estabelecimento da insuficiência cardíaca clinicamente manifesta.

5.1. Efeitos da sobrecarga subcrônica - IAo4

A IAo subcrônica quatro semanas após a IAo4, determinou maior diâmetro diastólico do VE, aumento no índice de esfericidade e diminuição da fração de encurtamento, mostrando que os animais entraram em disfunção sistólica. Em adição a não variação do peso em relação ao controle mostrou que não apresentaram características de insuficiência cardíaca clássica. A sobrecarga de volume associada ao tratamento combinando Furo/Cap aumentou a ingestão de sódio, e não modificou a natriurese ou caliurese. A observação destes animais sobre a excreção durante o período noturno, período em que o animal apresente maior atividade, mostrou redução da natriurese; o que pode indicar dificuldades dos rins em excretar adequadamente este íon. Em IC a atividade renal do nervo simpático está aumentada em ratos, que em

conjunto com o aumento do SRAA, contribui para diminuir o fluxo sanguíneo renal (DIBONA; SAWIN, 1991, 1994). O SRAA modula suas ações para o nervo renal simpático eferente através de receptores subtipo AT1 da ANG II (DIBONA et al., 1995). É importante ressaltar que a resposta simpática do sistema nervoso autônomo simpático pode ser regionalmente diferenciada, como exemplo, um aumento da atividade do simpático para uma determinada região pode coexistir com a diminuição para outra região (DIBONA; KOPP, 1997). Vale salientar que apenas a ativação do SRAA é capaz de contribuir para aumentar a atividade do sistema nervoso simpático para os rins, além da ANG II possuir ações em reabsorção de sódio pelos túbulos contorcido distal e coletor. Em adição, também foi observado que ratos com IC apresentam uma resposta vasoconstritora aumentada, bem como uma autoregulação do fluxo sanguíneo renal diminuída em relação aos ratos controles (DIBONA; SAWIN, 2003). Em soma, todos estes fatores contribuem para a diminuição do fluxo sanguíneo renal. Assim, podemos supor que na IAo possa ocorrer uma situação semelhante à dos ratos com IC, onde ocorra diminuição do fluxo sanguíneo renal. Em adição, o modelo de IAo não produz sinais de fenômenos congestivos, como edema de pulmões ou fígado, como observado por Roscani (2011).

O comportamento de ingestão de sódio e água são muito bem caracterizados como efeitos comportamentais das ações do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) sobre receptores do subtipo 1 da ANG II e mineralocorticóides em estruturas do prosencéfalo (JOHNSON; EPSTEIN, 1975; THUNHORST, 1996; OLDFIELD; MCKINLEY, 1994). A administração central de um inibidor da enzima conversora da ANG II, o captopril, reduz a ingestão de água e impede a hipertrofia do miocárdio após IM (SATO et al., 1998). A espirolactona, um inibidor de receptores para mineralocorticóides, centralmente, inibe a ingestão de sódio, a retenção de água e sódio, e melhora a sensibilidade do barorreflexo em ratos

submetidos ao IM (FRANCIS et al., 2001). Lesões da área anteroventral do terceiro ventrículo, uma estrutura rica em receptores da ANG II, parecem interferir com a regulação do volume circulante, predispondo a maior mortalidade de ratos com esta lesão associada ao IM (FRANCIS et al., 2002). Uma possibilidade é que a lesão impeça o adequado preenchimento do volume do ventrículo esquerdo por reduzir o consumo de sódio e impedir retenção de líquidos nesta situação, bem como interfira com mecanismos regulatórios do eixo hipotálamo-pituitária adrenais (FRANCIS et al., 2002). A atividade neuronal do núcleo paraventricular hipotalâmico (NPV, estrutura associada com a regulação do volume e pressão sanguíneos) está aumentada em uma situação de IM (VAHID-ANSARI; LEENEN, 1998, ZHANG et al., 2002). A identificação de proteínas imunorreativas as frações *Fra-Li*, proteínas da família da Fos e que identificam exposição crônica a algum agente, está aumentada no NPV de ratos com IM após 4 semanas, mostrando uma correlação significativa com o aumento da pressão diastólica final do ventrículo esquerdo (VAHID-ANSARI; LEENEN, 1998). O registro da atividade neuronal do NPV está aumentado em ratos com IM, e este aumento é prejudicado tanto pela administração intra-carótida de captopril, quanto de espirolactona (ZHANG et al., 2002). Com o mesmo modelo de IM foi observado em ratos aumento da resposta dipsogênica à angiotensina I intracerebroventricular; em adição o tratamento central com captopril previne a remodelação cardíaca após o IM (SATO et al., 1998). Portanto, muito vem sendo explicado com relação à sobrecarga de volume induzida pelo IM, mas não sobre o modelo de IAo, que também expõem o coração à sobrecarga crônica de volume. Assim, pelos resultados presentes, a IAo4 determinou aumento da ingestão de sódio, provavelmente devido à uma maior ativação em receptores de ANG II ou de mineralocorticóides. Também não podemos deixar de especular o sinergismo entre estes dois sistemas. Experimentos futuros onde ratos com IAo também recebam injeções intracerebroventriculares de antagonistas

para estes receptores poderão esclarecer completamente esta questão.

Com relação à expressão para a proteína *c-fos* a IAo4 houve diminuição da expressão no OSF em relação ao grupo controle após a depleção aguda de líquidos induzida pelo modelo Furo/Cap. O OSF é um conhecido sítio central para as ações da ANG II (MCKINLEY et al., 1992; ROWLAND et al., 1994; OLDFIELD et al., 1994). Em adição, esta estrutura é uma das que apresenta grandes concentrações de receptores angiotensinérgicos subtipo AT1 (BUNNEMANN et al., 1992). Em ratos com IC foi observado aumento da atividade da enzima conversora da angiotensina cerebral, bem como da expressão de receptores subtipo AT1 (TAN et al., 2004). Uma suposição é que na situação sub-crônica a ativação do SRAA periférico ao longo das 4 semanas já tenha conduzido uma modificação na expressão de receptores centrais, aumentando-os. Quando os animais são expostos a uma situação desafiadora, o tratamento combinando Furo/Cap, disponibiliza mais ANG II centralmente, mas nos animais com IAo já existe maior número de receptores na membrana celular para agirem, assim menos ativação nuclear é observada neste núcleo nos grupo IAo em relação ao controle. Isto, pode ser a explicação para a diminuição da expressão da proteína *c-fos* no OSF no grupo com 4 semanas após IAo.

5.2. Efeitos da sobrecarga crônica - IAo8

A IAo crônica, oito semanas, determinou maior diâmetro diastólico do VE, aumento no índice de esfericidade e diminuição da fração de encurtamento, mostrando que os animais entraram em disfunção sistólica, porém os animais não apresentaram sinais de edema ou dispnéia, sinais clássicos da insuficiência cardíaca. Esta sobrecarga de volume associada ao tratamento combinando Furo/Cap aumentou a ingestão de sódio e água após 8 semanas. Com relação à excreção avaliada junto ao tratamento combinando Furo/Cap, não houve modificações na diurese, natriurese ou

caliurese. Em contrapartida, a observação da excreção destes animais durante o período noturno revelou uma redução da natriurese, o que pode indicar dificuldades dos rins em excretar adequadamente este íon. Assim, quando a IAo passa para uma situação crônica a maior ativação do eixo neuro-humoral interfere mais ativamente sobre a ingestão e excreção do principal cátion dos líquidos extracelulares, o sódio. Novamente, vale ressaltar que mesmo na 8ª semana os animais não apresentam sinais de fenômenos congestivos, por exemplo, edema de pulmões ou fígado, assim como observado por Roscani (2011).

Na IC as terminações dos mecanorreceptores cardíacos no lado de baixa pressão da circulação parecem estar danificados (ZUCKER et al., 1977,1979), o que pode prejudicar o monitoramento do volume vascular. Já foi demonstrado que a simulação da expansão do volume circulante pela inflação de um balão na junção da veia cava superior com o átrio direito inibe a ingestão de água e sal (KAUFMAN, 1984; TOTH et al., 1987; DE GOBBI et al., 2008). Na IC a homeostase não pode ser atingida. A associação entre a super excitação do SRAA com a falta de informação sobre o volume circulante pode contribuir para este efeito que persiste e aumenta no decorrer das semanas, IAo4 apenas um leve aumento, IAo8 aumento mais pronunciado.

A análise da expressão para a proteína *c-fos* na IAo8 mostrou redução da expressão no OVLT e na AMG em relação ao grupo controle após a depleção aguda de líquidos induzida pelo modelo Furo/Cap. O OVLT é um conhecido sítio central para as ações da ANG II, assim como o OSF (MCKINLEY et al., 1992; ROWLAND et al., 1994; OLDFIELD et al., 1994), apresentando grandes concentrações de receptores subtipo AT1 para a ANGIO (BUNNEMANN et al., 1992). Em ratos com IC foi observado aumento da atividade da enzima conversora da angiotensina cerebral, bem como da expressão de receptores subtipo AT1 (TAN et al.,

2004). Uma suposição é que na situação crônica, como na subcrônica, a ativação do SRAA periférico, já tenha conduzido uma modificação na expressão de receptores centrais, aumentando a densidade dos receptores subtipo AT1. Quando os animais são expostos a uma situação desafiadora, tratamento combinando Furo/Cap, ocorre maior disponibilização de ANG II centralmente. Desta forma, os animais IAO que já apresentam maior número de receptores na membrana celular não intensificam a produção de proteínas pelos núcleos, o que pode ser observado como diminuição da expressão da proteína *c-fos* no OVLT nos animais com 8 semanas em comparação aos controles. Quanto a AMG, esta estrutura é conhecida por modular o apetite ao sal em resposta a administração de mineralocorticoides (SCHULKIN et al., 1989; GALAVERNA et al., 1991; JOHNSON et al., 1999). A elevação da aldosterona circulante na situação crônica de IAO pode aumentar a densidade dos receptores mineralocorticóide na AMG, e da mesma forma que a ANG no OVLT, o maior número de receptores mineralocorticóide na membrana celular dos neurônios da AMG colabora para não intensificar a produção de proteínas pelos núcleos, o que pode ser observado como diminuição da expressão da proteína *c-fos* na AMG. Estas hipóteses sobre a regulação mais acentuada destes receptores numa situação crônica de IAO ainda precisam de estudos mais detalhados.

7. Conclusão

Os dados sugerem que a progressão da IAo, de sub-crônica para crônica, determina disfunção sistólica, e aumenta a ingestão de líquidos frente uma depleção aguda; enquanto retém sódio urinário quando sem a influência de qualquer tratamento. Em adição, altera a expressão da proteína c-fos induzida pela depleção aguda em importantes áreas prosencefálicas, OVLT, OSF e amígdala, envolvidas na regulação da ingestão de água e sódio.

8. Perspectivas futuras

Em clínica, pacientes que sofrem de IAo podem permanecer assintomáticos por anos até desenvolverem insuficiência cardíaca com sintomas clássicos (BONOW et al., 1983; ISHII et al., 1996). No Brasil a principal causa da IAo são doenças valvares, cuja etiologia primordial é a febre reumática (TARASOUTCHI et al., 2003). Pelos resultados presentes abrimos novas perspectivas para adiantar o tratamento com antagonistas de receptores para ANG II circulante já no início da patologia, como uma possibilidade de melhora no prognóstico, auxiliando a diminuir a ingestão pelo íon sódio e mesmo sua retenção. Nossos resultados sugerem que os fatores neurohumorais iniciem uma reorganização de estruturas centrais que modificam a avidez pelo sal no decorrer da progressão da IAo, alterando o equilíbrio hidroeletrolítico antes que o coração entre em falência com sintomas de congestão. Novos experimentos poderão quantificar melhor esta reorganização.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBANESI FILHO; F.M. What is the current scenario for heart failure in Brazil? **Arq Bras Cardiol.**, 85(3):155-6, 2005.

ARSENAULT, M.; PLANTE, E.; DROLET, M.C.; COUET J. Experimental aortic regurgitation in rats under echocardiographic guidance. **J Heart Valve Dis.**, 11(1):128-34, 2002.

BADOER, E.; MCKINLAY, D.; TRIGG, L.; MCGRATH, B.P. Distribution of activated neurons in the rabbit brain following a volume load. **Neuroscience**, 81(4):1065-77, 1997.

BADOER, E.; MOGUILEVSKI, V.; MCGRATH, B.P. Cardiac afferents play the dominant role in renal nerve inhibition elicited by volume expansion in the rabbit. **Am J Physiol.**, 274: R383-8, 1999.

BARBOSA, P.J.B.; MÜLLER, R.E.; LATADO, A.L.; ACHUTTI, A.C.; RAMOS, A.I.O.; WEKSLER, C.; et al. Diretrizes Brasileiras para Diagnóstico, Tratamento e Prevenção da Febre Reumática da Sociedade Brasileira de Cardiologia, da Sociedade Brasileira de Pediatria e da Sociedade Brasileira de Reumatologia. **Arq Bras Cardiol.**;93(3 supl.4):1-18, 2009.

BEKEREDJIAN, R.; GRAYBURN, P.A. Valvular heart disease: aortic regurgitation. **Circulation.** ;112(1):125-34, 2005.

BEICH, K.R.; YANCY, C. The heart failure and sodium restriction controversy: challenging conventional practice. **Nutr Clin Pract**, 23:477-486, 2008.

BENNETT, S.J.; HUSTER, G.A.; BAKER, S.L.; MILGROM, L.B.; KIRCHGASSNER, A.; BIRT, J.; PRESSLER, M.L. Characterization of the precipitants of hospitalization for heart failure decompensation. **Am J Crit Care.**, 7:168-174, 1998.

BERNARD, J.F.; ALDEN, M.; BESSON, J.M. The organization of the efferent projections from the pontine parabrachial area to the amygdaloid complex: a Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA-L) study in the rat. **J Comp Neurol.**; 329:201-229, 1993.

BONOW, R.O.; ROSING, D.R.; MCINTOSH, C.L.; JONES, M.; MARON, B.J.; LAN, K.K.; LAKATOS, E.; BACHARACH, S.L.; GREEN, M.V.; EPSTEIN, S.E. The natural history of asymptomatic patients with aortic regurgitation and normal left ventricular function. **Circulation**; 68:509-17, 1983.

BORER, J.S.; HOCHREITER, C.; HERROLD, E.M.; SUPINO, P.; ASCHERMANN, M.; WENCKER, D.; DEVEREUX, R.B.; ROMAN, M.J.; SZULC, M.; KLIGFIELD P.; ISOM, O.W. Prediction of indications for valve replacement among asymptomatic or minimally symptomatic patients with chronic aortic regurgitation and normal left ventricular performance. **Circulation.**; 97:525-534, 1998.

- BUGGY, J.; JOHNSON, A.K. Angiotensin-induced thirst: effects of third ventricle obstruction and periventricular ablation. **Brain Res.**, 149(1):117-28, 1978.
- BUNNEMANN, B.; IWAI, N.; METZGER, R.; FUXE, K.; INAGAMI, T.; GANTEN, D. The distribution of angiotensin II AT1 receptor subtype mRNA in the rat brain. **Neurosci Lett**; 142: 155–158, 1992.
- CUNNINGHAM, M.W. Pathogenesis of group A streptococcal infections. **Clin Microbiol Rev.**; 13 (3): 470-511, 2000.
- DE GOBBI, J.I.; MENANI, J.V., BELTZ, T.G.; JOHNSON, R.F.; THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Right atrial stretch alters fore- and hind-brain expression of c-fos and inhibits the rapid onset of salt appetite. **J Physiol.**, 586(Pt 15):3719-29, 2008.
- DENG, Y.; KAUFMAN, S. Pregnancy-induced changes in central response to atrial distension mimicked by progesterone metabolite. **Am J Physiol.**, 275(6 Pt 2):R1875-7, 1998.
- DiBONA, G.F.; KOPP, U.C. The neural control of renal function. **Physiol Rev.**;77:75–197, 1997.
- DiBONA, G.F.; JONES, S.Y.; BROOKS, V.L. ANG II receptor blockade and arterial baroreflex regulation of renal nerve activity in cardiac failure. **Am J Physiol.**, 269(5 Pt 2):R1189-96, 1995.
- DiBONA, G.F.; SAWIN, L. Role of renal nerves in sodium retention of cirrhosis and congestive heart failure. **Am J Physiol.**;260:R298–R305, 1991.
- DiBONA, G.F.; SAWIN, L. Reflex regulation of renal nerve activity in cardiac failure. **Am J Physiol.** 1994; 266:R27–R39, 1994.
- FERREYRA, M.D.; CHIARAVIGLIO, E. Changes in volemia and natremia and onset of sodium appetite in sodium depleted rats. **Physiol Behav**, 19(2):197-201, 1977.
- FITTS, D.A.; MASSON, D.B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behav. Neurosci.**, 103: 865-872, 1989
- FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev.**, 78(3):583-686, 1998.
- FLUHARTY, S.J.; EPSTEIN A.N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in rat. II Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. **Behav. Neurosci.**, 97: 746-758, 1993.

- FRANCIS, J.; WEISS, R.M.; WEI, S.G.; JOHNSON, A.K.; BELTZ, T.G.; ZIMMERMAN, K.; FELDER, R.B. Central mineralocorticoid receptor blockade improves volume regulation and reduces sympathetic drive in heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol.**, 281(5):H2241-51, 2001.
- FRANCIS, J.; WEI, S.G.; WEISS, R.M.; BELTZ, T.; JOHNSON, A.K.; FELDER, R.B. Forebrain-mediated adaptations to myocardial infarction in the rat. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**; 282(5):H1898-906, 2002.
- GALAVARNA, O.; DE LUCA JR., L.A.; SCHULKIN, J.; YAO, S.Z.; EPSTEIN, A.K. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res. Bull.**, 28(1): 89-98 1991.
- GUILHERME, L.; RAMASAWMY, R.; KALIL, J. Rheumatic fever and rheumatic heart disease: genetics and pathogenesis. **Scand J Immunol**; 66 (2-3): 199-207, 2007.
- HAVRANEK, E.P.; MASOUDI, F.A.; WESTFALL, K.A.; WOLFE, P.; ORDIN, D.L.; KRUMHOLZ, H.M. Spectrum of heart failure in older patients: results from the National Heart Failure project. **Am Heart J**, 143:412-417, 2002.
- HUGHES, P., DRAGUNOW, M., Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. **Pharmacol. Rev.**, 47(1):133-178, 1995.
- HUNT, S.A. **et al.** American College of Cardiology/American Heart Association. ACC/AHA guidelines for the evaluation and management of chronic heart failure in the adult: executive summary. A report of the American College of Cardiology/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines (Committee to revise the 1995 Guidelines for the Evaluation and Management of Heart Failure). **J Am Coll Cardiol**, 38:2101-2113, 2001.
- ISHII, K.; HIROTA, Y.; SUWA, M.; KITA, Y.; ONAKA, H.; KAWAMURA, K. Natural history and left ventricular response in chronic aortic regurgitation. **Am J Cardiol.**;78:357-61, 1996.
- JOHNSON, A.K.; EPSTEIN, A.N. The cerebral ventricles as the avenue for the dipsogenic action of intracranial angiotensin. **Brain Res.**; 86(3):399-418, 1975.
- JOHNSON, A.K.; DE OLMOS, J.; PASTUSKOVAS, C.V.; ZARDETTO-SMITH, A.M.; VIVAS, L. The extended amygdala and salt appetite. **Ann N Y Acad Sci.**; 877:258-280, 1999.
- JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol.**, 18(3):292-353, 1997.
- KAUFMAN S. Role of right atrial receptors in the control of drinking in the rat. **J Physiol.**, 349:389-96, 1984.

KATAYAMA, K.; TAJIMI, T.; GUTH, B.D.; MATSUZAKI, M.; LEE, J.D.; SEITELBERGER, R.; PETERSON, K.L. Early diastolic filling dynamics during experimental mitral regurgitation in the conscious dog. **Circulation**; 78(2):390-400, 1988.

KUEHNEMAN, T.; SAULSBURY, D.; SPLETT, P.; CHAPMAN, D.B. Demonstrating the impact of nutrition intervention in a heart failure program. **J Am Diet Assoc.**, 102(12):1790-4, 2002.

KRIECKHAUS, E.E. "Innate recognition" aids rats in sodium regulation. **J Comp Physiol Psychol**, 3(1):117-22. 1970

LESHEM, M. Salt preference in adolescence is predicted by common prenatal and infantile mineralofluid loss. **Physiol Behav**, 63(4):699-704, 1998.

LESHEM, M. The ontogeny of salt hunger in the rat. **Neurosci Biobehav Rev**, 3(5):649-59, 1999.

MCKINLEY, M. J.; BADOER, E.; OLDFIELD, B.J. Intravenous angiotensin II induces Fos-immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. **Brain Res.** 594: 295–300, 1992.

MOORE-GILLON, M.J.; FITZSIMONS, J.T. Pulmonary vein-atrial junction stretch receptors and the inhibition of drinking. **Am J Physiol**;242(5):R452-7, 1982.

NEILY, J.B.; TOTO, K.H.; GARDNER, E.B.; RAME, J.E.; YANCY, C.W.; SHEFFIELD, M.A.; DRIES, D.L.; DRAZNER, M.H. Potential contributing factors to noncompliance with dietary sodium restriction in patients with heart failure. **Am Heart J**, 143:29-33, 2002.

OLDFIELD, B.J.; BADOER, E.; HARDS, D.K.; MCKINLEY, M.J. *Fos* production in retrogradely labelled neurons of the lamina terminalis following intravenous infusion of either hypertonic saline or angiotensin II. **Neuroscience** 60: 255–262, 1994.

OLSON, L.J.; SUBRAMANIAN, R.; EDWARDS, W.D. Surgical pathology of pure aortic insufficiency: a study of 225 cases. **Mayo Clin Proc.**; 59: 835–841, 1984.

PATEL, K.P.; ZHANG, K.; KENNEY, M.J.; WEISS, M.; MAYHAN, W.G. Neuronal expression of Fos protein in the hypothalamus of rats with heart failure. **Brain Res.**, 865(1):27-34, 2000.

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

PLANTE, E.; COUET, J.; GAUDREAU, M.; DUMAS, M.P.; DROLET, M.C.; ARSENAULT, M. Left ventricular response to sustained volume overload from chronic aortic valve regurgitation in rats. **J Card Fail.**; 9(2):128-40, 2003.

PLANTE, E.; GAUDREAU, M.; LACHANCE, D.; DROLET, M.C.; ROUSSEL, E.; GAUTHIER, C.; LAPOINTE, E.; ARSENAULT, M.; COUET, J. Angiotensin-converting enzyme inhibitor captopril prevents volume overload cardiomyopathy in experimental chronic aortic valve regurgitation. **Can J Physiol Pharmacol.**, 82(3):191-9, 2004a.

PLANTE, E.; LACHANCE, D.; GAUDREAU, M.; DROLET, M.C.; ROUSSEL, E.; ARSENAULT, M.; COUET, J. Effectiveness of beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. **Circulation**, 110(11):1477-83, 2004b.

PLANTE, E.; LACHANCE, D.; CHAMPETIER, S. ; DROLET, M.C. ; ROUSSEL, E.; ARSENAULT, M.; COUET, J. Benefits of long-term beta-blockade in experimental chronic aortic regurgitation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 294(4):h1888-95, 2008.

PRIESTLEY, J.V., Immunocytochemical techniques for the localization of neurochemically characterized nerve pathways. Chapter 3, **In: Neurochemistry a practical approach**, edited by: A.J.Tuner and H.S.Bachelard, Oxford, Washington DC (1987) 65-112

PYNER, S.; DEERING, J.; COOTE, J.H. Right atrial stretch induces renal nerve inhibition and c-fos expression in parvocellular neurones of the paraventricular nucleus in rats. **Exp Physiol**, 87(1):25-32, 2002.

RANDOLPH, R.R.; LI, Q.; CURTIS, K.S.; SULLIVAN, M.J.; CUNNINGHAM, J.T. Fos expression following isotonic volume expansion of the unanesthetized male rat. **Am J Physiol**, 274(5 Pt 2):R1345-52, 1998.

RICCI, D.R. Afterload mismatch and preload reserve in chronic aortic regurgitation. **Circulation.**;66:826–834, 1982.

ROSS, J. JR; MCCULLAGH, W.H. Nature of enhanced performance of the dilated left ventricle during chronic volume overloading. **Circ Res.**;30:549–556, 1972.

ROSCANI, M.G. Evolução das modificações morfo-funcionais cardíacas no processo de adaptação crônica à insuficiência aórtica aguda experimental em ratos. Tese de doutorado, Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista, 2011, pp 52.

ROWLAND, N. E.; LI, B.-H.; ROZELLE, A.K.; FREGLY, M.J.; GARCIA, M.; SMITH, G.C. Localization of changes in immediate early genes in brain in relation to hydromineral balance: intravenous angiotensin II. **Brain Res. Bull.** 33: 427–436, 1994

SANH, D.J.; DEMARIA, A.; KISSLO, J.; WEYMAN, A.E. The Committee on M-mode standardization of the American Society of Ecocardiography. Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: results of a survey of echocardiographic measurements. **Circulation**; 58: 1072-83, 1978.

SAKAI, R.R.; FINE, W.B.; EPSTEIN, A.N.; FRANKMANN, S.P. Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. **Behav Neurosci**, 101:724-731, 1987.

SAKAI, R.R.; FRANKMANN, S.P.; FINE, W.B.; EPSTEIN, A.N. Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake of the rat. **Behav Neurosci**, 103(1):186-92, 1989.

SAKAI, R.R.; MA, L.Y.; ZHANG, D.M.; MCEWEN, B.S.; FLUHARTY, S.J. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. **Neuroendocrinology**, 64(6):425-9, 1996.

SATO, T.; YOSHIMURA, R.; KAWADA, T.; SHISHIDO, T.; MIYANO, H.; SUGIMACHI, M.; SUNAGAWA, K. The brain is a possible target for an angiotensin-converting enzyme inhibitor in the treatment of chronic heart failure. **J Card Fail** 4: 139–144, 1998.

SCHULKIN, J.; MARINI, J.; EPSTEIN, A.N. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. **Behav Neurosci**, 103(1):179-85, 1989.

STEVENSON, L.W.; NOHRIA, A.; MIELNICZUK, L. Torrent or Torment From the Tubules? Challenge of the Cardiorenal Connections. **J Am Coll Cardiol**, 45:2004-2007, 2005.

STRICKER, E.M.; WOLF, G. Blood volume and tonicity in relation to sodium appetite. **J Comp Physiol Psychol**, 62(2):275-9, 1966.

TAKAMATA, A.; MACK, G.W.; GILLEN, C.M.; NADEL, E.R. Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 266:R1493-R1502, 1994.

TAN, J.; WANG, H.; LEENEN, F.H. Increases in brain and cardiac AT1 receptor and ACE densities after myocardial infarct in rats. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** 286: H1665–H1671, 2004.

TARASOUTCHI, F.; GRINBERG, M.; SPINA, G.S.; SAMPAIO, R.O.; CARDOSO L.F.; ROSSI, E.G.; POMERANTZEFF, P.; LAURINDO, F.; DA LUZ, P.L.; RAMIRES, J.A. Ten-year clinical laboratory follow-up after application of a symptom-based therapeutic strategy to patients with severe chronic aortic regurgitation of predominant rheumatic etiology. **J Am Coll Cardiol**; 41(8):1316-24, 2003.

THUNHORST, R.L. Role of peripheral angiotensin in salt appetite of the sodium-deplete rat. **Neurosci Biobehav Rev.**; 20(1):101-6, 1996.

THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. **Am J Physiol**, 266(2 Pt 2):R458-465, 1994.

THUNHORST, R.L.; XU, Z.; CICHA, M.Z.; ZARDETTO-SMITH, A.M.; JOHNSON, A.K. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **Am J Physiol.**, 274(6 Pt 2):R1807-14, 1998.

- TOTH, E.; STELFOX, J.; KAUFMAN, S. Cardiac control of salt appetite. **Am J Physiol.** 252(5 Pt 2):R925-9, 1987.
- WALLER, B.F.; TALIERCIO, C.P.; DICKOS, D.K.; HOWARD, J.; ADLAM, J.H.; JOLLY, W. Rare or unusual causes of chronic, isolated, pure aortic regurgitation. **Clin Cardiol.** 1990;13:577-581, 1990.
- WANG, X.; REN, B.; LIU, S.; SENTEX, E.; TAPPIA, P.S.; DHALLA, N.S. Characterization of cardiac hypertrophy and heart failure due to volume overload in the rat. **J Appl Physiol.**;94(2):752-63, 2003.
- WHO_Rheumatic fever and rheumatic heart disease: report of a WHO expert consultation on rheumatic fever and rheumatic heart disease. World Health Organization. Geneva: 2001.
- WEISINGER, R.S.; BLAIR-WEST, J.R.; BURNS, P.; DENTON, D.A.; MCKINLEY, M.J.; TARJAN E. The role of angiotensin II in ingestive behaviour: a brief review of angiotensin II, thirst and Na appetite. **Reg. Peptides**, 66:73-81, 1996.
- VAHANIAN, A.; IUNG, B.; HIMBERT, D.; NATAF, P. Changing demographics of valvular heart disease and impact on surgical and transcatheter valve therapies. **Int J Cardiovasc Imaging.**, 27(8):1115-22, 2011.
- VAHID-ANSARI, F.; LEENEN, F.H. Pattern of neuronal activation in rats with CHF after myocardial infarction. **Am J Physiol.**, 275(6 Pt 2):H2140-6, 1998.
- VERBALIS, J.G. Disorders of body water homeostasis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, 17(4):471-503, 2003.
- ZHAN, Z.H.; FRANCIS, J.; WEISS, R.M.; FELDER, R.B. The renin-angiotensin-aldosterone system excites hypothalamic paraventricular nucleus neurons in heart failure. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, 283(1):H423-33, 2002.
- ZUCKER, I.H.; EARLE, A.M.; GILMORE, J.P. The mechanism of adaptation of left atrial stretch receptors in dogs with chronic congestive heart failure. **J Clin Invest.**; 60(2):323-31, 1977.
- ZUCKER, I.H.; EARLE, A.M.; GILMORE, J.P. Changes in the sensitivity of left atrial receptors following reversal of heart failure. **Am J Physiol**, 237:H555-559, 1979.

ANEXO 1

XV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular, realizado na Universidade de São Paulo, Campus Capital, no período de 2 a 5 de fevereiro de 2011.

Título: Insuficiência aórtica aumenta a ingestão de sódio em ratos submetidos à depleção aguda de líquidos.

Autores: ¹Leme, G.A., ¹Siqueira, T.F., ¹Omoto, A.C.M., ¹Tardivo, A.C.B., ²Roscani, M.G., ²Matsubara, L.S., ²Matsubara, B.B., ¹De Gobbi, J.I.F., ¹Departamento de Fisiologia IBB-UNESP, Botucatu/SP; ²Departamento de Clínica Médica, FMB-UNESP, Botucatu/SP

- Recebeu menção honrosa

Publicação:

Inverse association between systolic function and sodium and water intake in chronic aortic regurgitation, Leme, G.A., Tardivo, A.C.B., Roscani, M.G., Matsubara, L.S., Matsubara, B.B., De Gobbi, J.I.F., *Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical*, Volume 163, Issues 1-2, Page: 89 (1 September 2011),

doi:10.1016/j.autneu.2011.05.142

(1st Joint Meeting of the International Society for Autonomic Neuroscience and the American Autonomic Society -ISAN/AAS 2011, Buzios, Rio de Janeiro, Brazil)