PAULO CÉSAR DE OLIVEIRA

# CONSEQUÊNCIAS DA INJEÇÃO CEREBROVENTRICULAR DA INSULINA NO MANUSEIO RENAL DE SÓDIO EM RATOS: EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CENTRAL

**CAMPINAS** 

2009

# PAULO CÉSAR DE OLIVEIRA

# CONSEQUÊNCIAS DA INJEÇÃO CEREBROVENTRICULAR DA INSULINA NO MANUSEIO RENAL DE SÓDIO EM RATOS: EFEITOS DA INIBIÇÃO DA ÓXIDO NÍTRICO SINTASE CENTRAL

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Doutor em Clínica Médica, área de concentração Clínica Médica.

ORIENTADOR: PROF. DR. JOSÉ ANTONIO ROCHA GONTIJO-FCM/UNICAMP

CAMPINAS 2009

## FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS DA UNICAMP

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8<sup>a</sup> / 6044

Ol4c	Oliveira, Paulo César de Conseqüências da injeção cerebroventricular da insulina no manuseio renal de sódio em ratos: efeitos da inibição da óxido nítrico sintase central / Paulo César de Oliveira. Campinas, SP : [s.n.], 2009.
	Orientador : José Antonio Rocha Gontijo Tese ( Doutorado ) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
	<ol> <li>Sistema nervoso central. 2. Insulina. 3. Natriurese. 4. Óxido nítrico. 5. Teste de função renal. I. Gontijo, José Antonio Rocha. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.</li> </ol>

Título em inglês : Consequences of cerebroventricular insulin injection on renal sodium handling in rats : effect of inhibition of central nitric oxide synthase

**Keywords:** • Central nervous system

- Insulin
- Natriuresis
- Nitric oxide
- Kidney function tests

Titulação: Doutor em Clínica Médica Área de concentração: Clínica Médica

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo Prof. Dr. João Batista Michelotto Prof. Dr. Waldir Eduardo Garcia Prof. Dr. Heitor Moreno Junior Prof. Dr. José Francisco Figueiredo

Data da defesa: 18-12-2009

# Banca examinadora da tese de Doutorado Paulo César de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

1. Prof. Dr. João Batista Michelotto     Diana       2. Prof. Dr. Waldir Eduardo Garcia     Image: Comparison of the second sec
1. Prof. Dr. João Batista Michelotto       Diana         2. Prof. Dr. Waldir Eduardo Garcia       Image: Comparison of the second
2. Prof. Dr. Waldir Eduardo Garcia
3. Prof. Dr. José Francisco Figueiredo - Alf-marto
4. Prof. Dr. Heitor Moreno Júnior Muniugh
5. Prof. Dr. José Antonio Rocha Gontijo

Curso de pós-graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciência: Médicas da Universidade Estadual de Campinas.

Data: 18/12/2009

.....

# DEDICATÓRIA

Aos meus pais João e Julieta,

À minha esposa Dalva,

Aos meus filhos Rodrigo e Ana Paula,

e a Beatriz e o Ladson

Ao meu neto Felipe e a minha futura neta

Marina

### "A Deus: Todo poder, toda honra, toda glória" amém!

Ao Prof. Dr. José Antônio Rocha Gontijo, o orientador; em sintonia com a ciência e as coisas humanas; dignidade, compreensão, firmeza e tolerância: referência ética para todos os seus admiradores.

Ao Prof. Dr. José Francisco Figueiredo, por ter me aberto às portas da pósgraduação.

Ao Prof. Dr. Sebastião Rodrigues Ferreira Filho, colega e amigo. O "grande mentor" e entusiasta da pesquisa científica e da ciência na Universidade Federal de Uberlândia

Ao Prof. Dr. João Batista Michelotto, colega, amigo, e companheiro. O "mestre" na rota da ciência, e o responsável pelo estado de coisas.

A Dra Melani Ribeiro Custódio, colega acadêmica e profissional, que sem a sua ajuda profissional nada disto teria acontecido.

Aos amigos da Unicamp: Adriana Crété, Amanda Almeida, Elizabeth Cristina, Luiz e Ana Lúcia Dantas e aos colegas da pós-graduação do NMCE a minha gratidão.

Ao Departamento de Clínica Médica da FAMED/UFU e os colegas do Curso de Clínica Médica Médica II, pela valiosa ajuda.

Aos colegas do SENEFRO: Dr Heleno, Dra Ana Beatriz, Dr Rondon, Dra Rita de Cássia, Dr Ademilton, Dra Carina, Dra Letícia, Dr Emerson, Dr João Vilela, Dr Aloísio, pela valiosa ajuda.

A todos, minha gratidão.

	Pg
RESUMO	xiv
SUMMARY	xv
1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
Manipulação cirúrgica	24
Considerações Gerais	26
Grupos de experimentos	27
Desenho experimental A	27
Desenho experimental B	28
Desenho experimental C	28
Parâmetros analisados	30
Análise estatística	32
4. RESULTADOS.	33
Massa Corporal	33
Resultados do desenho experimental A	33
Resultados do desenho experimental B	40
Resultados do desenho experimental C	47
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÃO	63
7. PERSPECTIVAS	64
8. REFERÊNCIAS	65
9.ANEXO 1	75
10. ANEXO 2	82

## LISTA DE ABREVIATURAS

Lista 1. Termos representativos dos parâmetros da função renal

V'	= Volume urinário minuto
C <sub>Cr</sub>	= <i>Clearance</i> de Creatinina
$C_{Li}$	= <i>Clearance</i> de Lítio
$C_{Na}$	<i>= Clearance</i> de Sódio
Ск	= <i>Clearance</i> de Potássio
RFG	= Taxa de Filtração Glomerular
$FE_{Li}$	= Fração de Excreção de Lítio
FE <sub>Na</sub>	= Fração de Excreção de Sódio
FEP <sub>Na</sub>	= Fração de Excreção Proximal de Sódio
FEPP <sub>Na</sub>	= Fração de Excreção Pós Proximal de Sódio
FE <sub>K</sub>	= Fração de Excreção de Potássio

Lista 2. Termos representativos da bioquímica do sangue

$\mathbf{P}_{\mathrm{Na}}$	= Concentração Plasmática de Sódio
$U_{\text{Na}}$	= Concentração Urinária de Sódio
P <sub>K</sub>	= Concentração Plasmática de Potássio
$U_{K}$	= Concentração Urinária de Potássio
$P_{\mathrm{Li}}$	= Concentração Plasmática de Lítio
$U_{\mathrm{Li}}$	= Concentração Urinária de Lítio
P <sub>Cr</sub>	= Concentração Plasmática de Creatinina
U <sub>Cr</sub>	= Concentração Urinária de Creatinina

# Lista 3. Termos genéricos

ANOVA	= Análise de variância
DM	= Diabetes mellitus
DMID	= Diabetes mellitus insulino-dependente
DMNID	= Diabetes mellitus não insulino-dependente
DNx	= Animais denervados renais bilateral
FF	= Fração de filtração
FSR	= Fluxo sangüíneo renal
Ins	= Insulina
i.c.v.	= Intracerebroventricular
L-NAME	= N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginine Methil ester
L-NMMA	= N <sup>G</sup> -Monometil-L-Arginine
NaCl 0,15M	= Solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%
NDNx	= Animais não denervados renais
NO	= Óxido nítrico
NOS	= Óxido nítrico sintase
NPY	= Neuropeptídeo Y
PA	= Pressão arterial
p.c.	= Peso corporal
RFG	= Taxa de filtração glomerular
SC	= Subcutâneo
SNA	= Sistema nervoso autônomo
TAUC	= Área total sob a curva
VS	= Versus ou comparados

Tabela 1:	Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou dose-resposta de 1.26, 12.6 e 126ng de insulina (E) em volume de $3\mu$ l em ratos Wistar Hannover na diferença percentual em $\Delta$ %. Dados mostrados como média±erro padrão da média (X±EPM) *p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni)	75
Tabela 2:	Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou dose-resposta de 1.26, 12.6 e 126ng de insulina (E) em volume de $3\mu$ l (E) em ratos Wistar Hannover no volume urinário minuto (V'), clearance de creatinina (FG), excreção fracional de sódio (FE <sub>Na</sub> ), proximal (FEP <sub>Na</sub> ) e pós-proximal (FEPP <sub>Na</sub> ) e excreção fracional de potássio (FE <sub>K</sub> ). Dados mostrados como média±erro padrão da média (X±EPM) *p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni), em Área Total Sob a Curva (TAUC) em $\Delta$	76
Tabela 3:	%.min Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou dose-resposta de 60 e 600µg de L-NAME e de 126ng em de insulina em volume de 3µl, em ratos Wistar Hannover na diferença percentual em Δ%. Dados mostrados como média±erro padrão da média (X±EPM) *p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni)	70
Tabela 4:	Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou dose-resposta de 60 e 600µg de L-NAME e de 126ng de insulina (E) em volume de 3µl, em ratos Wistar Hannover no volume urinário minuto (V'), clearance de creatinina (FG), excreção fracional de sódio (FE <sub>Na</sub> ), proximal (FEP <sub>Na</sub> ) e pósproximal (FEPP <sub>Na</sub> ) e excreção fracional de potássio (FE <sub>K</sub> ). Dados mostrados como média±erro padrão da média (X±EPM). * <sup>5</sup>	
Tabela 5:	<sup>(a)</sup> $p<0.05$ (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni), em Area Total Sob a Curva (TAUC) em $\Delta$ %.min Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) em volume de 3µl, da associação de 126ng de insulina com Salina (Co) em volume de 6µl, da associação de 126ng de insulina com 60 e 600µg de L-NAME em volume de 6µl e de 126ng de insulina em volume de 3µl (E), em ratos Wistar Hannover na diferença percentual em $\Delta$ %. Dados mostrados como média±erro padrão da	78
Tabela 6:	média (X±EPM) *p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni) Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) em volume de 3 µl, de 60 e 600 µg de L-NAME em volume de 3 µl (E) e de 126 ng de insulina em volume de 3 µl (E), em ratos <i>Wistar</i> <i>Hannover</i> no volume urinário minuto (V'), clearance de creatinina	79

### Pag.

х

	(FG), excreção fracional de sódio (FE <sub>Na</sub> ), proximal (FEP <sub>Na</sub> ) e pós-	
	proximal (FEPP <sub>Na</sub> ) e excreção fracional de potássio (FE <sub>K</sub> ). Dados	
	mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM). *; @	
	p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni) em Área	
	Total Sob a Curva (TAUC) em $\Delta$ %.min	80
Tabela 7:	Peso dos animais em gramas (g)	81

		P
Figura 1:	Corte frontal do encefálo de rato de 250g (10 a 12 semanas)	2
Figura 2:	Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina	
	(C) ou dose-resposta de 1.26, 12.6 e 126ng de insulina (E) em	
	volume de 3µl, em ratos Wistar Hannover na diferença percentual	
	em $\Delta$ % e na Área Total Sob a Curva (TAUC) em $\Delta$ %.min no V';	
	FG e FE <sub>Na</sub> . Dados mostrados como média±erro padrão da média	
Figura 3:	(X±EPM). *p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni) Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina	3
	(C) ou dose-resposta de 1.26, 12.6 e 126ng de insulina (E) em	
	volume de 3µl, em ratos Wistar Hannover na diferença percentual	
	em $\Delta$ % e na Área Total Sob a Curva (TAUC) em $\Delta$ %.min na	
	$FEP_{Na}$ ; $FEPP_{Na}$ e $FE_{K}$ . Dados mostrados como média±erro padrão	
	da média (X±EPM). *p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de	
	Bonferroni)	
Figura 4:	Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina	
	(C) ou dose-resposta de 60 e 600µg de L-NAME e 126ng de	
	insulina (E), em volume de 3µl, em ratos Wistar Hannover na	
	diferença percentual em $\Delta$ % e da Área Total Sob a Curva (TAUC)	
	em $\Delta$ %.min no V'; FG e FE <sub>Na</sub> . Dados mostrados como	
	média±erro padrão da média (X±EPM). *; @p<0.05 (ANOVA e	
	teste de constraste de Bonferroni)	2
Figura 5:	Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina	
	(C) ou dose-resposta de 60 e 600µg de L-NAME e 126ng de	
	insulina (E), em volume de 3ul, em ratos Wistar Hannover na	
	diference percentual em $\Lambda$ % e da Área Total Sob a Curva (TAUC)	
	em $\Lambda$ % min na FEP <sub>N</sub> : FEPP <sub>N</sub> e FE <sub>N</sub> Dados mostrados como	
	módiatarra padrão do módia (V+EDM) *: $@n < 0.05$ (ANOVA o	
	teste de constructe de Ronferroni)	2
Figure 6.		
rigura v.	Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C),	

xii

de 60 e 600 µg de L-NAME em volume de 3 µl (E) e de 126 ng de insulina em volume de 3 µl (E), em ratos *Wistar Hannover*, na diferença percentual em  $\Delta$ % e na Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min, no V'; FG e FE<sub>Na</sub>. Dados mostrados como média±erro padrão da média (X ± EPM). \*; @p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).....

Figura 7: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C), de 60 e 600 μg de L-NAME em volume de 3 μl (E) e de 126 ng de insulina em volume de 3 μl (E), em ratos *Wistar Hannover*, na diferença percentual em Δ% e da Área Total Sob a Curva (TAUC) em Δ%.min, na FEP<sub>Na</sub>; FEPP<sub>Na</sub> e FE<sub>K</sub>. Dados mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM). \*: @p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni)....</p>

53

#### RESUMO

No presente estudo, foi investigado os efeitos da administração intracerebroventricular (i.c.v) aguda de insulina sobre os mecanismos centrais responsáveis pela regulação da excreção tubular renal de sódio após injeção prévia de NG-nitro-l-arginine methylester (L-NAME) em ratos não anestesiados. Ratos Wistar-Hannover Masculinos foram radomizados em cinco grupos: a) injeção i.c.v. de 0.15 M de NaCl em ratos (controle, N = 10), b) injeção i.c.v. de dose-resposta (1.26, 12.6 e 126 ng/3 $\mu$ L) em ratos (N = 10), c) Injeção i.c.v. de  $60\mu g$  de L-NAME associada com NaCl (N = 10) ou d) com insulina 126ng (N = 10), e e) Injeção de insulina subcutânea em ratos (N = 5). A insulina injetada centralmente no ventrículo lateral direito de ratos promoveu uma elevação da excreção urinária de sódio (NaCl:  $855.6 \pm 85.1\Delta$ %/min; 126 ng de insulina:  $2055 \pm 310.6\Delta$ %/min; P = 0.005) e potássio (NaCl:  $460.4 \pm 100\Delta$ %/min; 126ng insulina:  $669.2 \pm 60.8\Delta$ %/min; P = 0.025). A excreção urinaria de sódio elevada observada após a microinjeção i.c.v. de 126 ng de insulina foi atenuada significativamente com administração prévia de L-NAME (126 ng insulina:  $1935 \pm 258.3 \Delta$ %/min; L-NAME + 126 ng de insulina do:  $582.3 \pm 69.6 \Delta$ %/min; P = 0.01). A natriurese induzida pela insulina i.c.v. ocorreu através da elevação da exreção tubular renal de sódio nos segmentos pós-proximais, a despeito de uma filtração glomerular inalterada. Embora o racional para a redução da excreção urinária de sódio induzida pela prévia aadministração i.c.v. de L-NAME seguida da administração de insulina i.c.v. permanece ainda desconhecida, podemos sugerir que um dos gatilhos responsáveis pela sinalização eferente da insulina no SNC possa ser de natureza nitrérgica.

*Palavras Chaves*: Sistema nervoso central, intracerebroventricular, insulina, L-NAME, natriurese, óxido nítrico.

#### SUMMARY

In the present study, we investigated the effects of acute intracerebroventricular (icv) insulin administration on central mechanisms regulating urinary sodium excretion in N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine centrally methylester simultaneously (L-NAME)-injected unanesthetized rats. Male Wistar-Hannover rats were randomly assigned to one of five groups: a) icv 0.15 M NaCl-injected rats (control, N = 10), b) icv dose-response (1.26, 12.6 and 126 ng/3  $\mu$ L) insulin-injected rats (N = 10), c) rats *icv* injected with 60  $\mu$ g L-NAME in combination with NaCl (N = 10) or d) with insulin (N = 10), and e) subcutaneously insulininjected rats (N = 5). Centrally administered insulin produced an increase in urinary output of sodium (NaCl:  $855.6 \pm 85.1 \Delta$ %/min; 126 ng insulin:  $2055 \pm 310.6 \Delta$ %/min; P = 0.005) and potassium (NaCl: 460.4  $\pm$  100  $\Delta$ %/min; 126 ng insulin: 669.2  $\pm$  60.8  $\Delta$ %/min; P = 0.025). The urinary sodium excretion response to *icv* 126 ng insulin microinjection was significantly attenuated by combined administration of L-NAME (126 ng insulin: 1935  $\pm$ 258.3  $\Delta$ %/min; L-NAME + 126 ng insulin: 582.3 ± 69.6  $\Delta$ %/min; P = 0.01). Insulininduced natriuresis occurred by increasing post-proximal sodium excretion, despite an unchanged glomerular filtration rate. Although the rationale for decreased urinary sodium excretion induced by combined *icv* L-NAME and insulin administration is unknown, it is tempting to suggest that perhaps one of the efferent signals triggered by insulin in the CNS may be nitrergic in nature.

Key words: Central nervous system; Intracerebroventricular; Nitric oxide inhibition; Insulin; Natriuresis.

### 1-INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem sido observado um grande progresso referente à compreensão dos mecanismos fisiológicos envolvidos na manutenção do equilíbrio energético e hidroeletrolítico, bem como, um melhor entendimento dos fatores que potencialmente geram alterações destes equilíbrios (WILLIAMS et al, 2009; GALGANI & RAVUSSIN, 2008).

A manutenção de um meio interno relativamente estável (Claude Bernard, 1870) é assegurada por interações bioquímicas, fisiológicas e comportamentais; desenvolvidas ao longo da evolução. Excluindo-se o mecanismo da sede, a homeostasia da água e dos eletrólitos, no homem, é realizada quase exclusivamente por mudanças no volume e na ]]composição da urina. Em mamíferos, o hipotálamo, localizado ventralmente na região diencefálica, desempenha função homeostática sobre a regulação da temperatura corporal, do sistema cardiovascular, de funções viscerais e comportamentais, tais como: ingestão de água e alimentos, sexual e maternal, assegurando a sobrevivência da espécie. (SWANSON & SAWCHENKO, 1983; KEESEY et al, 2008; COOPER, 2008).

O reconhecimento de complexa interação existente entre sistema nervoso central e atividade de numerosos órgãos envolvidos na homeostasia da geração de energia, tem sido intensificado desde a década de 90 (WOODS & D'ALESSIO, 2008). Entretanto, deve-se a Claude Bernard (1849) a observação da função regulatória do "açúcar do sangue" através do sistema nervoso central (COOPER et al, 2008) e ANAND & BROBECK (1951) identificaram pequenas áreas bem localizadas no hipotálamo lateral. A destruição bilateral destas áreas é seguida por uma ausência completa da alimentação espontânea.

A homeostase energética é mantida por meio de um sistema neuro humoral integrado que minimiza o impacto de flutuações à curto prazo do balanço energético no tecido adiposo. Elementos essenciais para o controle deste sistema incluem hormônios secretados proporcionais à adiposidade corporal (leptina, insulina e resistina) e algumas moléculas sinalizadoras do sistema nervoso central (SNC) nas quais estes hormônios atuam. Estas moléculas sinalizadoras devem exercer efeitos potentes e unidirecionais no

balanço energético em resposta a alterações da gordura corporal (WOODS et al, 1979; <u>STEPPAN et al, 2001</u>).

Um crescente interesse ao controle hormonal da homeostasia tem sido direcionado ao estudo do diabetes mellitus tipo 2. A sua importância é relevante, pois suas principais complicações a colocam como a principal causa de cegueira, insuficiência renal crônica e amputação de membros inferiores pelo menos em paises desenvolvidos (KOPELMAN & HITMAN, 1998). É também um problema de saúde pública, com desafios epidemiológicos consideráveis (LAWAL, 2008).

A associação do diabetes mellitus e obesidade é corroborada por dados epidemiológicos (LUCAS et al, 1985; MODAN et al, 1985) mostrando que níveis elevados de insulina, bem como resistência ao seu efeito no metabolismo da glicose, têm sido relacionados com hipertensão arterial em modelos humanos e animais. O efeito periférico renal da insulina tem sido relacionado à redução da excreção urinária de sódio e esta a uma elevação persistente da pressão arterial (MONDON & REAVEN, 1988; SHEN et al, 1988; GONTIJO & MUSCELLI, 1996). Estas ações mostram uma estreita associação entre função renal e a ação da insulina quanto ao controle da pressão arterial e do metabolismo hidroeletrolítico (DEFRONZO et al, 1975; LUCAS et al, 1985; MODAN et al, 1985). A ocorrência de hipertensão arterial, obesidade e intolerância a glicose, no diabetes mellitus tipo 2, é comumente associada a um mesmo mecanismo patogenético (MODAN, 1985).

O efeito da insulina sobre a excreção urinária de sódio, em indivíduos normais, foi mostrado em vários trabalhos. Em alguns estudos, foi demonstrada ação antinatriurética tubular renal em homens (DEFRONZO et al, 1975) associada a elevação de transporte de fosfato tubular distal em estudos de micropuntura em cães (DEFRONZO et al, 1976), enquanto outros estudos demonstraram que a presença de insulina luminal estimula o transporte de sódio nos segmentos proximais do néfron isolado de coelho (BAUM, 1987) em decorrência ao aumenta da reabsorção de cloreto nos segmentos espessados da alça de Henle em ratos (KIRCHNER, 1988). Estudos utilizando *clamp* euglicêmico em indivíduos normais mostraram antinatriurese dose-resposta sem alteração da filtração glomerular (ROCCHIN et al, 1989; GANS et al, 1991).

Após administração periférica da insulina foi observado efeito antinatriurético reduzido da ação da insulina em indivíduos normotensos comparados com hipertensos (QUINÕNES-GALVAN & FERRANNINI, 1997). GONTIJO & MUSCELLI, 1996, mostraram hipoglicemia associada à redução considerável da excreção tubular renal de sódio insulina-estimulada em pacientes hipertensos em relação aos normotensos, durante o GTT oral.

Como a insulina apresenta efeito direto no transporte celular iônico (MOORE, 1983), especula-se que o efeito da insulina sobre a excreção renal de sódio seja provavelmente devido a sua ação tubular direta (SKOTT et al, 1989).

Vários estudos sugerem que o efeito antinatriurético da insulina seja, em parte, secundário a ativação do co-transporte sódio-glicose ao nível do túbulo contornado proximal e da atividade Na/KATPase ao longo de todo néfron (DeFRONZO et al, 1975; 1976, 1992; QUINÕNES-GALVAN & FERRANNINI, 1997; STENVINKEL et al, 1997).

Quanto à ação central da insulina, estudos pioneiros realizados no SNC estabeleceram um axioma de que a insulina não poderia ser requerida na utilização central da glicose por acreditarem que a insulina não pudesse atravessar a barreira hematoencefálica (CRONE, 1965). Até recentemente, o SNC não era considerado como tecido insulina-dependente. Observações de que a insulina poderia atravessar a barreira hematoencefálica foram descritas na década de 60 e 70 (MARGOLIS & ALTSZULER, 1967), sendo seus receptores identificados, bem como sua extensa distribuição ao nível deste tecido (HAVRANKOVA et al, 1978).

Posteriormente, foi identificada em cérebros de animais a presença de receptores e de concentrações de insulina questionando da possibilidade da insulina ser sintetizada e liberada no SNC, com efeitos no comportamento da ingestão de alimentos e na regulação central das funções autonômicas (HAVRANKOVA<sup>1</sup> et al, 1978),

A administração central da insulina em doses baixas ou ação endógena reduz a ingestão e perda de peso. Em contraste, a administração de anticorpos anti-insulina aumenta a ingestão e o ganho de peso (SCHWARTZ et al, 1992).

A administração exógena de insulina (através da artéria carótida, do líquido cerebroespinhal ou parênquima cerebral) promove efeitos no SNC que desencadeiam uma hipoglicemia periférica, neuralmente mediada (CHOWERS et al, 1968; SZABO & SZABO, 1972; SZABO & SZABO, 1975) bem como alterações na hemodinâmica renal e no balanço hidroeletrolítico (AGARWALA & BAPAT, 1977).

Experimentalmente, a insulina injetada aguda e centralmente promoveu natriurese neuralmente mediada, abolida pela desnervação renal bilateral (MICHELOTTO et al, 2002), e pela administração cerebrovascular de estreptozotocina (MACEDO et al, 2003). Efeito semelhante foi observado nos animais centralmente tratados com insulina i.c.v. por tempo prolongado, promovendo também uma elevação da excreção renal de sódio (MENEGON et al, 2007). Outros estudos também evidenciaram natriurese neuralmente mediada: a injeção de insulina na área periventricular promoveu redução da atividade eferente dos nervos simpáticos periféricos, abolida após destruição dos neurônios com a injeção de ácido caínico (SAKAGUCHI & BRAY, 1987); a injeção de carbacol e norepinefrina na área de septal, hipotálamo anterior lateral, orgão subfornical e porção anterior do terceiro ventrículo pode promover natriurese tubular (COVIAN et al, 1975; SAUTER et al, 1983; GONTIJO et al, 1992).

Por outro lado, SHANKAR et al, 1998 mostraram que a administração intracerebroventricular aguda de inibidor da óxido nítrico sintase (NOS), resultou em uma marcada resistência insulinica, hiperglicemia, secreção deficiente de insulina e hipertensão arterial.

O óxido nítrico (NO) um radical livre, gasoso, inorgânico, incolor, constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares. Este radical é produzido a partir da L-arginina, por uma reação mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS). Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sangüíneo. Possui função como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais (DUSSE et al, 2003).

Todas as isoformas da enzima óxido nítrico sintase podem ser inibidas por análogos da arginina N-substitutas, como a N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMMA), N-imino-etil-L-

ornitina (L-NIO), N<sup>G</sup>-amino-L-arginina (L-NAA), N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina (L-NA) e o metil éster correspondente, o N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estes análogos competem com a L-arginina e agem como inibidores estéreos específicos da NOS (MONCADA et al, 1991). Além destes inibidores, a aminoguanidina é também capaz de inibir a NOS e apresenta uma relativa seletividade para i-NOS (SZABÓ, 1995).

O NO produzido pelas células endoteliais tem um papel essencial no processo de relaxamento do vaso sangüíneo (BUSCONI & MICHEL, 1993). O NO resultante da ativação da i-NOS possui ação citotóxica e citostática, promovendo a destruição de microrganismos, parasitas e células tumorais (JAMES, 1995; MONCADA et al, 1991).

Evidências consideráveis admitem que o NO pode contribuir para algumas condições patológicas, como asma (HAMID et al, 1993), artrite reumatóide (SAKURAI et al, 1995), lesões ateroscleróticas (BUTTERY et al, 1996), tuberculose (NICHOLSON et al, 1996), esclerose múltipla (BAGASRA et al, 1995), Alzheimer (VODOVOTZ et al, 1996) e gastrite induzida por *Helicobacter pylori* (MANNICK et al, 1996).

A injeção *in bolus* intravenoso de 100 mg N<sup>G</sup>-monometil-L-arginina (L-NMA) eleva a excreção tubular renal de sódio, enquanto que injeção *in bolus* intravenoso de 10 mg de N<sup>G</sup>-Nitro-L-arginina metilester (L-NAME) não alterou a natriurese (BAYLIS et al, 1990). Em cultura de células, o óxido nítrico inibiu o transporte tubular renal de sódio diretamente na cortical do ducto coletor (STOOS et al, 1991). A inibição da NOS reduziu o fluxo plasmático da papila renal, e estas alterações hemodinâmicas intrarenais poderiam ter uma ação importante como mediadora no manuseio tubular renal do sódio induzidas pelo L-NAME. (MATTSON et al, 1992). Resposta antinatriurética, sem alteração da pressão arterial, fluxo plasmático renal e filtração glomerular foi observada em animais recebendo 1mg/kg/min de L-NAME parenteral. Entretanto a infusão parenteral de 50 mg/kg/min elevou a pressão arterial associada com uma queda do fluxo plasmático renal e da filtração glomerular com excreção tubular renal de sódio inalterada (LAHERA et al, 1991).

A inibição da NOS, em ratos, pela administração oral prolongada de L-NAME promoveu elevação da pressão arterial associada a elevação da excreção renal tubular de sódio, apesar da redução da filtração glomerular (GRANGER, 1986; MATTSON et al, 1992). Em outro estudo, a elevação da pressão arterial após a inibição endovenosa prolongada da NOS, pode ser parcialmente mediada pela atividade da enervação renal, havendo atenuação da hipertensão arterial induzida por L-NAME após desnervação renal bilateral, por promover reduções adicionais da reabsorção de sódio nos segmentos pósproximais de néfrons (XAVIER et al, 2000). A administração parenteral de inibidores da NOS aumentou a atividade do nervo simpático renal, a secção medula espinal aboliu este efeito (SAKUMA et al, 1992).

A injeção de inibidores da NOS na cisterna magna (TOGASHI et al, 1992), no núcleo do trato solitário (HARADA et al, 1993) e na medula rostral ventrolateral (SHAPOVAL et al, 1991) promoveram elevação da pressão arterial e da atividade do nervo simpático renal.

A inibição da enzima óxido nítrico sintase com doses baixas de L-NAME em ratos com rins intactos, promoveu elevação da diurese-pressórica, abolida em ratos com desnervação renal bilateral. O efeito natriurético do L-NAME em ratos enervados pode ser atribuído à inibição do tônus simpático secundário à elevação da pressão arterial. A inibição da enzima óxido nítrico sintase com doses elevadas de L-NAME aboliu a diurese-pressórica independente da enervação renal (MADRID et al, 1998).

Foi sugerido que uma provável rota central NO-dependente possa controlar a ação de insulina na função renal e este sistema poderia estar relacionado também com as alterações do circuito da insulina cerebral (BAYLIS et al, 1990).

HEIDENREICH et al, 1988 e LANSDSBERG & KRIEGER, 1989, mostraram experimentalmente, que o cérebro não responde a doses elevadas de insulina, enquanto CHOWERS et al, 1966 e KUO et al, 1993, mostraram que doses elevadas de insulina i.c.v. não alteraram o nível de glicose no liquor, sustentando a hipótese de que o efeito de insulina i.c.v. não foi mediado por privação de glicose. Foi mostrado também que a insulina central pode levar a redução da glicemia com insulinemia inalterada, podendo ser o responsável por mudanças provocadas pela insulina no SNC sobre o metabolismo da glicose (MICHELOTTO et al, 2002 e FURLAN et al, 2003, MACEDO et al, 2003). Estes

achados notáveis sugerem que uma via nitrérgica também possa modular mecanismos de sinalização de insulina.

A natriurese promovida pela insulina é atenuada após tratamento prévio dos animais pela administração sistêmica de L-NAME. Este achado é pelo menos em parte, relacionado às mudanças no SNC via neural dependente do óxido nítrico, sugerindo ser a via nitrérgica moduladora do sinal neural eferente renal (FURLAN et al, 2003).

As escassas informações, sobre o mecanismo neural mediador dos efeitos da administração de insulina i.c.v. no manuseio renal de sódio nos ratos, coloca a insulina como precursores de neuropeptideo que possivelmente interagem com o sistema nitrérgico.

Como hipótese, foi sugerida que a ação de insulina no SNC pode ser modulada pelo óxido nítrico através da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) alterando a excreção urinaria de sódio. Para testar esta hipótese, foram investigados os efeitos da insulina i.c.v. aguda nos mecanismos centrais responsáveis pela regulação da excreção urinaria sódio em ratos após injeção central simultânea de insulina após administração prévia de L-NAME em ratos não anestesiado em relação ao grupo de controle relacionado.

#### **2-OBJETIVOS**

### GERAL

Avaliar se a ação da insulina no SNC pode ser modulada pelo óxido nítrico através da atividade da enzima óxido nítrico sintase (NOS) sobre a função renal, após administração i.c.v. de isulina e L-NAME no ventrículo lateral direito de ratos íntegros.

## **ESPECÍFICOS**

Estudar os efeitos dose-resposta de insulina ou L-NAME administrados i.c.v. no ventrículo lateral direito sobre a filtração glomerular e manuseio tubular renal de sódio.

Estudar os efeitos dose-resposta da administração prévia de L-NAME i.c.v. seguida da administração de dose elevada de insulina i.c.v. no ventrículo lateral direito sobre a filtração glomerular e manuseio tubular renalde sódio.

## **3-MATERIAIS E MÉTODOS**

Foram utilizados nos experimentos ratos machos *Wistar-Hannover* procedentes do Centro de Bioterismo da Universidade Estadual de Campinas-SP, com peso variando entre 250 a 320 gramas e idade entre 10 e 12 semanas. Os animais permaneceram no laboratório até a implantação das cânulas em gaiolas coletivas com até 5 animais, com livre acesso à ingestão sólida de ração para ratos LABINA (Purina) e água em sala com temperatura ambiente.

#### Manipulação cirúrgica

#### Cirurgia para implante da cânula intracerebroventricular

Para a confecção das cânulas externas foram utilizadas cânulas metálicas (Ibrás S.A, Campinas – SP) com diâmetro externo de 0.9 mm e diâmetro interno de 0.6 mm, com 15 mm no seu comprimento total. Uma agulha de Mizzy - cânula de infusão – e um obturador, com comprimento de 16 mm foram também utilizados.

Após uma noite em jejum, os animais submetidos ao implante de cânula intracerebroventricular foram anestesiados com pentobarbital sódico na dose de 10 mg/100g de peso (Cristália Lab., S.P., Brasil) via intraperitonial e colocados em aparelho estereotáxico (Stoelting Co, Modelo 234, USA).

A coordenada vertical foi posicionada a 90° do plano horizontal. Os animais foram posicionados apropriadamente no aparelho mediante prendedores acoplados à cabeça e ao focinho. Após antissepsia, uma incisão na linha média do escalpo foi realizada de maneira a obter exposição da sutura sagital. O periósteo foi aberto e refletido do campo cirúrgico. As coordenadas anteroposterior, lateral e dorsoventral para acesso da cânula no ventrículo cerebral lateral direito foram determinadas pelo Atlas de Pellegrino e seus valores foram: -0,2 mm; 1,5 mm e 2,8 mm, respectivamente. O bregma foi usado como ponto de referência, procedendo-se a trepanação do crânio junto ao osso frontal, na junção das coordenadas lateral e anteroposterior (Figura 1).

Cuidados especiais foram tomados de maneira a se evitar lesões de estruturas vasculares e de parênquima cerebral. Três outros orifícios foram posteriormente abertos ao redor do orifício central, sendo neles colocados parafusos de aço inoxidável. A cânula externa foi posicionada no orifício central e abaixada cuidadosamente até o ponto exato da coordenada dorsoventral.



Figura 1: Corte frontal do encéfalo de rato de 250g (10 a 12 semanas)

(A Stereotaxic Atlas of the Rat Brain, Louis Pellegrino, Plenum Press 1979, USA)

A cânula foi fixada ao crânio utilizando-se cimento acrílico (Acrílico polimerizável. Jet, Brasil), após a obtenção de conveniente e desejável hemostasia (SHANKAR et al, 1998). Após a polimerização do cimento, com consequente fixação segura da cânula, a cânula foi liberada do braço do aparelho estereotáxico e uma guia foi inserida dentro da cânula externa.

Os animais foram retirados e colocados em caixas aquecidas, para se evitar hipotermia, até a completa recuperação. Posteriormente foram alojados, nas mesmas

condições iniciais, por 6 dias. Os cuidados diários foram rigorosamente seguidos, de maneira que fossem evitados acidentes como mau posicionamento ou obstrução da cânula, avulsão do cimento acrílico e infecções.

#### **Considerações gerais**

Em todos os animais procedeu-se à administração por gavagem de 60 µmol de LiCl/100g peso, cerca de 14 horas antes dos testes renais. Após 1 noite de jejum, cada animal recebeu uma sobrecarga hídrica de água potável em volume correspondente a 5% de seu peso corporal, não se excedendo, entretanto, volume superior a 15 ml. Uma segunda sobrecarga, após cuidadoso esvaziamento vesical, com o mesmo volume, foi administrada uma hora após. Os animais foram subsequentemente mantidos em gaiolas metabólicas individuais. Em todos os experimentos, um período de 30 minutos após a segunda gavagem, foi considerado.

Após esses procedimentos, a urina eliminada espontaneamente passava por um funil localizado na parte inferior da gaiola e era coletada em tubos graduados por períodos de tempo previamente estabelecidos. A seguir, após mensuração do volume obtido, a urina era acondicionada em tubos de vidro, que eram sistematicamente colocados em recipiente com gelo moído.

As injeções i.c.v. tinham volume de 3  $\mu$ l. Todas as diluições foram realizadas com solução salina de 0.15 M de NaCl. Utilizou-se insulina regular (100 U/ml, Biobrás, Brasil) e N<sup> $\Omega$ </sup>nitro-L-arginina metil ester (L-NAME) (25g, Sigma, St Louis, USA).

Ao final dos experimentos, os animais eram anestesiados mediante inalação de vapor de éter etílico e as amostras de sangue foram obtidas por punção cardíaca direta, após ampla e rápida abertura da cavidade torácica mediante dissecção romba. Imediatamente procedia-se à centrifugação do sangue colhido. As várias amostras de plasma e urina foram mantidas hermeticamente fechadas em refrigerador com temperatura mínima de -50 °C.

O rim esquerdo era então excisado para posterior avaliação ponderal, bem como para observação direta de alterações patológicas macroscópicas.

#### Grupos de experimentos

Os ratos foram aleatoriamente separados em 2 grupos:

#### 1-CONTROLE

**1.1-**Controle (C): injeção i.c.v. de 0.15 M de NaCl em ratos (n = 37) em volume de 3µl.

#### **2-EXPERIMENTAL**:

**2.1-**Injeção i.c.v. de dose-resposta de insulina em ratos: 1.26 ng (n = 12); 12.6 ng (n = 10) e 126 ng (n = 15) de insulina regular em um volume de 3  $\mu$ l.

**2.2-**Injeção i.c.v. de dose-resposta de L-NAME em ratos: 60  $\mu$ g (n = 6) e 600  $\mu$ g (n = 10) de L-NAME em um volume de 3 $\mu$ l.

**2.3-**Injeção i.c.v. de L-NAME 60  $\mu$ g (n = 8) e 600  $\mu$ g (n = 11) em volume de 3 $\mu$ l, 10 minutos antes da injeção i.c.v. de 126 ng de insulina regular em volume de 3 $\mu$ l.

Os diversos protocolos realizados foram separados nos grupos denominados: **A**, **B** e **C**. Em todos os experimentos foram sempre considerados 2 grupos de animais: grupo controle e grupo experimental. O período de 30 minutos após a segunda sobrecarga hídrica, denominado período controle, antecedeu qualquer procedimento. Em todos os protocolos foram considerados 4 períodos experimentais, de 30 minutos cada, com coletas de urina aos 30, 60, 90 e 120 minutos.

#### **Desenho Experimental A**

O desenho experimental **A** foi realizado com a finalidade de estudar o comportamento da curva dose-resposta de insulina administrada i.c.v. em ratos intactos.

#### Protocolo 1 – Insulina i.c.v.

Após as sobrecargas hídricas, para o grupo controle foi injetado um volume de 3  $\mu$ l de salina 0,9% e para o grupo experimental foram injetadas, dose baixa (1.26 ng i.c.v.),

dose média (12.6 ng i.c.v.) e dose alta (126 ng i.c.v.) de insulina regular em volume de 3 µl de salina 0.9% (SHANKAR et al, 1998).



#### **Desenho Experimental B**

O desenho experimental B foi realizado com a finalidade de estudar o comportamento da curva dose-resposta de L-NAME i.c.v. em ratos intactos.

### Protocolo 2 – L-NAME i.c.v.

Após as sobrecargas hídricas, para o grupo controle foi injetado um volume de  $3\mu$ l de salina 0,9% e para o grupo experimental foram injetadas, dose baixa (60  $\mu$ g i.c.v.) e dose alta (600  $\mu$ g i.c.v.) de L-NAME (LIU et al, 1998) e dose alta (126 ng i.c.v.) de insulina regular, respectivamente, dissolvidos em um volume de 3  $\mu$ l de salina 0.9%.



#### **Desenho experimental C**

O desenho experimental C foi realizado com a finalidade de estudar o comportamento da curva resposta de insulina após prévia administração de L-NAME intracerebroventricular em ratos intactos. O protocolo 3 corresponde a esse desenho experimental, considerou-se, com finalidade operacional, um período de 10 minutos entre o

final do período controle e do período experimental após prévia administração de L-NAME intracerebroventricular em ratos intactos e o início do período experimental após administração de insulina intracerebroventricular em ratos intactos, recebendo um volume total de injeção de 3 µl. Ao final do período controle (tempo zero) os animais do grupo controle receberam solução salina 0,9%, enquanto os do grupo experimental receberam L-NAME. Ao final de 10 minutos iniciava-se a injeção de insulina no grupo experimental.

#### Protocolo 3 - L-NAME 60-600 µg + Insulina 126 ng

Após as sobrecargas hídricas, para o grupo controle foi injetado, salina 0.9% i.c.v. para o C (Controle) em um volume de 3  $\mu$ l e para o grupo experimental foi injetado dose baixa (60  $\mu$ g i.c.v.) e com dose alta (600  $\mu$ g i.c.v.) de L-NAME em um volume de 3  $\mu$ l. 10 minutos após foi injetado dose alta (126 ng i.c.v.) de insulina regular em um volume de 3  $\mu$ l, respectivamente.



#### Parâmetros analisados

Para análise dos dados, foi calculada a média aritmética dos valores obtidos em cada um dos intervalos dos respectivos períodos. Esta média foi então comparada aos valores correspondentes no mesmo período entre todos os outros grupos. Todos os parâmetros da função renal foram calculados em relação a 100g do peso corporal do animal.

#### Volume minuto urinário: V'

O V' coletado no período foi dividido por 30. Os resultados obtidos em  $\mu$ l/min/100g são expressos como  $\Delta$  de V'.

#### Filtração Glomerular: RFG

A medição foi realizada pelo clearance de creatinina pelo método do picrato alcalino, segundo a técnica de Jaffé, com leitura final em espectrofotômetro (Micronal, NV 260. Brasil). O clearance de creatinina foi calculado segundo a fórmula :

$$RFG = \frac{U_{Cr} \times V'}{PCr}$$

Onde,

 $U_{Cr}$  = concentração de creatinina na urina em mg/dl

 $P_{Cr}$  = concentração de creatinina no plasma em mg/dl

V' = volume urinário em  $\mu$ l/min.

Os resultados obtidos em  $\mu$ l/min/100g são expressos como  $\Delta$  da FG.

#### Fração de excreção de sódio : FE<sub>Na</sub>

A fração de excreção de sódio foi calculada segundo a fórmula :

$$FE_{Na} = \frac{U_{Na} \times V'}{PNa \times CCr} \times 100$$

- - -

Onde,

 $U_{Na}$  = concentração de sódio na urina em mEq/l

- V' = volume urinário em  $\mu$ l/min.
- $P_{\text{Na}}$  = concentração de sódio no plasma em mEq/l
- $C_{Cr}$  = clearance de creatinina 100=conversão a porcentagem

Os resultados obtidos em porcentagem são expressos como  $\Delta$  da FE<sub>Na</sub>.

#### Fração de excreção de potássio: FE<sub>K</sub>.

A fração de excreção de potássio foi calculada segundo a fórmula:

$$FE_K = \frac{U_K \times V'}{P_K \times CCr} \times 100$$

Onde,

- $U_K$  = concentração de potássio no filtrado glomerular em mEq/l
- V' = volume urinário em  $\mu$ l/min.
- $P_{K}$  = concentração de potássio no plasma em mEq/l
- $C_{Cr}$  = clearance de creatinina
- 100 = conversão a porcentagem

Os resultados obtidos em porcentagem são expressos em  $\Delta$  da FE<sub>K</sub>.

#### Fração de excreção proximal de sódio: FEP<sub>Na</sub>

A fração de excreção proximal de sódio foi calculada pela fórmula,

$$FEPNa = \frac{CLi}{CCr} \times 100$$

Onde,

- $C_{Li}$  = clearance de lítio em  $\mu$ l/min.
- $C_{Cr}$  = clearance de creatinina em  $\mu$ l/min.
- 100 = conversão a porcentagem

Os resultados obtidos em porcentagem são expressos em  $\Delta$  da FEP<sub>Na</sub>.

#### Fração de excreção pós-proximal de sódio: FEPP<sub>Na</sub>

A fração de excreção pós-proximal de sódio foi calculada pela fórmula,

$$FEPPNa = \frac{CNa}{CLi} \times 100$$

Onde,

 $C_{Na}$  = clearance de sódio em  $\mu$ l/min.

 $C_{Li}$  = clearance de lítio em  $\mu$ l/min.

100 = conversão a porcentagem

Os resultados obtidos em porcentagem são expressos como  $\Delta$  da FEPP<sub>Na</sub>.

#### Análise Estatística

A análise estatística dos dados das curvas foi realizada pela análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas. Quando os resultados foram significantes, o teste de contraste de Bonferroni foi utilizado para determinar a extensão das diferenças. Um valor de p<0.05 foi considerado para indicar diferença significativa.

#### **4-RESULTADOS**

#### 4.1-Massa corporal

A massa corporal dos animais no início dos experimentos, apresentada na Tabela 7 do Anexo 1. Para efeito de cálculo dos vários parâmetros normalizou-se os valores das massas corporais dos animais dividindo por 100.

#### 4.2-Resultados do desenho experimental A

Os resultados do desenho experimental A, expresso como diferença percentual ( $\Delta$ ) em  $\Delta$ %, em relação ao Controle, são apresentados nas Tabelas 1 (Anexo 1) e nas Figuras 2-3. A análise estatística entre os períodos, aos 30, 60, 90 e 120 minutos, foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA). Quando os resultados foram significativos utilizouse o teste de contraste de Bonferroni para a discriminação das diferenças.

Os resultados do desenho experimental A, expresso como Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min, em relação ao Controle, são apresentados na Tabela 2 (Anexo 1) e nas Figuras 2-3. A análise estatística entre grupos foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA). Quando os resultados foram significativos utilizou-se o teste de contraste de Bonferroni para a discriminação das diferenças.

#### 4.2.1-Protocolo 1 – Insulina i.c.v.

Os resultados dos parâmetros iniciais encontram-se nas Tabelas 1 e 2 do Anexo 1.

#### 4.2.1.1-Volume urinário minuto (V') – diferença percentual em $\Delta$ %.

Na Figura 2, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo Controle i.c.v. foram: 86.7  $\pm$  10.1; 136.1  $\pm$  17.5; 108.9  $\pm$  19 e 44.1  $\pm$  21.5  $\Delta$ %, para o grupo insulina 1.26 ng i.c.v. foram: 77.3  $\pm$  14.7; 144.1  $\pm$  22.9; 154.5  $\pm$  28.8 e 88.4  $\pm$  50.7  $\Delta$ %, para o grupo insulina 12.6 ng i.c.v. foram: 75.6  $\pm$  11.8; 196.2  $\pm$ 50.1; 187.3  $\pm$  71.5 e 92.8  $\pm$  75.3  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 137.2  $\pm$  26.1; 182.2  $\pm$  28.9; 58.1  $\pm$  23.9 e -11.8  $\pm$  15.7  $\Delta$ %. Os resultados não foram considerados significativos para p<0.05.

#### 4.2.1.2-Volume minuto urinário (V') - Área Total Sob a Curva em Δ%.min.

Na Figura 2, as para os grupos Controle e insulina 1.26; 12.6 e 126 ng foram:  $610.3 \pm 49.6$ ;  $681.4 \pm 79.1$ ;  $767.6 \pm 160.1$  e  $602.9 \pm 52.6 \Delta$ %.min, respectivamente. O resultado não foi considerado significativo para p<0.05.

#### 4.2.1.3-Filtração glomerular (FG) - Diferença percentual em $\Delta$ %.

Na figura 2, as médias±erro padrão das médias (X±EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos, para o grupo Controle foram:  $8.3 \pm 4.8$ ;  $9.2 \pm 4.2$ ;  $3.5 \pm 5.6$  e  $-7.9 \pm 6.9 \Delta$ %, para o grupo insulina 1.26 ng i.c.v. foram  $14.1 \pm 6.9$ ;  $1.1 \pm 4.3$ ;  $8.1 \pm 6.3$  e  $-10.5 \pm 14.8 \Delta$ %, para o grupo insulina 12.6 ng i.c.v. foram  $4.4 \pm 6.5$ ;  $15 \pm 6.8$ ;  $8 \pm 10.3$  e  $-18.7 \pm 9.8\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram  $19.3 \pm 8.4$ ;  $32.2 \pm 10.1$ ;  $18.2 \pm 7.8$  e  $25.9 \pm 16.3\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 60 minutos.

Aos 60 minutos

FG insulina 126 ng > FG Controle e insulina 12.6 ng

### 4.2.1.4-Filtração glomerular (FG) - Área Total Sob a Curva em ∆%.min.

Na figura 2, as médias ± erro padrão das médias (X ± EPM) para os grupos Controle; insulina 1.26; 12.6 e 126 ng intracerebroventricular foram: 312.9 ± 11.7; 311.0 ± 17.1; 315.8 ± 17.6 e 372.9 ± 25.4 Δ%.min, respectivamente. O resultado não foi considerado significativo (p<0.05).</p>

#### 4.2.1.5-Fração de Excreção de Sódio (FE<sub>Na</sub>) - Diferença percentual em $\Delta$ %.

Na figura 2, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo Controle i.c.v. foram: 67.1  $\pm$  18.6; 191.1  $\pm$  35.9; 177.1  $\pm$  31.9 e 307.9  $\pm$  120.1  $\Delta$ %, para o grupo insulina 1.26 ng i.c.v. foram 68.8  $\pm$  41.1; 270.5  $\pm$  113.4;  $371.8 \pm 137.1 \text{ e } 424.4 \pm 111.1 \Delta\%$ , para o grupo insulina 12.6 ng i.c.v. foram 96.5 ± 55.7; 253.4 ± 145.1; 344.6 ± 151.1 e 1030.6 ± 773.2  $\Delta\%$  e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram 138.3 ± 49; 447.4 ± 97.8; 713.1 ± 214.5 e 1050.9 ± 252.9  $\Delta\%$ . Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 60 e 90 minutos.

Aos 60 e 90 minutos

 $FE_{Na}$  insulina 126 ng >  $FE_{Na}$  Controle

# 4.2.1.6-Fração de Excreção de Sódio (FE<sub>Na</sub>) - Área Total Sob a Curva em $\Delta$ %.min.

Na figura 2, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos Controle; insulina 1.26; 12.6 e 126 ng intracerebroventricular foram: 855.6  $\pm$  115.3; 1189.9  $\pm$  308.9; 1461.6  $\pm$  593.6 e 2054.9  $\pm$  211.5  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado foi considerado significativo pelo teste de Bonferroni (p<0.05) para a insulina 126 ng intracerebroventricular em relação ao Controle.

TAUC insulina 126 ng > TAUC Controle

# 4.2.1.7-Fração de Excreção Proximal de Sódio (FEP<sub>Na</sub>) – Diferença percentual em $\Delta$ %.

Na figura 3, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo Controle i.c.v. foram: 50.2  $\pm$  12.6; 84.6  $\pm$  15.6; 93.5  $\pm$  17.8 e 108.3  $\pm$  18.6  $\Delta$ %, para o grupo insulina 1.26 ng i.c.v. foram: 55.7  $\pm$  25.5; 144.3  $\pm$  44.9; 154.1  $\pm$  51.2 e 207.4  $\pm$  82.6  $\Delta$ %, para o grupo insulina 12.6 ng i.c.v. foram: 18.7  $\pm$  9.5; 60.2  $\pm$  18.1; 58.6  $\pm$  8.4 e 118.6  $\pm$  47.6  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 83.4  $\pm$ 28.7; 89.1  $\pm$  17.6; 106.3  $\pm$  20.1 e 115.5  $\pm$  30.3  $\Delta$ %. Os resultados não foram considerados significativos para p<0.05.

4.2.1.8-Fração de Excreção Proximal de Sódio (FEP<sub>Na</sub>) - Área Total Sob a Curva em  $\Delta$ %.min.

Na figura 3, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para o grupo Controle, insulina 1.26; 12.6 e 126 ng intracerebroventricular foram: 557.4 $\pm$ 44.4; 729.8 $\pm$ 130.5; 487.4 $\pm$ 26.0 e 594.6 $\pm$ 58.4  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado não foi considerado significativo para p<0.05.

# 4.2.1.9-Fração de Excreção Pós-proximal de Sódio (FEPP<sub>Na</sub>) – Diferença percentual em $\Delta$ %.

Na figura 3, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo Controle i.c.v. foram: 6.1  $\pm$  8.5; 59.9  $\pm$  26.8; 40.4  $\pm$  16.9 e 38.1  $\pm$  16.5  $\Delta$ %, para o grupo insulina 1.26 ng i.c.v. foram: 43.3  $\pm$  38.3; 89.6  $\pm$  54.8; 109.5  $\pm$ 65.1 e 137.1  $\pm$  58.7 $\Delta$ %, para o grupo insulina 12.6 ng i.c.v. foram: 70.3  $\pm$  51.5; 82.4  $\pm$  61.1; 146.1  $\pm$  78.7 e 192.3  $\pm$  116.4  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 21.9  $\pm$  24.1; 137.3  $\pm$  47.3; 187.7  $\pm$  84.6 e 275.1  $\pm$  85.5 $\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 120 minutos.

> Aos 120 minutos FEPP<sub>Na</sub> insulina 126 ng > FEPP<sub>Na</sub> Controle

# 4.2.1.10-Fração de Excreção Pós-proximal de Sódio (FEPP<sub>Na</sub>) - Área Total Sob a Curva em $\Delta$ %.min.

Na figura 3 as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para o grupo Controle; insulina 1.26; 12.6 e 126 ng intracereventricular foram: 422.5  $\pm$  50.7; 589.3  $\pm$  76.1; 659.9  $\pm$ 94.2 e 773.6  $\pm$  114.0  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado foi considerado significativo pelo teste de Bonferroni (p<0.05) para a insulina 126 ng intracerebroventricular em relação ao Controle.

TAUC insulina 126 ng > TAUC Controle
#### 4.2.1.11-Fração de Excreção Potássio (FE<sub>K</sub>) – Diferença percentual em $\Delta$ %.

Na figura 3, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo Controle foram: 15.5  $\pm$  8.2; 37.4  $\pm$  8.2; 63.5  $\pm$  10.8 e 103.5  $\pm$ 20.1  $\Delta$ %; para o grupo insulina 1.26 ng i.c.v. foram: 27.5  $\pm$  7.5; 85.5  $\pm$  19.1; 85.6  $\pm$  26.4 e 328.2  $\pm$  165.2  $\Delta$ % e para o grupo insulina 12.6 ng i.c.v. foram: 44.1  $\pm$  49.1; 70.2  $\pm$  54.5; 97.6  $\pm$  39.2; 362.7  $\pm$  226.9  $\Delta$ %. As X  $\pm$  EPM para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram 40.4  $\pm$  14.1; 95.2  $\pm$  15.6; 157.4  $\pm$  38.2 e 194.1  $\pm$  36.4  $\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 60 e 90 minutos.

> Aos 60 e 90 minutos  $FE_{K}$  insulina 126 µg >  $FE_{K}$  Controle

## **4.2.1.12-Fração de Excreção Potássio (FE<sub>K</sub>) - Área Total Sob a Curva em** Δ %.min.

Figura 3, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos Controle; insulina 1.26; 12.6 e 126 ng intracerebroventricular foram: 460.4  $\pm$  28.5; 649.0  $\pm$  100.8; 671.2  $\pm$  175.9 e 669.2  $\pm$  70.8 $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado foi considerado significativo pelo teste de Bonferroni (p<0.05) da insulina 126 ng intracerebroventricular em relação ao Controle.

TAUC insulina 126 ng > TAUC Controle



Figura 2: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou doseresposta de 1.26, 12.6 e 126 ng de insulina (E) em volume de  $3\mu$ l, em ratos *Wistar Hannover* na diferença percentual em  $\Delta$ % e na Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min no V'; FG e FE<sub>Na</sub>. Dados mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM). \*p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).



Figura 3: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de salina (C) ou doseresposta de 1.26, 12.6 e 126 ng de insulina (E) em volume de  $3\mu$ l, em ratos *Wistar Hannover* na diferença percentual em  $\Delta$ % e na Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min, na FEP<sub>Na</sub>; FEPP<sub>Na</sub> e FE<sub>K</sub>. Dados mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM). \*p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).

#### 4.3-Resultados do desenho experimental B

Os resultados do desenho experimental B, expresso como diferença percentual ( $\Delta$ ) em  $\Delta$ %, em relação ao Controle, são apresentados nas Tabelas 3 (Anexo 1) e nas Figuras 4-5. A análise estatística entre os períodos, aos 30, 60, 90 e 120 minutos, foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA). Quando os resultados foram significativos utilizou-se o teste de contraste de Bonferroni para a discriminação das diferenças.

Os resultados do desenho experimental B, expresso como Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min, em relação ao Controle, são apresentados na Tabela 4 (Anexo 1) e nas Figuras 4-5. A análise estatística entre os grupos foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA). Quando os resultados foram significativos utilizou-se o teste de contraste de Bonferroni para a discriminação das diferenças.

#### 4.3.1-Protocolo 2 – L-NAME i.c.v.

Os resultados dos parâmetros iniciais encontram-se nas Tabelas 3 e 4 do Anexo 1.

#### 4.3.1.1-Volume urinário minuto (V') – diferença percentual em Δ%

Na Figura 4, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo Controle i.c.v. foram: 86.7  $\pm$  10.1; 136.1  $\pm$  17.5; 108.9  $\pm$  19.1 e 44.1  $\pm$  21.5 $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 95.4  $\pm$  34.2; 153.8  $\pm$  80.7; 101.9  $\pm$  92.6 e 53.6  $\pm$  99.7  $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 61.7  $\pm$  19.5; 173.4  $\pm$ 28.5; 151.1  $\pm$  31.2 e 82.4  $\pm$  26.1  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 137.1  $\pm$ 26.1; 182.2  $\pm$  28.9; 58.1  $\pm$  23.9 e -11.8  $\pm$  15.7  $\Delta$ %. Os resultados não foram considerados significativos para p<0.05.

#### 4.3.1.2-Volume minuto urinário (V') - Área Total Sob a Curva em Δ%.min.

Na Figura 4, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos Controle; L-NAME 60 e 600 µg e insulina 126 ng intracerebroventricular foram: 610.3  $\pm$  49.6; 576.9  $\pm$  207.9; 696.4  $\pm$  72.3 e 602.9  $\pm$  52.6  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado não foi considerado significativo para p<0.05.

#### 4.3.1.3-Filtração glomerular (FG) - Diferença percentual em ∆%

Na figura 4, as médias±erro padrão das médias (X±EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo Controle i.c.v. foram:  $8.3 \pm 4.8$ ;  $9.2 \pm 4.2$ ;  $3.5 \pm 5.6$  e  $-7.9 \pm 6.9 \Delta$ %, para o grupo L-NAME 60 µg i.c.v. foram:  $14.9 \pm 24.2$ ;  $28.3 \pm 32.3$ ;  $2.2 \pm 27.1$  e  $-2.7 \pm$  $36.1\Delta$ %, para o grupo L-NAME 600 µg i.c.v. foram:  $23.0 \pm 12.8$ ;  $17.1 \pm 9.2$ ;  $32.9 \pm 17.3$  e  $0.2 \pm 11.1 \Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram:  $19.3 \pm 8.4$ ;  $32.2 \pm 10.1$ ;  $18.2\pm7.8$ e  $25.9\pm16.3\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 60 minutos.

Aos 60 minutos

FG insulina 126 ng > FG Controle

#### 4.3.1.4-Filtração glomerular (FG) - Área Total Sob a Curva em ∆%.min

Na figura 4, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos Controle; L-NAME 60 e 600 µg e insulina 126 ng foram: 312.9  $\pm$  11.7; 293.7  $\pm$  79.6; 362.2  $\pm$  28.3 e 372.9  $\pm$  25.4  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado não foi considerado significativo (p<0.05).

#### 4.3.1.5-Fração de Excreção de Sódio (FE<sub>Na</sub>) - Diferença percentual em $\Delta$ %

Na figura 4, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para grupo Controle i.c.v. foram: 67.4  $\pm$  18.6; 191.1  $\pm$  35.9; 177.1  $\pm$  31.9 e 307.9  $\pm$  120.1  $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 51.4  $\pm$  54.1; 167.1  $\pm$  146.7; 170.5  $\pm$  135.0 e 269.8  $\pm$  207.2  $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 286.5  $\pm$ 166.5; 471.2  $\pm$  212.5; 346.5  $\pm$  123.3 e 584.4  $\pm$  237.1  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram 138.3  $\pm$  49.1; 447.4  $\pm$  97.8; 713.1  $\pm$  214.5 e 1050.9  $\pm$  252.9  $\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 60 e 90 minutos. Aos 60 e 90 minutos

 $FE_{Na}$  insulina 126 ng >  $FE_{Na}$  Controle

## 4.3.1.6-Fração de Excreção de Sódio (FE<sub>Na</sub>) - Área Total Sob a Curva em Δ %.min.

Na figura 4, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos Controle; L-NAME 60 e 600 µg e insulina 126 ng intracerebroventricular foram: 855.6  $\pm$  115.3; 798.1  $\pm$  110.9; 1553.1  $\pm$  150.7 e 2054.9  $\pm$  211.5  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado foi considerado significativo pelo teste de Bonferroni (p<0.05) para o L-NAME 60 µg em relação a insulina 12.6 ng e 600 µg e insulina 12.6 µg em relação ao controle, intracerebroventricularmente.

> TAUC L-NAME 600 μg e insulina 126 ng > TAUC Controle TAUC L-NAME 60 μg < TAUC insulina 126 ng

### 4.3.1.7-Fração de Excreção Proximal de Sódio (FEP<sub>Na</sub>) – Diferença percentual em $\Delta$ %.

Na figura 5, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para grupo Controle i.c.v. foram: 50.2  $\pm$  12.6; 84.6  $\pm$  15.6; 93.5  $\pm$  17.8 e 108.3  $\pm$  18.6  $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 89.5  $\pm$  53.6; 108.1  $\pm$  65.2; 118.9  $\pm$  68.4 e 90.4  $\pm$  63.6  $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 600 µg i.c.v. foram 86.3  $\pm$  28.1; 164.0  $\pm$  46.1; 101.8  $\pm$  36.4 e 128.3  $\pm$  52.2  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 83.4  $\pm$  28.7; 89.1  $\pm$  17.6; 106.3  $\pm$  20.1 e 115.5  $\pm$  30.3  $\Delta$ %. Os resultados não foram considerados significativos para p<0.05.

## 4.3.1.8-Fração de Excreção Proximal de Sódio (FEP<sub>Na</sub>) - Área Total Sob a Curva em Δ%.min

Na figura 5, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos Controle; L-NAME 60 e 600 µg e insulina 126 ng intracerebroventricular foram: 557.4  $\pm$  44.4; 617.0  $\pm$  178.3; 673.2  $\pm$  109.1 e 594.6  $\pm$  58.4  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado não foi considerado significativo para p<0.05.

## 4.3.1.9-Fração de Excreção Pós-proximal de Sódio (FEPP<sub>Na</sub>) – Diferença percentual em $\Delta$ %

Na figura 5, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X $\pm$ EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para grupo Controle i.c.v. foram: 6.1  $\pm$  8.5; 59.9  $\pm$  26.8; 40.4  $\pm$  16.9 e 38.1  $\pm$ 16.5  $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 16.4  $\pm$  17.8; 19.1  $\pm$  20.2; 52.6  $\pm$  27.8 e 110.4  $\pm$  60.5  $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 52.4  $\pm$  41.4; 119.4  $\pm$  58.1; 93.7  $\pm$  30.8 e 137.2  $\pm$  46.0  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 21.9  $\pm$  24.1; 137.3  $\pm$  47.3; 187.7  $\pm$  84.6 e 275.1  $\pm$  85.5  $\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 120 minutos.

Aos 120 minutos

 $FEPP_{Na}$  insulina 126 ng >  $FEPP_{Na}$  Controle

### 4.3.1.10-Fração de Excreção Pós-proximal de Sódio (FEPP<sub>Na</sub>) - Área Total Sob a Curva em Δ%.min.

Na figura 5, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos Controle; L-NAME 60 e 600 µg e insulina 126 ng intracerebroventricular foram: 422.5  $\pm$  50.7; 432.1  $\pm$  53.4; 608.3  $\pm$  111.3 e 773.6  $\pm$  114.0 $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado foi considerado significativo pelo teste de Bonferroni (p<0.05) para L-NAME 60 µg i.c.v. em relação a insulina 126 ng e insulina 126 ng i.c.v. em relação ao controle.

> TAUC insulina 126 ng > TAUC Controle TAUC L-NAME 60 μg < TAUC insulina 126 ng

#### 4.3.1.11-Fração de Excreção Potássio (FE<sub>K</sub>) – Diferença percentual em Δ%

Na figura 4, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para grupo Controle foram: 15.5  $\pm$  8.2; 37.4  $\pm$  8.2; 63.5  $\pm$  10.8 e 103.5  $\pm$ 20.1  $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 43.1  $\pm$  41.8; 83.7  $\pm$  59.0; 133.8  $\pm$  77.0 e 109.3  $\pm$  69.0  $\Delta$ %, para o grupo L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 22.6  $\pm$  16.9; 48.2  $\pm$  25.2; 30.1  $\pm$  20.8 e 66.1  $\pm$  40.9  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 40.4  $\pm$  14.1; 95.2  $\pm$  15.6; 157.4  $\pm$  38.2; 194.1  $\pm$  36.4 $\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 60 e 90 minutos.

Aos 60 e 90 minutos

 $FE_K$  insulina 126 ng >  $FE_K$  Controle

#### 4.3.1.12-Fração de Excreção Potássio (FE<sub>K</sub>) - Área Total Sob a Curva em Δ%.min

Figura 5, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos Controle; L-NAME 60 e 600 µg e insulina 126 ng intracerebroventricular foram: 460.2  $\pm$  28.5; 583.7  $\pm$  181.7; 423.2  $\pm$  64.2 e 669.8  $\pm$  70.8  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado foi considerado significativo pelo teste de Bonferroni (p<0.05) para a insulina 126 ng intracerebroventricular em relação ao grupo Controle.

TAUC insulina 126 ng > TAUC Controle



Figura 4: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou doseresposta de 60 e 600µg de L-NAME e 126ng de insulina (E), em volume de 3µl, em ratos *Wistar Hannover* na diferença percentual em  $\Delta$ % e na Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min no V'; FG e FE<sub>Na</sub>. Dados mostrados como média±erro padrão da média (X±EPM). \*;@p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).



Figura 5: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou doseresposta de 60 e 600 µg de L-NAME e 126 ng de insulina (E), em volume de 3 µl, em ratos *Wistar Hannover* na diferença percentual em  $\Delta$ % e na Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min na FEP<sub>Na</sub>; FEPP<sub>Na</sub> e FE<sub>K</sub>. Dados mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM). \*:@p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).

#### 4.4-Resultados do desenho experimental C

Os resultados do desenho experimental C são apresentados nas Tabelas 5 e 6 (anexo 1) e nas figuras 6 e 7 (diferença percentual [ $\Delta$ ] em relação ao controle em  $\Delta$ %). Para a análise dos resultados desse grupo, foi considerado um grupo Controle (C), constituído pelos grupos Controle dos protocolos 1 e 2, dos desenhos experimentais A e B.

Os resultados do desenho experimental C, expresso como diferença percentual ( $\Delta$ ) em  $\Delta$ %, em relação ao Controle, são apresentados nas Tabelas 5 (Anexo 1) e nas Figuras 6-7. A análise estatística entre os períodos, aos 30, 60, 90 e 120 minutos, foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA). Quando os resultados foram significativos utilizou-se o teste de contraste de Bonferroni para a discriminação das diferenças.

Os resultados do desenho experimental C, expresso em Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min, apresentados na Tabela 6 (Anexo 1) e nas Figuras 6 e 7. A análise estatística entre os grupos foi realizada pelo teste de análise de variância (ANOVA). Quando os resultados foram significativos utilizou-se o teste de contraste de Bonferroni para a discriminação das diferenças.

#### 4.4.1-Protocolo 3 – Insulina i.c.v+L-NAME i.c.v.

Os resultados dos parâmetros iniciais encontram-se nas Tabelas 5 e 6 do Anexo 1.

#### 4.4.1.1-Volume urinário minuto (V') – diferença percentual em $\Delta$ %.

Na Figura 6, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo C i.c.v. foram: 86.7  $\pm$  10.1; 136.1  $\pm$  17.5; 108.9  $\pm$  19.1 e 44.1  $\pm$ 21.5  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 60µg i.c.v. foram: 143.1  $\pm$  19.9; 183.5  $\pm$ 46.4; 96.8  $\pm$  57.8 e -25.4  $\pm$  24.6  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 300.7  $\pm$  121.3; 372.2  $\pm$  173.8; 404.2  $\pm$  293.2 e 234.5  $\pm$  232.5  $\Box$   $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 137.1  $\pm$  26.1; 182.2  $\pm$  28.9; 58.1  $\pm$  23.9 e -11.8  $\pm$  15.7  $\Delta$ %. Os resultados não foram considerados significativos para p<0.05.

#### 4.4.1.2-Volume minuto urinário (V') - Área Total Sob a Curva em ∆%.min

Na Figura 5, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos C; insulina 126 ng + L-NAME 60 µg; insulina 126 ng + L-NAME 600 µg e insulina 126 ng foram: 610.3  $\pm$  49.6; 639.0  $\pm$  107.4; 1344.1  $\pm$  238.5 e 602.9  $\pm$  52.6  $\Delta$ %.min, respectivamente. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) da associação da insulina 126 ng + L-NAME 600 µg em relação ao grupo Controle

TAUC insulina 126 ng + L-NAME 600  $\mu$ g > TAUC C

#### 4.4.1.3-Filtração glomerular (FG) - Diferença percentual em ∆%

Na figura 6, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo Controle i.c.v. foram: 8.3  $\pm$  4.8; 9.2  $\pm$  4.2; 3.5  $\pm$  5.6 e -7.9  $\pm$  6.9  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 39.3  $\pm$  21.1; 28.6  $\pm$  21.5; 1.8  $\pm$  29.1 e 10.1  $\pm$  19.6  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 29.4  $\pm$  12.1; 14.4  $\pm$  9.2; -2.7  $\pm$  8.8 e 5.2  $\pm$  14.5  $\Box \Delta$ % e para o grupo insulina 126ng i.c.v. foram: 19.3  $\pm$  8.4; 32.2  $\pm$  10.1; 18.2  $\pm$  7.8 e 25.9  $\pm$  16.3  $\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 60 minutos.

> Aos 60 minutos FG insulina 126 ng > FG C

#### 4.3.1.4-Filtração glomerular (FG) - Área Total Sob a Curva em ∆%.min.

Na figura 6, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos C; insulina 12.6 µg + L-NAME 60 µg; insulina 126 ng + L-NAME 600 µg e insulina 126 ng foram: 312.9  $\pm$  11.7; 355.1  $\pm$  61.0; 329.3  $\pm$  26.7 e 372.9  $\pm$  25.4  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado não foi considerado significativo (p<0.05).

#### 4.4.1.5-Fração de Excreção de Sódio (FE<sub>Na</sub>) - Diferença percentual em $\Delta$ %.

Na figura 6, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo C i.c.v. foram: 67.1  $\pm$  18.6; 191.1  $\pm$  35.9; 177.1  $\pm$  31.9 e 307.9  $\pm$  120.1  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 203.9  $\pm$  122.9; 331.1  $\pm$  117.9; 323.7  $\pm$  153.2 e 515.8  $\pm$  66.9  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 138.8  $\pm$  79.2; 195.0  $\pm$  122.4; 358.1  $\pm$  132.3 e 690.1  $\pm$  304.6  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 138.3  $\pm$  49.1; 447.4  $\pm$  97.8; 713.1  $\pm$  214.5 e 1050.9  $\pm$ 252.9  $\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 60 e 90 minutos.

Aos 60 e 90 minutos

 $FE_{Na}$  insulina 126 ng >  $FE_{Na}$  C

## 4.4.1.6-Fração de Excreção de Sódio (FE<sub>Na</sub>) - Área Total Sob a Curva em ∆ %.min.

Na figura 6, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos C; insulina 126 ng + L-NAME 60 µg; insulina 126 ng + L-NAME 600 µg e insulina 126 ng foram: 855.6  $\pm$  115.3; 1314.6  $\pm$  117.0; 1267.4  $\pm$  134.1 e 2054.9  $\pm$  211.5 $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado foi considerado significativo pelo teste de Bonferroni (p<0.05) da associação da insulina 126 ng + L-NAME 60 µg e da associação da insulina 126 ng + L-NAME 600 µg em relação à insulina 126 ng, respectivamente.

TAUC insulina 126 ng + L-NAME 60 μg e TAUC insulina 126 ng + L-NAME 600 μg < TAUC insulina 126 ng 4.4.1.7-Fração de Excreção Proximal de Sódio (FEP<sub>Na</sub>) – Diferença percentual em  $\Delta$ %.

Na figura 7, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo C i.c.v. foram: 50.2  $\pm$  12.6; 84.6  $\pm$  15.6; 93.5  $\pm$  17.8 e 108.3  $\pm$ 18.6  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 71.2  $\pm$  18.3; 107.5  $\pm$ 23.1; 127.7  $\pm$  20.2 e 122.6  $\pm$  11.7  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 114.6  $\pm$  41.0; 133.9  $\pm$  34.2; 160.0  $\pm$  57.4 e 195.6  $\pm$  96.2  $\Delta$ % e para o grupo insulina 12.6 µg i.c.v. foram: 83.4  $\pm$  28.7; 89.1  $\pm$  17.6; 106.3  $\pm$  20.1 e 115.5  $\pm$  30.3  $\Delta$ %. Os resultados não foram considerados significativos para p<0.05.

## 4.4.1.8-Fração de Excreção Proximal de Sódio (FEP<sub>Na</sub>) - Área Total Sob a Curva em $\Delta$ %.min.

Na figura 7, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos C; insulina 126 ng + L-NAME 60 µg; insulina 126 ng + L-NAME 600 µg e insulina 126 ng foram: 557.4  $\pm$  44.4; 629.8  $\pm$  71.8; 195.2  $\pm$  96.4 e 594.6  $\pm$  58.4  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado foi considerado significativo pelo teste de Bonferroni (p<0.05) da associação insulina 126ng+L-NAME 600 µg em relação ao C e insulina 126 ng,

#### TAUC insulina 126 ng + L-NAME 600 µg < TAUC insulina 126 ng

### 4.4.1.9-Fração de Excreção Pós-proximal de Sódio (FEPP<sub>Na</sub>) – Diferença percentual em Δ%

Na figura 7, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo C i.c.v. foram: 6.1  $\pm$  8.5; 59.9  $\pm$  26.8; 40.4  $\pm$  16.9 e 38.1  $\pm$  16.5  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 55.3  $\pm$  61.1; 86.5  $\pm$  56.3; 23.3  $\pm$  32.4 e 182.1  $\pm$  65.6  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 0.2  $\pm$  17.3; 43.4  $\pm$  29.5; 142.1  $\pm$  64.4 e 285.5  $\pm$  124.3  $\Delta$ %, e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 21.9  $\pm$  24.1; 137.3  $\pm$  47.3; 187.7  $\pm$  84.6 e 275.1  $\pm$  85.5  $\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 120 minutos.

Aos 120 minutos

 $FEPP_{Na}$  insulina 126 ng >  $FEPP_{Na}$  C

# 4.4.1.10-Fração de Excreção Pós-proximal de Sódio (FEPP<sub>Na</sub>) - Área Total Sob a Curva em $\Delta$ %.min.

Na figura 7, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos C; insulina 12.6 µg + L-NAME 60 µg; insulina 12.6 µg + L-NAME 600 µg e insulina 126 ng foram: 422.5  $\pm$  50.7; 528.5  $\pm$  81.0; 628.4  $\pm$  149.1 e 773.6  $\pm$ 114.0  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado foi considerado significativo pelo teste de Bonferroni (p<0.05) da associação da insulina 126 ng + L-NAME 60 µg em relação à insulina 126 ng.

TAUC insulina 126 ng + L-NAME 60 µg < TAUC insulina 126 ng

# 4.4.1.11-Fração de Excreção Potássio (FE<sub> $\kappa$ </sub>) – Diferença percentual em $\Delta$ %.

Na figura 7, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) referentes aos 30, 60, 90 e 120 minutos para o grupo C i.c.v foram: 15.5  $\pm$  8.2; 37.4  $\pm$  8.2; 63.5  $\pm$  10.8; 103.5  $\pm$ 20.1  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 60 µg i.c.v. foram: 30.3  $\pm$  17.8; 58.2  $\pm$ 15.9; 96.5  $\pm$  46.5 e 128.5  $\pm$  69.7  $\Delta$ %, para o grupo insulina 126 ng + L-NAME 600 µg i.c.v. foram: 2.4  $\pm$  10.2; 1.1  $\pm$  20.8; 36.8  $\pm$  26.1 e 125.7  $\pm$  50.9  $\Delta$ % e para o grupo insulina 126 ng i.c.v. foram: 40.4  $\pm$  1.4; 95.2  $\pm$  15.6; 157.4  $\pm$  38.2 e 194.1  $\pm$  36.4  $\Delta$ %. Os resultados foram considerados significativos pelo teste de Bonferroni (p<0.05) aos 60 e 90 minutos.

> Aos 60 e 90 minutos FE<sub>K</sub> insulina 126 ng > FE<sub>K</sub> C

## 4.4.1.12-Fração de Excreção Potássio (FE<sub>K</sub>) - Área Total Sob a Curva em $\Delta$ %.min.

Na Figura 7, as médias  $\pm$  erro padrão das médias (X  $\pm$  EPM) para os grupos C; insulina 126 ng + L-NAME 60 µg; insulina 126 ng + L-NAME 600 µg e insulina 126 ng foram: 460.4  $\pm$  28.5; 534.1  $\pm$  83.2; 402.2  $\pm$  71.3 e 669.8  $\pm$  70.8  $\Delta$ %.min, respectivamente. O resultado não foi considerado significativo (p<0.05).



Figura 6: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C), de 60 e 600  $\mu$ g de L-NAME em volume de 3  $\mu$ l (E) e de 126 ng de insulina em volume de 3  $\mu$ l (E), em ratos *Wistar Hannover*, na diferença percentual em  $\Delta$ % e na Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min, no V'; FG e FE<sub>Na</sub>. Dados mostrados como média±erro padrão da média (X ± EPM). \*<sup>5</sup> <sup>@</sup>p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).



Figura 7: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C), de 60 e 600  $\mu$ g de L-NAME em volume de 3  $\mu$ l (E) e de 126 ng de insulina em volume de 3  $\mu$ l (E), em ratos *Wistar Hannover*, na diferença percentual em  $\Delta$ % e da Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min, na FEP<sub>Na</sub>; FEPP<sub>Na</sub> e FE<sub>K</sub>. Dados mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM). \*;@p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).

#### **5-DISCUSSÃO**

O presente estudo visa avaliar os efeitos da insulina e de um inibidor específico da síntese tecidual de óxido nítrico (L-NAME), quando microinjetados agudamente, em separado ou simultaneamente, intracerebroventricularmente (i.c.v. ventrículo cerebral lateral) em ratos normotensos. Estes efeitos foram avaliados sobre a filtração glomerular e a manipulação tubular renal de íons, e observados em animais vigis estudados sem qualquer restrição de movimento ou acessibilidade à ração ou água, em gaiolas metabólicas individuais de aço inoxidável

Os achados mais proeminentes deste estudo demonstraram que:

- A administração intracerebroventricular de insulina na dose de 126 ng promoveu significativa elevação na excreção urinária de sódio, secundária a rejeição da reabsorção tubular renal deste íon nos segmentos pós-proximais do nefron e associada à caliurese, sem, entretanto, qualquer alteração da filtração glomerular.
- 2. A administração intracerebroventricular isolada de L-NAME na dose de 60 μg e prévia de 60 μg de L-NAME i.c.v. seguida de insulina regular i.c.v. na dose de 126 ng, em um volume de 3μl, promoveu uma significativa atenuação deste efeito natriurético central nos segmentos pós-proximais do néfron, sem alteração da filtração glomerular.
- 3. A injeção intracerebroventricular prévia de 600 µg de L-NAME i.c.v. seguida de insulina regular i.c.v. na dose de 126 ng, em um volume de 3µl, promoveu significativa elevação da diurese, sem alteração da filtração glomerular.

Nossos resultados demonstraram através dos estudos de MICHELOTTO et al (2002) que a insulina administrada centralmente (i.c.v.) promoveu elevação expressiva na excreção urinária de sódio e potássio. Estas observações confirmam estudos realizados em nosso laboratório que demonstraram uma excreção renal de íons induzida centralmente pela insulina, sendo esta parcialmente relacionada às modificações na atividade eferente neural. Estas vias neurais, como mostram o presente estudo, podem ser dependentes da modulação central de áreas do sistema nervoso central pelo óxido nítrico, uma vez que a resposta à

ação central da insulina é significativamente atenuada após a administração intracerebroventricular simultânea de L-NAME.

Classicamente, a insulina endógena circulando no sangue periférico é reconhecida como a responsável pelo controle da glicemia. Em contraste, no sistema nervoso central a insulina atua (BANKS et al, 2008):

- 1. Mediando o desenvolvimento e maturação das células neurais;
- 2. Favorecendo a utilização de glicose no cérebro;
- 3. Promovendo a síntese de acetilcolina;
- 4. Modificando os níveis locais de norepinefrina e dopamina;
- 5. Elevando de maneira heterogênea a atividade eferente simpática neural;
- Modulando respostas neuronais de estímulos provenientes do bulbo olfatório e da amígdala cerebral;
- 7. Alterando a secreção de gonadotrofinas pela hipófise;
- 8. Alterando o balanço glomérulo tubular renal seguido de natriurese.

Os efeitos da insulina intracerebroventricular são independentes e muitas vezes recíprocos àqueles observados nos tecidos periféricos. Assim, a administração de insulina no sistema nervoso central induz hiperglicemia, hipoinsulinemia e anorexia, redução hipotalâmica da expressão do neuropeptídeo Y no hipotálamo seguido por decréscimo da ingestão alimentar e de redução do peso corporal além de promover resistência periférica à insulina. Estes efeitos, provavelmente ocorrem, dentro de níveis plasmáticos fisiológicos da insulina, uma vez que, anticorpos específicos contra receptores deste peptídeo administrados no sistema nervoso central promovem a elevação da ingestão de alimentos e do peso corporal. A ação da insulina adicionada ao fluido cerebrospinal nas regiões hipotalâmicas periventriculares é possibilitada pelo transporte facilitado deste peptídeo sérico endógeno para regiões encefálicas através do plexo coróide vencendo a barreira hemato-liquórica através de um processo de transporte saturável. Vários autores têm demonstrado que a injeção de insulina marcada no espaço cerebroventricular, pode alcançar e ser detectada em sítios neuronais relativamente distantes através das células epêndimais ou dos processos gliais (BRIGHTHAM, 1968). Assim, esta administração de insulina radio-marcada nos ventrículos cerebrais laterais de ratos produz uma forte marcação cerebral, atingindo extensas regiões próximas ao terceiro e quarto ventrículos (BASKIN et

al, 1983; Van HOUTEN et al, 1979). No entanto, os mecanismos reguladores do transporte de insulina descrito acima permanecem pouco conhecidos sendo da mesma forma mal entendidos os fatores relacionados à ação da insulina no sistema nervoso central (BANKS et al, 2008).

Vários estudos demonstraram que após a administração intracerebroventricular aguda de insulina no ventrículo lateral direito de ratos normotensos, esta pode difundir-se por toda a área periventricular circunvizinha alcançando e tendo ação em áreas diencefálicas, bilateralmente. Aparentemente, nestes locais a insulina atua promovendo modificações da atividade neural e, conseqüentemente, modulando a homeostase hidro-salina, a resposta pressórica sistêmica e a resposta à ação periférica da insulina. Pelo menos parcialmente, estas ações periféricas parecem ser dependentes e reguladas por modificações da atividade eferente neural de maneira não-homogênea em diferentes tecidos e órgãos, incluindo, os rins (MUNTZEL et al, 1994). Possivelmente, como previamente demonstrado (MICHELLOTO et al, 2002), a ação central insulínica intracerebroventricular, altera aspectos hemodinâmicos e a manipulação tubular renal de íons, promovendo natriurese e caliurese, através de modificações na atividade neural como demonstrado pela atenuação da resposta natriurética após a denervação renal bilateral.

Expressões elevadas de receptores para insulina foram detectadas no núcleo arqueado e em menor quantidade em alguns núcleos neuronais periventricular (OHMIMA et al, 1996; PORTER et al, 1994; WILCOX et al, 1989), resultados similares aos observados em nosso laboratório pela análise por imunohistoquímica de regiões do hipotálamo de ratos, utilizando anticorpos específicos para receptores e proteínas das vias pós-receptoras específicas para insulina (CARVALHEIRA et al, 2001). De acordo com estes estudos, a administração central de insulina induz, como em outros tecidos, a fosforilação em tirosina dos receptores hipotalâmicos específicos para insulina. Portanto, uma vez este receptor ativado desencadeia-se a propagação e ativação de proteínas e substratos protéicos envolvidos em muitos processos fisiológicos, tais como: o controle do peso corporal, a ingestão de alimentos e água e, a homeostase do sódio. Por outro lado, há anos tem sido demonstrado que lesões hipotalâmicas podem promover hiperinsulinemia e resistência periférica à ação da insulina, sugerindo um papel maior do sistema nervoso central no controle da secreção e da ação de insulina.

Como referido acima, estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que após a microinjeção intracerebroventricular aguda de insulina no ventrículo cerebral lateral em ratos, ocorre uma elevação, dose-dependente, da excreção urinária de sódio, secundária principalmente a rejeição à reabsorção deste íon nos segmentos pós-proximais do nefro (FURLAN et al, 2003; MACEDO et al, 2003; MICHELOTTO et al, 2002). Este efeito central da insulina foi efetivamente antagonizado pela administração previa de estreptozotocina ou pela denervação renal bilateral. O efeito natriurético observado pela ação central da insulina se antagoniza com aquele derivado da ação periférica deste peptídeo seja durante experimentos por *clamp* euglicêmico/hiperinsulinêmico ou após um teste de tolerância oral a glicose em ratos e em seres humanos, quando evidente antinatriurese é observada (DeFRONZO et al, 1975; GONTIJO et al, 1996). Portanto, estes resultados podem sugerir um balanço entre os efeitos centrais e periféricos da insulina, uma vez que o efeito periférico deste peptídeo acentua a reabsorção tubular renal de sódio enquanto um efeito antagônico pode fisiologicamente contrabalançar por efeito central esta ação retentora de sódio e, portanto, de água.

Os resultados do presente estudo, avaliados pelo clearance de lítio, demonstraram que a natriurese observada como resultado da ação central da insulina foi devido à redução da reabsorção tubular pós-proximal de sódio a despeito de uma taxa de filtração glomerular inalterada, e como conseqüência, associada a uma reduzida e proporcional carga filtrada de sódio. Estes achados destacam a relevância dos segmentos tubulares renais como efetores finais de respostas homeostáticas moduladas pelo sistema nervoso central, permitindo conjecturar sobre um possível mecanismo regulatório recíproco central sobre a modulação hemostática do volume extracelular. Não é possível afastar que a elevação observada da FE<sub>Na</sub> e da FE<sub>K</sub> (Figuras 2 e 3) possa também decorrer de uma inabilidade tubular renal para o manuseio de eletrólitos pelos segmentos tubulares, e conseqüentemente, a uma disfunção do balanço glomero-tubular.

Embora o papel fisiológico central da insulina permaneça ainda mal definido, existe a possibilidade de que a insulina ligada aos receptores sinápticos e axonais do sistema nervoso central possa influenciar a liberação de catecolaminas em núcleos hipotalâmicos (SAUTER et al, 1983), modificando desta forma, a função autonômica periférica (HOLT et al, 1989; MUNTZEL et al, 1994; SAKAGUCHI & BRAY, 1987). Alguns artigos publicados têm demonstrado que a microinjeção de insulina em áreas periventriculares, promove uma redução significativa na descarga eferente de neurônios de regiões simpáticoexcitatórias em direção a órgãos ou sistemas. Esta depressão neuronal induzida pela insulina sobre áreas do hipotálamo é atenuada pela ação local neurotóxica do ácido kainico (SAKAGUCHI & BRAY, 1987). Tem sido também demonstrado que a injeção intracerebroventricular de metil-atropina pode suprimir respostas à insulina após uma sobrecarga oral de glicose nos ratos (OHMIMA et al, 1996). COVIAN et al. (1975) e GONTIJO et al. (1992), demonstraram que a microinjeção de carbacol na área septal, área hipotalâmica lateral e órgão subfornical, bem como na porção anterior do terceiro ventrículo, induz uma elevação da excreção urinária de sódio dose-relacionada associada a uma discreta, mas significativa caliurese. As observações acima em conjunto com os resultados do presente estudo sugerem a possibilidade de que a natriurese observada, seja o resultado direto de uma significativa inibição da atividade eferente simpática renal e/ou transitória ou indiretamente a contribuição de uma ativação parassimpática de áreas periventriculares especificas do hipotálamo (MICHELOTTO et al, 2002).

A atenuação da natriurese em resposta a microinjeção central de insulina na presença da administração intracerebroventricular de L-NAME verificada no presente estudo, sugere a hipótese e um novo conceito baseada na existência de vias neurais que aferem do sistema nervoso central dependente da modulação do óxido nítrico. Sugere também que, em modelos fisiopatológicos, a ação central da insulina e seus efeitos sobre a função renal podem sofrer alterações relacionadas a modificações na modulação e atividade central de circuitos nitrérgicos.

Por outro lado, estudo tem demonstrado que os animais pré-tratados perifericamente com inibidores competitivos da enzima óxido nítricos sintase (NOS) resulta no desenvolvimento de uma marcada resistência a ação da insulina, secreção pancreática defeituosa da insulina e hipertensão arterial (SHANKAR et al, 1998).

59

Evidências recentes sobre a participação do óxido nítrico sobre a neurogênese e o desenvolvimento neural indicam que, o óxido nítrico fisiologicamente participa no controle destes processos através da *S-nitrosilação* e desta forma interferindo na transdução de receptores ligados a fatores de crescimento (MATARREDONA et al, 2005). Outros estudos têm demonstrado também que o óxido nítrico modula a atividade sináptica e o ritmo de despolarização neuronal caracterizando-se a resposta pela dose-dependência. Esta resposta moduladora é mais evidente nos neurônios em atividade quando comparada àquela observada em neurônios em repouso. Este efeito aparentemente é modulado por via purinérgica ou receptores metabotrópicos do glutamato (mGluR) (AUSTGEN et al, 2008; KOSTIN et al, 2008; MEHTA et al, 2008).

Um possível mecanismo indireto, em resposta a administração central de insulina, possivelmente seja subordinado à ação direta do sistema nitrérgico sobre áreas específicas do sistema nervoso central. Vários autores têm demonstrado que a secreção do óxido nítrico em regiões do sistema nervoso central é responsável pela regulação da atividade neuronal simpática sobre áreas de controle do sistema cardiovascular (CARLSON & WYSS, 2008). Assim, é concebível que os neurônios modulados por insulina e contendo fibras nitrérgicas (KROWICKI et al, 1997), projetem-se do sistema nervosos central para órgãos periféricos, incluindo o rim interferindo na fisiologia destes órgãos e modificando a homeostase hidrosalina e pressórica. As ações observadas pela ativação de vias centrais neurais mediadas pelo NO poderia também envolver circuitos neuronais e as atividades colinérgicas, adrenérgicas ou de neurônios do sistema nervoso não-adrenérgico e não-colinérgico (NANC) e/ou através da liberação de hormônios originários da região hipotalâmico/hipofisária, que na verdade modulariam agudamente a ação de insulina no cérebro.

Estes fatores neurais e humorais atuando isolada ou sinergicamente poderiam influenciar através de modificações do fluxo sanguíneo renal peritubular ou da pressão de perfusão e da resistência vascular renal, em resposta à inibição central da síntese do óxido nítrico, interferindo e modificando sensivelmente a manipulação tubular renal de sódio (BAYLIS et al, 1990). Assim, relatos na literatura têm demonstrado que a liberação local de óxido nítrico, uma molécula sinalizadora intracelular, pode estar envolvida na mediação

da fisiologia de órgão e sistemas, bem como, atuar em processos fisiopatológicos, incluindo o sistema nervoso central. Nas afecções e doenças (KOSTIN et al, 2008), a isoforma neuronal da enzima óxido nítrico sintase (nNOS), distribuída amplamente no sistema nervoso central e periférico, tem sido envolvida na modulação da atividade neuronal do núcleo do trato solitário (NTS) (CHIANG et al 2009). Tem sido também documentada a modulação nitrérgica do óxido nítrico no sistema nervoso central sobre o fluxo sanguíneo de áreas cerebrais promovendo a proteção neural em situações de isquemia, trauma e hemorragia (TODA et al, 2009). XAVIER et al (2000) e outros autores têm demonstrados que a administração intracerebroventricular, na cisterna magna, no núcleo do trato solitário (HARADA et al, 1993) e na medula rostral ventrolateral (SHAPOVAL et al, 1991), de inibidores da NOS promove uma elevação da pressão arterial sistêmica e da atividade simpática neural (TOGASHI et al, 1992). Assim, como sugere o presente estudo, a presença de uma via no sistema nervoso central dependente da liberação de óxido nítrico poderia estar envolvida na modulação de mecanismos de sinalização central de insulina, que através de eferências neurais mediariam a função de diferentes órgãos dentre os quais o rim.

Em relação aos estudos apresentados e os resultados obtidos no presente trabalho pode-se inferir que o sistema nitrérgico: (1) controlaria a ação da insulina no sistema nervoso central e a resposta renal a este estímulo (BAYLIS et al, 1990); (2) elevadas doses de insulina administradas intracerebroventricular ou em culturas de neurônios enriquecidos com 2-deoxi-glicose radioativo (2-DG) confirmam observações previas, de que células do sistema nervoso central independem da presença de insulina para o metabolismo e captação de glicose (HEIDENREICH et al, 1988 e LANSDSBERG & KRIEGER, 1989); (3) doses elevadas de insulina intracerebroventricular não alteram o nível de glicose no liquor (CHOWERS et al, 1966 e KUO et al, 1993); (4) a administração de insulina intracerebroventricular promove hipoglicemia com insulinemia inalterada (MICHELOTTO et al, 2002; FURLAN et al, 2003; MACEDO et al, 2003) através de mecanismos pouco conhecidos; (5) A inibição central da NOS pelo L-NAME, mostrou uma redução da vasopressina plasmática sem alterações da oxitocina e plasmático. Esses dados semelhantes aos do presente estudo, mostraram que a elevação da vasopressina plasmática, promovendo elevação da diurese é dependente da produção de óxido nítrico (VENTURA et al, 2000).

Estes achados sugerem que o efeito da insulina central sobre órgãos periféricos, incluindo o rim, não é mediado pela privação neural à glicose uma vez que doses relativamente elevadas de insulina intracerebroventricular não alteraram os níveis de glicose no liquor (CHOWERS et al, 1968; KUO, et al 1993).

As observações do presente estudo sugerem um novo conceito, no qual uma via neural mediada pelo NO parece ter um papel relevante na atividade nervosa eferente sensível à insulina e cuja origem envolve regiões periventriculares. Estes achados colocam em evidência a atenuação da excreção tubular renal de sódio promovida pela presença dos inibidores da síntese de óxido nítrico desencadeada pela a ação central da administração i.c.v. de insulina em animais normais. Este estudo pode demonstrar que, embora o racional para descrever a redução da excreção urinária do sódio observada após a administração intracerebroventricular de insulina em animais tratados simultaneamente com o inibidor do óxido nítrico síntase permanece não identificado, é sugerido que uma das vias da sinalização neural eferente da ação central da insulina possa ser de natureza nitrérgica.

Apesar de permanecerem desconhecidos os principais mecanismos através dos quais ocorre uma atenuação da excreção urinária de sódio em resposta à administração intracerebroventricular concomitante de insulina e inibidor da síntese de NO, especulativamente, esta resposta evidencia, pelo menos em parte, que a sinalização central a esta eferência neural é de natureza nitrérgica. Estes resultados sugerem também, que defeitos neste processo neural de sinalização e resposta central da insulina podem decorrer ou ser resultado de resistência à ação cerebral a insulina, o que resultaria em uma inabilidade no manuseio tubular renal hidroeletrolítico e como conseqüência retenção de sódio e água e, hipertensão arterial.

#### 6-CONCLUSÃO

A insulina na dose de 126 ng no volume de 3 µl centralmente administrada em animais integros, promoveu uma elevação considerável na rejeição tubular renal de sódio principalmente nos segmentos pós-proximal nos túbulos renais e também elevação de potássio, sem alteração da filtração glomerular.

A administração intracerebroventricular isolada de L-NAME na dose de 60 µg em um volume de 3µl promoveu uma tendência à diminuição da excreção renal de sódio seguido de uma elevação da reabsorção pós-proximal de sódio ao efeito natriurético da insulina.

A administração intracerebroventricular prévia de 60 µg de L-NAME i.c.v. seguida de insulina regular i.c.v. na dose de 126 ng, ambos em um volume de 3 µl, também promoveu uma tendência à diminuição da excreção renal de sódio seguido de uma elevação da reabsorção pós-proximal de sódio ao efeito natriurético da insulina.

O mecanismo natriurético atenuado pela inibição da enzima óxido nítrico sintase em resposta à insulina microinjetada centralmente em ratos continua ainda não foi identificado, sugerindo, que um dos gatilhos da sinalização eferente promovido pela insulina no sistema nervoso central possa ser de natureza nitrérgica.

#### 7-PERSPECTIVAS

A insulina injetada perifericamente promoveu função antinatriurética e elevação da pressão arterial em indivíduos normais e em modelos animais (SONG et al, 2006; MONDON & REAVEN, 1988; SHEN et al, 1988; GONTIJO & MUSCELLI, 1996), enquanto que, a insulina injetada no SNC de ratos promoveu natriurese neuralmente mediada: 1-Agudamente: a-Abolida pela desnervação renal bilateral (MICHELOTTO et al, 2002) e pela administração cerebrovascular de estreptozotocina (MACEDO et al, 2003); b-Atenuada pela administração sistêmica de L-NAME (FURLAN et al, 2003). 2-Por tempo prolongado (MENEGON et al, 2007). Por outro lado, o L-NAME infundido perifericamente promoveu natriurese e elevação da pressão arterial (GRANGER, 1986; MATTSON et al, 1992; XAVIER et al, 2000); enquanto que o L-NAME injetado centralmente promoveu elevação da pressão arterial e da atividade de nervo simpática renal (rota central NO-dependente) (TOGASHI et al, 1992; HARADA et al, 1993; SHAPOVAL et al, 1991).

Administração central de L-NAME isolado e previamente seguido da administração da insulina, promoveu função antinatriurética ao efeito natriurético da insulina, sugerindo a presença de uma via nitrérgica moduladora do mecanismo de sinalização de insulina promovendo uma inabilidade modulatória neural eferente ou rota humoral insulina-sensível em áreas periventriculares, contribuindo para realização do desequilíbrio hidrosalino renal e deficiência orgânica.

Deverão ser realizados estudos adicionais para investigar o envolvimento neurohumoral na interação funcional insulina-cérebro-rim.

#### **8-REFERÊNCIAS**

AGARWALA, GC; BAPAT, SK. Effects of centrally administered insulin on urine output and sodium excretion in dogs. **Ind J Physiol Pharmac 21(2):**99-106, 1977.

ANAND, BK & BROBECK, JR. Hypothalamic control of food intake in rats and cats. **Yale J Biol Med 24(2):**123-40, 1951.

AUSTGEN, JR; FONG, AY; FOLEY, CM; MUELLER, PJ; KLINE, DD; HEESCH, CM; HASSER, EM. Expression of group I metabotropic glutamate receptors on phenotypically different cells within the nucleus of the solitary tract in the rat. **Neuroscience 17:** 2008.

BAGASRA, O; MICHAELS, FH; ZHENG, YM; BOBROSKI, LE; SPITSIN, SV; FU, ZF; TAWADROS, R; KOPROWSKI, H. Activation of inducible form of Inducible nitric oxide synthase in the brains of patients with multiple sclerosis. **Proc Natl Acad Sci 92:**12041-5, 1995.

BANKS, WA; DOHGU, S; LYNCH, JL; FLEEGAL-DEMOTTA, MA; ERICKSON, MA; NAKAOKE, R; VO, TQ. Nitric Oxide Isoenzymes Regulate Lipopolysaccharide-Enhanced Insulin Transport across the Blood-Brain Barrier **Endocrinology 149:**1514–1523, 2008.

BASKIN, DG; WOODS, SC; WEST, D; VAN HOUTEN, M; POSNER, BI; DORSA, DM; PORTE Jr; D. Immunocytochemical detection of insulin in rat hypothalamus and its possible uptake from cerebrospinal fluid. **Endocrinology**, **113**:1818-1825, 1983.

BAUM, M. Insulin stimulates volume absorption in the rabbit proximal convoluted tubule. **J Clin Invest 79:** 1104-9, 1987.

BAYLIS, C; HARTON, P; ENGEL, K. Endothelial derived relaxing factor controls renal hemodynamics in the normal rat kidney. **J Am Soc Nephrol 1(6):**875-881, 1990.

BRIGHTHAM, MW. The intracerebral movement of protein injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. **Brain Research 29:**19-40, 1968.

BUSCONI, L & MICHEL, T. Endothelial nitric oxide synthase. J Biol Chem 268(12):8410-3, 1993.

BUTTERY, LD; SPRINGALL, DR; CHESTER, AH; EVANS, TJ; STANDFIELD, EM; PARUMS, DV; YACOUB, MH; POLAK, JM. Inducible nitric oxide synthase is present within human atherosclerotic lesions and promotes the formation and activity of peroxinitrite. Lab Invest 85:75-7, 1996.

CARLSON, SH; WYSS, JM. Neurohormonal regulation of the sympathetic nervous system: new insights into central mechanisms of action. **Current of Hypertension Report 10:**233-240, 2008.

CARVALHEIRA, JBC; SILOTO, RMP; IGNACCHITTI, I; BRENELLI, SL; CARVALHO, CRO; LEITE, A; VELLOSO, LA; GONTIJO, JAR; SAAD, MJA. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. **FEBS Letters 500(3)**:119–124, 2001.

CHIANG, HT; CHENG, WH; LU, PJ; HUANG, HN; LO, WC; TSENG, YC; WANG, J; HSIAO, M; TSENG, CJ. Neuronal nitric oxide synthase activation is involved in insulinmediated cardiovascular effects in the nucleus solitarii of rats. **Neuroscience**. **17;159(2):**727-34, 2009.

CHOWERS, I; LAVY, S; HALPERN, L. Effect of insulin administered intracisternally on the glucose level of the blood and cerebrospinal fluid in vagotomized dogs. **Exp Neurol 14:**383-389, 1968.

COOPER, SJ. From Claude Bernard To Walter Cannon. Emergence of the concept of homeostasis. Appetite 51(3):419-27, 2008.

COVIAN, MR; ANTUNES-RODRIGUES, J; GENTIL, CG; SAAD, WA; CAMARGO, LAA; SILVA-NETTO, CR. Neural Integration of Physiological Mechanisms and Behavior. **University of Toronto Press, Toronto, pp267**, 1975.

CRONE, C. Facilitated transfer of glucose from blood into brain tissue. J Physiol (Lond) 181:103-113, 1965.

DeFRONZO, RA; COOKE, CR; ANDRES, R; FALOONA, GR; DAVIS, PJ. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium and phosphate in man. J Clin Invest 55:845-855, 1975.

DeFRONZO, RA; GOLDBERG, M; AGUS, ZS. The effects of glucose and insulin on renal electrolyte transport. J Clin Invest 58:83-90, 1976.

DUSSE, LMS; VIEIRA, LM; CARVALHO, MG. Revisão sobre óxido nítrico. Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial 39(4):343-350, 2003.

FURLAN, FC; MARSHAL, PS; MACEDO, RF; CARVALHEIRA, JB; MICHELOTTO, JB, GONTIJO, JA. Acute intracerebroventricular insulin microinjection after nitric oxide synthase inhibition of renal sodium handling in rats. Life Sci 72(23):2561-9, 2003.

GALGANI J, RAVUSSIN E. Energy metabolism fuel selection and body weigt regulation. Int J Obes (Lond) 32 7:S109-19, 2008.

GANS, RO; TOORN, T; BILO, HJ; NAUTA, JJ; HEINE, RJ; DONKER, AJ. Renal and cardiovascular effects of exogenous insulin in healthy volunteers. **Clin Sci 80(3):**219-225, 1991.

GONTIJO, JAR, GARCIA, WE, FIGUEIREDO, JF, SILVA-NETTO, CR; FURTADO, MRF. Renal sodium handling after noradrenergic stimulation of the lateral hypothalamic area in rats. **Braz J Med Biol Res 25**:937-942, 1992.

GONTIJO, JAR; MUSCELLI, EOA. Reduced renal sodium excretion in primary hyperthensive patients after an oral glucose load. **Braz J Med Biol Res 29:**1291-9, 1996.

GRANGER, J.P. Regulation of sodium excretion by renal intestitial hydrostatic pressure. **Federation proceedings 45:**2892-2896, 1986.

HAMID, Q; SPRINGALL, DR; RIVEROS-MORENO, V; CHANEZ, P; HOWARTH, P; REDINGTON, A; BOUSQUET, J; GODARD, P; HOLGATE, S; POLAK JM. Induction of nitric oxide synthase is asthma. Lancet 342:1510-3, 1993.

HARADA, S; TOKUNAGA, S; MONOHARA, M; MASAKI, H; TAGAWA, T; IMAIZUMI, T; TAKESHITA, A. Inhibition of nitric oxide formation in the nucleus tractus solitarius. **Circulation Research 72:**511-516, 1993.

HAVRANKOVA<sup>1</sup>, J; ROTH, J; BROWSTEIN, M. Insulin receptors are widely distribuited in the central nervous system in rats. **Nature 272:**827-829, 1978.

HAVRANKOVA, J; SCHMECHEL, D; ROTH, J; BROWSTEIN, M. Identification of insulin in rat brain. **Proc Natl Acad Sci USA 75(11):**5737-5741, 1978.

HEIDENREICH, KA; DEVELLIS, G; GILMORE, PR. Functional properties of the subtype of insulin receptor found on neurons. **Neurochemistry**, **51**:878-887, 1998.

HOLT, SJ; YORK, DA. Interaction of intracrebroventricular insulin and glucose in the regulation of the activity of sympathetic efferent nerves to brown adipose tissue in lean and obese Zucker rats. **Brain Research 500**:384-388, 1989.

JAMES, SL. Role of nitric oxide in parasitic infections. Microbiol Ver 59(4):533-47, 1995.

KEESEY, RE; POWLEY, TL. Body energy homeostasis. Appetite. 51(3):442-5, 2008.

KIRCHNER, KA. Insulin increases loop chroride reabsorption in the euglicemic rat. Am J Physiol 255(6 Pt 2):F1206-13, 1988.

KOPELMAN PG, HITMAN GA. Diabetes. Exploding type II. Lancet, 19-26:52(4)V5 1998.

KOSTIN, A; STENBERG, D; KALINCHUK, AV; PORKKA-HEISKANEN, T. Nitric oxide modulates the discharge rate of basal forebrain neurons. **Psychopharmacology** (Berl) 201:147-60, 2008.

KROWICKI, ZK; SHARKEY, KA; SERRON, SC; NATHAN, NA; HORNBY, PJ. Distribution of nitric oxide synthase in rat dorsal vagal complex and effects of

68

microinjection of nitric oxide compounds upon gastric motor function. Journal of Comparative Neurology 377(1):49–69, 1977.

KUO, SW; HSIEH, JH; WU, WC; HORNG HT; CHAI, CY. Effects of insulin on the cardiovascular integrating mechanisms of brain stem in cats. American Journal of Physiology 265: E609–E616, 1993.

LAHERA, V; SALOM, MG; MIRANDA-GUARDIOLA, F; MONCADA, S; ROMERO JC. Effects of NG-nitro-L-arginine methyl ester on renal function and blood pressure. **American Journal of Physiology 261:**F1033-F1037, 1991.

LANSDSBERG, L; KRIEGER, DR. Obesity, metabolism and the sympathetic nervous system. American Journal of Hypertension, 2:125S-132S, 1989.

LAWAL M. Management of diabetes mellitus in clinical practice. **Br J Nurs 25(8):**1106-13, 2008.

LIU, H; TERREL, ML; BUI, V; SUMMY-LONG, JY; KADEKARO, M. Nitric oxide control of drinking, vasopressin and oxytocin release and blood pressure in dehydrated rats. **Physiol Behav 63(5):**763-769, 1998.

LUCAS, CP; ESTIGARRIBIA, JA; DARGA, LL; REAVEN, GM. Insulin and blood pressure in obesity. **Hypertension 7:**702-706, 1985.

MACEDO, RF; FURLAN, FC; MARSHALL, PS; MICHELOTTO, JB; GONTIJO, JA. Effect of intracerebroventricularly injected insulin on urinary sodium excretion by cerebroventricular streptozotocin-treated rats. **Braz J Med Biol Res 36(9)**:1193-1199, 2003.

MADRID, MI; SALOM, MG; TORNEL, J; LOPEZ, E; FENOY, FJ. Interactions between nitric oxide and renal nerves on pressure-natriuresis and natriuresis. **J Am Soc Nephrol 9**:1588-1595, 1998.

MANNICK, EE; BRAVO, LE; ZARAMA, G; REALPE, JL; ZHANG, XJ; RUIZ, B; FONTHAM, ET; MERA, R; MILLER, MJ; CORREA, P. Inducible nitric oxide synthase,

nitrotyrosine and apoptosis in Helicobacter pylori gastritis: effects of antibiotics and antioxidants. Cancer Res 43:3238-43, 1996.

MARGOLIS, RU; ALTSZULER, N. Insulin in the cerebrospinal fluid. Nature 215(23):1375-6, 1967.

MATARREDONA, ER; MURILLO-CARRETERO, M; MORENO-LÓPEZ AB; ESTRADA, C. Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. **Brain Research**, **49:**355-66, 2005.

MATTSON, DL, ROMAN, RJ; COWLEY JR, AW. Role of nitric oxide in renal papilary blood flow sodium excretion. **Hypertension 19:**766-769, 1992.

MEHTA, B; BEGUM, G; JOSHI, NB; JOSHI, PG. Nitric oxide-mediated modulation of synaptic activity by astrocytic P2Y receptors. Journal of General Physiology 132:339-349, 2008.

MENEGON, LF; ZAPAROLLI, A; BOER, PA; ALMEIDA, AR; GONTIJO, JA. Longterm effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling and arterial blood pressure in rats. **Brain Research Bulletin 76**:344-348, 2008.

MICHELOTTO, JB; CARVALHEIRA, JBC; SAAD, MJA; GONTIJO, JAR. Effects of acute intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidneydenervated rats. **Brain Res Bull 57(5):**613-618, 2002.

MODAN, M; HALKIN, H; ALMOG, S; LUSKY, A; ESHKOL, A; SHEFI, M; SHITRIT, A; FUCHS, Z. Hyperinsulinemia. A link between hypertension, obesity and glucose intolerance. J Clin Invest 75:809-817, 1985.

MONCADA, S; PALMER, RM; HIGGS, EA. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacol Reviews 43(2):**09-42, 1991.

MONDON, CE; REAVEN G. Evidence of abnormalities of insulin metabolism in rats with spontaneous hypertension. **Metabolism 37:**303-305, 1988.

MOORE, RD. Effects of insulin upon ion transport. Biochim Biophys Acta 21;737(1):1-49, 1983.

MUNTZEL, MS; MORGAN, DA; MARK, AL; JOHNSON, AK. Intracerebroventricular insulin produces non uniform regional increases in sympathetic nerve activity. **Am J Physiol 267(36):**R1350-R1355, 1994.

NICHOLSON, S; BONECINI-ALMEIDA MDA, G; LAPA E SILVA, JR; NATHAN, C; IE, QW; MUMFORD, R; WEIDNER, JR; CALAYCAY, J; GENG, J; BOECHAT, N; LINHARES, C; ROM, W; HO, JL. Inducible nitric oxide synthase pulmonary alveolar macrophages from patients with tuberculosis. J Exp Med 183:2293-2302, 1996.

OHMIMA, H; YAMATANI, K; IGARASHI, M; SUGIYAMA, K; TOMINAGA, M; SASAKI, H. Intracerebroventricular injection of methylatropine suppresses insulin response to oral glucose load in rats. Journal of Autonomous Nervous System 57: 43-48, 1996.

PORTER, JP. Effect of intrahypothalamic insulin on sympathetic nervous function in rats drinking a high-sucrose solution. **Am J Physiol 266(5 Pt 2):**R1463-1469, 1994.

QUINÕNES-GALVAN, A; FERRANNINI, E. Renal effects of insulin in man. J Nephrol 10(4):188-191, 1997.

ROCCHIN, A; KATCH, V; KVESELIS, D; MOOREHEAD, C; MARTIN, M; LAMPMAN. R; GREGORY, M. Insulin and renal sodium retention in obese adolescents. **Hypertension 14:**367-374, 1989.

SAKAGUCHI, T; BRAY, GA. Intrahypothalamic injection of insulin decreases firing rate of sympathetic nerves. **Proc Natl Acad Sci USA 84:**2012-2014, 1987.

SAKURAI, H. Nitric oxide production and inducible nitric oxide synthase expression in inflammatory arthrides. **J Clin Invest 96:**2357-63, 1995.

SAKUMA, I; TOGASHI, H; YOSHIOKA, M; SAITO, H; YANAGIDA, M; TAMURA, M; KOBAYASHI, T; YASUDA, H; GROSS, SS; LEVI, R. NG-methyl-L-arginine, an

71

inhibitor of L-arginine-derived nitric oxide synthesis, stimulates renal sympathetictone? Circ Res 70(3):607-611, 1992.

SAUTER, A; GOLDSTEIN, A; ENGEL, J; UETA, K. Effects of insulin on central catecholamines. **Brain Research 260:**330–333, 1983.

SCHWARTZ, MW; FLIGLEWICZ, DP; BASKIN, GD; WOODS, SC; PORTE JR, D. Insulin in the Brain: A hormonal of energy balance. Endocrine Reviews 13(3):387-414, 1992.

SHANKAR, R; ZHU, JS; LADD, B; HENRY, D; SHEN, H-Q; BARON, AD. Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. J Clin Invest 102(7):1403-1412, 1998.

SHAPOVAL, LN; SAGACH, VF; POBEGAILO, LS. Nitric oxide influences ventro-lateral medullary mechanisms of vasomotor control in the cat. **Neuroscience Letters 132:**47-50, 1991.

SHEN D; SHIEH, SM; FUH, MM; WU, DA; CHEN, YD; REAVEN, GM. Resistance to insulin-stimulated-glucose uptake in patients with hypertension. J Clin Endocrinol Metab **66(3)**:580-583, 1988.

SKOTT, P. Lithium clearance in the evaluation segmental renal tubular reabsorption of sodium and water in diabetes mellitus. **Dan Med Bull 41(1):**23-37, 1994.

SONG, J; HU, X; RIAZI, S; TIWARI, S; WADE, JB; ECELBARGER, CA. Regulation of blood pressure, the epeithelial sodium channel (ENAC), and other key renal sodium transporter by chronic insulin infusion in rats. **Am J Physiol Renal Physiol 290(5):**F1055-1064, 2006.

STENVINKEL, P; OTTOSSON-SEEBERGER, A; DE POTOCKI, K; ALVESTRAND, A. A calcium-channel blocker, amlodipine, attenuates insulin antinatriuresis but does not modulate insulin-mediated attenuation of cardiovascular reactivity in healthy man. **Nephrol Dial Transplant 12:**1600–1607, 1997.
STEPPAN, CM; BAILEY, ST; BHAT, S; BROWN, EJ; BANERJEE, RR; WRIGHT, CM; PATEL, HR; AHIMA, RS; LAZAR, MA. The hormone resistin links obesity to diabetes. Nature 409:307-312, 2001.

STOOS, BA; CARRETERO, AO; GARVIN, JL. Endothelium-derived relaxing factor inhibits transport in cultured cortical collecting duct cells. J Am Soc Nephrol 4(11):1855-1860, 1994

SWANSON, LW; SAWCHENKO, PE. Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. **Ann Rev Neurosci 6:**269-324, 1983.

SZABO, AJ; SZABO, O. Evidence for an insulin-sensitive receptor in the central nervous system. **Am J Physiol 223(6):**1349-1353, 1972.

SZABO, AJ; SZABO, O. Influence of the insulin sensitive central nervous glucoregulator receptor on hepatic glucose metabolism. **J Physiol 253(1):**121-133, 1975.

SZABÓ, C. Alterations in nitric oxide in various forms of circulatory shock. New Horizons 3(1):2-32, 1995.

TODA N, AYAJIKI K, OKAMURA T Cerebral blood flow regulation by nitric oxide in neurological disorders. **Can J Physiol Pharmacol. 87(8):**581-594, 2009.

TOGASHI, H; SAKUMA, I; YOSHIOKA, M; KOBAYASHI, T; YASUDA, H; KITABATAKE, A; SAITO, H; GROSS, SS; LEVI, R. A central nervous system action of nitric oxide in blood pressure regulation. **J Pharmacol Exp Ther 262:**343–347, 1992.

Van HOUTEN, MB; POSNER, BI; KOPRIWA, BM, BRAWER, JR. Insulin-binding sites in the rat brain: in vivo localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. **Endocrinology 105:** 666-673, 1979.

VENTURA, RR; GOMES, DA; REIS, WL; ELIAS, LLK; CASTRO, M; VALENÇA, MM; CARNIO, EC; RETTOR, V; MCCANN, SM; ANTUNES-RODRIGUES, J. Nitrergic modulation of vasopressin, oxytocin and atrial natriuretic peptide secretion in response to

sodium intake and hypertonic blood volume expansion. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research 35:**1101-1109, 2002.

VODOVOTZ, Y; LUCIA, MS; FLANDERS, KC; CHESLER, L; XIE, QW; SMITH, TW; WEIDNER, J; MUMFORD, R; WEBBER, R; NATHAN, C; ROBERTS, AB; LIPPA, CF; SPORN, MB. Inducible nitric oxide synthase in tangle-bearing neurons of patients with Alzheimer's disease. J Exp Med 184(4):1425-1433, 1996.

WILCOX, BJ; CORP, ES; DORSA, DP; GREENWOOD, MR; WOODS SC; BASKIN, DG. Insulin binding in the hypothalamus of lean and genetically obese Zucker rats. **Peptides**, **10**: 1159-1164, 1989.

WILLIAMS, KW; SCOTT, MM; ELMQUIST, JK. From observation to experimentation: leptin action in the mediobasal hypothalamus. **Am J Clin Nutr 89(3):**985S-990S, 2009.

WOODS, SC; LOTTER, EC; McKAY, LD; PORTE Jr, D. Chronic intracerebroventricular infusion of insulin reduces food intake and body weight of baboons. **Nature**, **29:282(5738):**503-505, 1979.

WOODS, SC; D'ALESSIO, DA. Central control of body weight and appetite. J Clin Endocrinol Metab 93(11;1):S37-S50, 2008.

XAVIER F, MAGALHÃES AMF, GONTIJO JAR. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on blood pressure and renal sodium handling in renal denervated rats. **Bras J Med Biol Res 33:**347-354, 2000.

9-ANEXO 1					
GRUPO	n	30 min	60 min	90 min	120 min
V': Δ%					
C (Salina)	37	$86.7 \pm 10.1$	$136.1 \pm 17.5$	$5 108.9 \pm 19.1$	$44.1 \pm 21.5$
Insulina 1.26 ng	12	$77.3 \pm 14.7$	$144.1 \pm 22.9$	$9 154.5 \pm 28.8$	$88.4\pm50.7$
Insulina 12.6 ng	10	$75.6 \pm 1.8$	$196.2 \pm 50.1$	$187.3 \pm 71.5$	$92.8\pm75.3$
Insulina 126 ng	15	$137.1 \pm 26.1$	$182.2 \pm 28.9$	$58.1 \pm 23.9$	$-11.8 \pm 15.7$
FG: Δ%					
Controle	37	$8.3 \pm 4.8$	$9.2 \pm 4.2$	$3.5 \pm 5.6$	$-7.9 \pm 6.9$
Insulina 1.26 ng	12	$14.1\pm6.9$	$1.1 \pm 4.3$	$8.1 \pm 6.3$	$-10.5 \pm 14.8$
Insulina 12.6 ng	10	$4.4\pm6.5$	$15.1 \pm 6.8$	$8.1 \pm 10.3$	$-18.7 \pm 9.8$
Insulina 126 ng	15	$19.3\pm8.4$	$32.2 \pm 10.1*$	$18.2 \pm 7.8$	$25.9 \pm 16.3$
FE <sub>Na</sub> : Δ%					
C (Salina)	37	$67.1 \pm 18.6$	191.1 ± 35.9	$177.1 \pm 31.9$	$307.9 \pm 120.1$
Insulina 1.26 ng	12	$68.8 \pm 41.1$	$270.5 \pm 113.4$	· 371.8 ± 137.1	$424.4 \pm 111.1$
Insulina 12.6 ng	10	$96.5\pm55.7$	$253.4 \pm 145.1$	344.6 ± 151.1	$1030.6 \pm 773.2$
Insulina 126 ng	15	$138.3\pm49.1$	447.4 ± 97.8*	$713.1 \pm 214.5*$	$1050.9 \pm 252.9$
FEP <sub>Na</sub> : Δ%					
C (Salina)	37	$50.2 \pm 12.6$	84.6 ± 15.6	$93.5 \pm 17.8$	$108.3 \pm 18.6$
Insulina 1.26 ng	12	$55.7\pm25.5$	$144.3 \pm 44.9$	$154.1 \pm 51.2$	$207.4\pm82.6$
Insulina 12.6 ng	10	$18.7 \pm 9.5$	$60.2 \pm 18.1$	$58.6 \pm 8.4$	$118.6 \pm 47.6$
Insulina 126 ng	15	$83.4 \pm 28.7$	89.1 ± 17.6	$106.3\pm20.1$	$115.5\pm30.3$
FEPP <sub>Na</sub> : Δ%					
C (Salina)	37	$6.1 \pm 8.5$	$59.9\pm26.8$	$40.4\pm16.9$	$38.1 \pm 16.5$
Insulina 1.26 ng	12	$43.3\pm38.3$	$89.6\pm54.8$	$109.5\pm65.1$	$137.1 \pm 58.7$
Insulina 12.6 ng	10	$70.3\pm51.5$	$82.4\pm61.1$	$146.1 \pm 78.7$	$192.3 \pm 116.4$
Insulina 126 ng	15	$21.9\pm24.1$	$137.3\pm47.3$	$187.7\pm84.6$	275.1 ± 85.5*
$FE_k \Delta\%$					
C (Salina)	37	$15.5 \pm 8.2$	$37.4 \pm 8.2$	$63.5 \pm 10.8$	$103.5 \pm 20.1$
Insulina 1.26 ng	12	$27.5\pm7.5$	85.5 ± 19.1	$85.6 \pm 26.4$	$328.2 \pm 165.2$
Insulina 12.6 ng	10	44.1 ± 49.1	$70.2\pm54.5$	97.6 ± 39.2	$362.7 \pm 226.9$
Insulina 126 ng	15	$40.4 \pm 14.1$	95.2 ± 15.6*	157.4 ± 38.2*	194.1 ± 36.4
· · · · · · · · · · · · · · · · · · ·					

X±EPM. \*p<0.05 vs C

Tabela 1: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou dose-resposta de 1.26, 12.6 e 126 ng de insulina (E) em volume de 3  $\mu$ l, em ratos *Wistar Hannover* na diferença percentual em  $\Delta$ %. Dados mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média (X  $\pm$  EPM) \*p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).

GRUPO	Ν	V'	FG	FE <sub>Na</sub>
C (Salina)	37	610.3 ± 49.6	$312.9 \pm 11.7$	855.6±115.3
Insulina 1.26 ng	12	$681.4 \pm 79.1$	$311.0 \pm 17.1$	$1188.9 \pm 308.9$
Insulina 12.6 ng	10	$767.6 \pm 160.1$	$315.8 \pm 17.6$	$1461.6 \pm 593.6$
Insulina 126 ng	15	$602.9 \pm 52.6$	$372.9 \pm 25.4$	$2054.9 \pm 211.5*$
GRUPO	Ν	FEP <sub>Na</sub>	<b>FEPP</b> <sub>Na</sub>	FE <sub>κ</sub>
C (Salina)	37	$557.4 \pm 44.4$	$422.5\pm50.7$	$460.4\pm28.5$
Insulina 1.26 ng	12	$729.8 \pm 130.5$	$589.3 \pm 76.1$	$649.0 \pm 100.8$
Insulina 12.6 ng	10	$487.4\pm26.0$	$659.9 \pm 94.2$	$671.2 \pm 175.9$
Insulina 126 ng	15	594.6 ± 58.4	773.6 ± 114.0*	$669.8 \pm 70.8*$

X±EPM. \*p<0.05 vs C (Salina)

Tabela 2: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou dose-resposta de 1.26, 12.6 e 126 ng de insulina (E) em volume de 3  $\mu$ l, em ratos *Wistar Hannover* no volume urinário minuto (V'), clearance de creatinina (FG), excreção fracional de sódio (FE<sub>Na</sub>), proximal (FEP<sub>Na</sub>) e pós-proximal (FEPP<sub>Na</sub>) e excreção fracional de potássio (FE<sub>K</sub>). Dados mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM) \*p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni), em Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$  %.min.

GRUPO	n	30 min	60 min	90 min	120 min
V': Δ%					
C (Salina)	37	86.7 ± 10.1	$136.1 \pm 17.5$	$108.9 \pm 19.1$	$44.1 \pm 21.5$
L-NAME 60 µg	9	$95.4\pm34.2$	$153.8\pm80.7$	$101.9\pm92.6$	$53.6\pm99.7$
L-NAME 600 µg	10	$61.7\pm19.5$	$173.4\pm28.5$	$151.1 \pm 31.2$	$82.4 \pm 26.1$
Insulina 126 ng	15	$137.1 \pm 26.1$	$182.2 \pm 28.9$	58.1 ± 23.9	$-11.8 \pm 15.7$
FG: Δ%					
C (Salina)	37	$8.3 \pm 4.8$	$9.2 \pm 4.2$	$3.5 \pm 5.6$	$-7.9 \pm 6.9$
L-NAME 60 µg	9	$14.9\pm24.2$	$28.3\pm32.3$	$2.2 \pm 27.1$	$-2.7 \pm 36.1$
L-NAME 600 µg	10	$23.0\pm12.8$	$17.1 \pm 9.2$	$32.9 \pm 17.3$	$0.2 \pm 11.1$
Insulina 126 ng	15	$19.3\pm8.4$	$32.2 \pm 10.1*$	$18.2 \pm 7.8$	$25.9 \pm 16.3$
$FE_{Na}: \Delta\%$					
C (Salina)	37	$67.1 \pm 18.6$	$191.1 \pm 35.9$	$177.1\pm31.9$	$307.9 \pm 120.1$
L-NAME 60 µg	9	$51.4 \pm 54.1$	$167.1\pm146.7$	$170.5\pm135.0$	$269.8\pm207.2$
L-NAME 600 µg	10	$286.5\pm166.5$	$471.2\pm212.5$	$346.5 \pm 123.3$	$584.4\pm237.1$
Insulina 126 ng	15	$138.3 \pm 49.1$	$447.4 \pm 97.8*$	713.1 ± 214.5*	$1050.9 \pm 252.9$
FEP <sub>Na</sub> : Δ%		-			
C (Salina)	37	$50.2\pm12.6$	$84.6 \pm 15.6$	$93.5 \pm 17.8$	$108.3 \pm 18.6$
L-NAME 60 µg	9	$89.5 \pm 53.6$	$108.1\pm65.2$	$118.9\pm68.4$	$90.4\pm63.6$
L-NAME 600 µg	10	$86.3 \pm 28.1$	$164.0\pm46.1$	$101.8\pm36.4$	$128.3\pm52.2$
Insulina 126 ng	15	$83.4 \pm 28.7$	89.1 ± 17.6	$106.3\pm20.1$	$115.5 \pm 30.3$
$\text{FEPP}_{\text{Na}}:\Delta\%$					
C (Salina)	37	$6.1 \pm 8.5$	$59.9\pm26.8$	$40.4 \pm 16.9$	$38.1 \pm 16.5$
L-NAME 60 µg	9	$16.4 \pm 17.8$	$19.1\pm20.2$	$52.6\pm27.8$	$110.4\pm60.5$
L-NAME 600 µg	10	$52.4\pm41.4$	$119.1 \pm 58.1$	$93.7\pm30.8$	$137.2\pm46.0$
Insulina 126 ng	15	$21.9 \pm 24.1$	$137.3 \pm 47.3$	$187.7\pm84.6$	275.1 ± 85.5*
$FE_k \Delta\%$					
C (Salina)	37	$15.5 \pm 8.2$	$37.4 \pm 8.2$	$63.5\pm10.8$	$103.5\pm20.1$
L-NAME 60 µg	9	$43.1 \pm 41.8$	$83.7\pm59.0$	$133.8\pm77.0$	$109.3\pm69.0$
L-NAME 600 µg	10	$22.6\pm16.9$	$48.2\pm25.2$	$30.1\pm20.8$	$66.1\pm40.9$
Insulina 126 ng	15	$40.4 \pm 14.1$	95.2 ± 15.6*	157.4 ± 38.2*	$194.1\pm36.4$

Legendas: X±EPM. \*p<0.05 vs Controle

Tabela 3: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) ou dose-resposta de 60 e 600 µg de L-NAME e 126 ng de insulina (E) em volume de 3 µl de insulina em ratos *Wistar Hannover* na diferença percentual em  $\Delta$ %. Dados mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM) \*p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).

GRUPO	Ν	V'	FG	FE <sub>Na</sub>				
C (Salina)	37	$610.3 \pm 49.6$	$312.9 \pm 11.7$	855.6±115.3				
Insulina 126 ng	15	$602.9\pm52.6$	$372.9 \pm 25.4$	$2054.9 \pm 211.5*$				
L-NAME 60 µg	9	$576.9\pm207.6$	$293.0\pm79.6$	$798.1 \pm 110.9^{@}$				
L-NAME 600 µg	10	$696.4\pm72.3$	$362.2 \pm 28.3$	$1553.1 \pm 150.7*$				
GRUPO	Ν	FEP <sub>Na</sub>	<b>FEPP</b> <sub>Na</sub>	FE <sub>K</sub>				
C (Salina)	37	$557.4 \pm 44.4$	$422.5\pm50.7$	$460.4 \pm 28.5$				
Insulina 126 ng	15	$594.6 \pm 58.4$	773.6±114.0*	$669.8 \pm 70.8*$				
L-NAME 60 µg	9	$617.0 \pm 178.3$	$432.1 \pm 53.4^{@}$	583.7 ± 181.7				
L-NAME 600 µg	10	$673.2 \pm 109.1$	$608.3 \pm 111.3$	$423.2 \pm 64.2$				
X±EPM. *p<0.05 vs C (Salina); <sup>@</sup> p<0.05 vs Insulina 126 ng								

Tabela 4: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C), da dose-resposta de 60 e 600 µg de L-NAME e de 126 ng de insulina (E) em volume de 3 µl, em ratos *Wistar Hannover* no volume urinário minuto (V'), clearance de creatinina (FG), excreção fracional de sódio (FE<sub>Na</sub>), proximal (FEP<sub>Na</sub>) e pós-proximal (FEPP<sub>Na</sub>) e excreção fracional de potássio (FE<sub>K</sub>). Dados mostrados como média  $\pm$  erro padrão da média (X  $\pm$  EPM). \*: @p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni), em Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min

GRUPO		30 min	60 min	90 min	120 min			
V': Δ%								
C (Salina)	37	$86.7 \pm 10.1$	$136.1 \pm 17.5$	$108.9 \pm 19.1$	$44.1 \pm 21.5$			
Ins 126 ng + L-NAME 60 µg	8	$143.1\pm19.9$	$183.5\pm46.4$	$96.8\pm57.8$	$-25.4 \pm 24.6$			
Ins 126 ng + L-NAME 600 µg	12	$300.7\pm121.3$	$372.2 \pm 173.8$	$404.2\pm293.2$	$234.5\pm232.5$			
Insulina 126 ng	15	$137.1 \pm 26.1$	$182.2 \pm 28.9$	58.1 ± 23.9	$-11.8 \pm 15.7$			
FG: Δ%								
C (S <u>alina)</u>	37	$8.3 \pm 4.8$	$9.2 \pm 4.2$	$3.5 \pm 5.6$	$-7.9 \pm 6.9$			
Ins 126 ng + L-NAME 60 µg	8	$39.3 \pm 21.1$	$28.6\pm21.5$	$1.8 \pm 29.1$	$10.1 \pm 19.6$			
Ins 126 ng + L-NAME 600 µg	12	$29.4 \pm 12.1$	$14.4\pm9.2$	$-2.7 \pm 8.8$	$5.2 \pm 14.5$			
Insulina 126 ng	15	$19.3 \pm 8.4$	$32.2 \pm 10.1*$	$18.2 \pm 7.8$	$25.9 \pm 16.3$			
$FE_{Na}: \Delta\%$								
C (Salina)	37	$67.1 \pm 18.6$	$191.1 \pm 35.9$	$177.1 \pm 31.9$	$307.9 \pm 120.1$			
Ins 126 ng + L-NAME 60 μg	8	$203.9 \pm 122.9$	$331.1 \pm 117.9$	$323.7\pm153.2$	$515.8\pm 66.9$			
Ins 126 ng + L-NAME 600 µg	12	$138.8\pm79.2$	$195.0\pm122.4$	$358.1\pm132.3$	$690.1\pm304.6$			
Insulina 126 ng	15	$138.3 \pm 49.1$	447.4 ± 97.8*	713.1 ± 214.5*	$1050.9 \pm 252.9$			
FEP <sub>Na</sub> : Δ%								
C (Salina)	37	$50.2 \pm 12.6$	$84.6 \pm 15.6$	$93.5\pm17.8$	$108.3 \pm 18.6$			
Ins 126 ng + L-NAME 60 μg	8	$71.2 \pm 18.3$	$107.5\pm23.1$	$127.7\pm20.2$	$122.6 \pm 11.7$			
Ins 126 ng + L-NAME 600 µg	12	$114.6\pm41.0$	$133.9\pm34.2$	$160.0\pm57.4$	$195.6\pm96.2$			
Insulina 126 ng	15	$83.4 \pm 28.7$	89.1 ± 17.6	$106.3\pm20.1$	$115.5 \pm 30.3$			
$FEPP_{Na}: \Delta\%$								
C (Salina)	37	$6.1 \pm 8.5$	$59.9\pm26.8$	$40.4\pm16.9$	$38.1 \pm 16.5$			
Ins 126 ng + L-NAME 60 μg	8	$55.3 \pm 61.1$	$86.5\pm56.3$	$23.3\pm32.4$	$182.1 \pm 65.6$			
Ins 126 ng + L-NAME 600 µg	12	$0.2 \pm 17.3$	$43.4\pm29.5$	$142.1\pm 64.4$	$285.5\pm124.3$			
Insulina 126 ng	15	$21.9\pm24.1$	$137.3\pm47.3$	$187.7\pm84.6$	$275.1 \pm 85.5*$			
$FE_k \Delta\%$								
C (Salina)	37	$15.5 \pm 8.2$	$37.4 \pm 8.2$	$63.5\pm10.8$	$103.5 \pm 20.1$			
Ins 126 ng + L-NAME 60 μg	8	$30.3\pm17.8$	$58.2 \pm 15.9$	$96.5 \pm 46.5$	$128.5\pm69.7$			
Ins 126 ng + L-NAME 600 $\mu$ g	12	$2.4\pm10.2$	$1.1\pm20.8$	$36.8\pm26.1$	$125.7\pm50.9$			
Insulina 126 ng	15	$40.4 \pm 14.1$	95.2 ± 15.6*	157.4 ± 38.2*	$194.1 \pm 36.4$			
Legendas: X±EPM. *p<0.05 vs C								

Tabela 5: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) em volume de 3  $\mu$ l, da associação de 126 ng de insulina com 60 e 600  $\mu$ g de L-NAME em volume de 6  $\mu$ l e de 126 ng de insulina em volume de 3  $\mu$ l (E), em ratos *Wistar Hannover* na diferença percentual em  $\Delta$ %. Dados mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM) \*p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni).

GRUPO	n	V'	FG	FE <sub>Na</sub>
C (Salina)	37	610.3 ± 49.6	$312.9 \pm 11.7$	855.6±115.3
Insulina 126 ng	15	$602.9 \pm 52.6$	$372.9 \pm 25.4$	$2054.9 \pm 211.5*$
Ins 126 ng + L-NAME 60 μg	8	$639.0 \pm 107.4$	$355.1 \pm 61.0$	$1314.6 \pm 117.0^{@}$
Ins 126 ng + L-NAME 600 µg	12	1344.1 ± 238.5*	$329.3 \pm 26.7$	$1267.4 \pm 134.1^{@}$
GRUPO	n	FEP <sub>Na</sub>	FEPP <sub>Na</sub>	FE <sub>K</sub>
C (Salina)	37	$557.4 \pm 44.4$	$422.5 \pm 50.7$	$460.4\pm28.5$
Insulina 126 ng	15	$594.6 \pm 58.4$	$773.6 \pm 114.0*$	$669.8 \pm 70.8*$
Ins 126ng + L-NAME 60 µg	8	$629.8\pm71.8$	$528.5 \pm 81.0^{@}$	$534.1 \pm 83.2$
Ins 126ng + L-NAME 600 μg	12	$195.2 \pm 96.4$ <sup>@</sup>	$628.4 \pm 149.1$	$402.2\pm71.3$

X±EPM. \*p<0.05 vs C (Salina); <sup>@</sup>p<0.05 vs Insulina 126 ng

Tabela 6: Efeitos da microinjeção no ventrículo cerebral lateral de Salina (C) em volume de 3  $\mu$ l, de 60 e 600  $\mu$ g de L-NAME em volume de 3  $\mu$ l (E) e de 126 ng de insulina em volume de 3  $\mu$ l (E), em ratos *Wistar Hannover* no volume urinário minuto (V'), clearance de creatinina (FG), excreção fracional de sódio (FE<sub>Na</sub>), proximal (FEP<sub>Na</sub>) e pósproximal (FEPP<sub>Na</sub>) e excreção fracional de potássio (FE<sub>K</sub>). Dados mostrados como média ± erro padrão da média (X ± EPM). \*: @ p<0.05 (ANOVA e teste de constraste de Bonferroni) em Área Total Sob a Curva (TAUC) em  $\Delta$ %.min.

	Controle	Protocolo 1			Protocolo 2		Protocolo 3	
		Ins	ulina i.c	.v.	L-NA	ME icv	Insulina 126ng	g+L-NAME i.c.v
N	С	1.26ng	12.6n	126ng	60µg	600µg	126ng+60µg	126ng+600µg
			g					
1	271	312	266	240	230	280	268	381
2	289	290	253	264	274	233	278	340
3	255	280	268	240	257	234	304	288
4	288	254	250	254	252	252	262	360
5	270	290	279	254	267	279	360	360
6	260	270	275	250	251	267	304	300
7	293	268	262	274		275	291	300
8	260	265	263	256		305	256	256
9	277	269	265	285		330		296
10	270	289	263	260		302		253
11	264	257	268	270				387
12	297	267		240				
13	289			250				
14	254			283				
15	243			290				
16	253			310				
17	259							
18	255							
19	259							
20	259							
21	243							
22	266							
23	261							
24	244							
25	298							
26	254							
27	261							
28	250							
29	255							
30	263							
31	265							
32	264							
33	253							
34	263							
35	243							
36	271							
37	260							
Média	264.3	275.9	264.7	264.4	260.8	274.2	294.2	306.6
EPM	2.3	5.0	2.5	5.1	2.5	7.7	13.2	15.1

Tabela 7 – Peso dos animais em gramas (g)

## **10-ANEXO 2**



Braz J Med Biol Res, December 2009, Volume 42(12) 1196-1202

Consequences of cerebroventricular insulin injection on renal sodium handling in rats: effect of inhibition of central nitric oxide synthase

P.C. Oliveira, J.B. Michelotto, A. Zapparoli, P.A. Boer and J.A.R. Gontijo



# Consequences of cerebroventricular insulin injection on renal sodium handling in rats: effect of inhibition of central nitric oxide synthase

P.C. Oliveira<sup>1</sup>, J.B. Michelotto<sup>1</sup>, A. Zapparoli<sup>2</sup>, P.A. Boer<sup>2</sup> and J.A.R. Gontijo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, MG, Brasil <sup>2</sup>Disciplina de Medicina Interna, Laboratório de Metabolismo Hidro-Salino, Núcleo de Medicina e Cirurgia Experimental, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Ciéncias Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil

#### Abstract

In the present study, we investigated the effects of acute intracerebroventricular (*icv*) insulin administration on central mechanisms regulating urinary sodium excretion in simultaneously centrally N<sup>G</sup>-nitro-L-arginine methylester (L-NAME)-injected unanesthetized rats. Male Wistar-Hannover rats were randomly assigned to one of five groups: a) *icv* 0.15 M AcCl-injected rats (control, N = 10), b) *icv* dose-response (1.26, 12.6 and 126 ng/3 µL) insulin-injected rats (N = 10), c) rats *icv* injected rats (Control, N = 0), b) *icv* dose-response (1.26, 12.6 and 126 ng/3 µL) insulin-injected rats (N = 10), c) rats *icv* injected with 60 µg L-NAME insulin combination with NaCl (N = 10) or d) with insulin (N = 10), and e) subcutaneously insulin-injected rats (N = 5). Centrally administered insulin produced an increase in urinary output of sodium (NaCl: 855.6 ± 85.1  $\Delta$ %/min; 126 ng insulin: 2055 ± 310.6  $\Delta$ %/min; P = 0.005) and potassium (NaCl: 460.4 ± 100  $\Delta$ %/min; 126 ng insulin: 669.2 ± 60.8  $\Delta$ %/min; P = 0.025). The urinary sodium excretion response to *icv* 126 ng insulin microinjection was significantly attenuated by combined administration of L-NAME (126 ng insulin: 1935 ± 258.3  $\Delta$ %/min; L-NAME + 126 ng insulin: 589.6  $\Delta$ %/min; P = 0.01). Insulin-induced natriuresis occurred by increasing post-proximal sodium excretion, despite an unchanged glomerular filtration rate. Although the rationale for decreased urinary sodium excretion induced by combined *icv* L-NAME and insulin administration is unknown, it is tempting to suggest that perhaps one of the efferent signals triggered by insulin in the CNS may be nitrergic in nature.

Key words: Central nervous system; Intracerebroventricular; Nitric oxide inhibition; Insulin; Natriuresis; Lithium clearance

#### Introduction

Chronic elevated plasma insulin levels and resistance to the hypoglycemic effect of insulin have been associated with increased blood pressure in human and animal models of hypertension. This observation has led to speculation that insulin may play a role in the development of increased blood pressure (1,2). On the other hand, the role of the central nervous system (CNS) in the control of blood pressure and hydroelectrolyte homeostasis has been demonstrated by several studies (3-5). Further studies of insulin action on neurons have demonstrated pleiotropic effects on ion flows (6), neurotransmitter uptake and release (7), cell growth, survival, and the transcriptional regulation of genes involved with differentiation (8), as well as possible modulation of several brain functions, such as food intake regulation, reproductive function and cardiovascular function (2,9-11). The entry of insulin into the CNS has been documented in many species (12). Considerable evidence supports the concept of a specialized transport system facilitating its passage across the blood-brain barrier endothelium (12,13). In addition, we have recently provided evidence indicating a direct and positive cross-talk between insulin and leptin at the level of Janus kinase and signal transduction and activation of transcription 3 by tyrosine phosphorylation in rat hypothalamus (14). Exploration of the mechanisms by which insulin controls the CNS activity may offer insights into central mechanisms of insulin resistance and cardiovascular diseases, including hypertension. Although it has been shown that the peripheral action of insulin reciprocal link between the renal effect of insulin, urinary sodium excretion, suggesting an attractive reciprocal link

Correspondence: J.A.R. Gontijo, Departamento de Clínica Médica, FCM, UNICAMP, 13083-592 Campinas, SP, Brasil. Fax: +55-19-3521-8925. E-mail: gontijo@fcm.unicamp.br

Received February 5, 2009. Accepted October 20, 2009. Available online November 6, 2009. Published December 4, 2009.

Braz J Med Biol Res 42(12) 2009

www.bjournal.com.br

tion and the development or maintenance of hypertension, studies have indicated that acute intracerebroventricular (*icv*) insulin injection significantly decreases both blood pressure and heart rate, with corresponding decreases in renal sympathetic nerve activity in anesthetized rats (15,16). Our laboratory recently showed that centrally administered insulin produced a dose-related increase in the urinary output of sodium, which was abolished by bilateral renal denervation (17) and cerebroventricular streptozotocin administration in rats (18) and that the response was significantly enhanced in long-term *icv* insulin-pretreated animals compared to control (19).

On the other hand, Shankar et al. (20) have reported that acute systemic administration of high doses of NGmonomethyl-L-arginine, a competitive inhibitor of nitric oxide (NO) synthase, results in marked insulin resistance, hyperglycemia, defective insulin secretion, and hypertension. The latest reports on NO and neurogenesis indicate that NO participates physiologically in the control of adult neurogenesis by modulating the proliferation of the neuron progenitor cells. These effects might be partially due to a direct inhibition of growth factors by S-nitrosylation (21). Also, recent studies have demonstrated that NO modulates the synaptic activity and neuronal discharge rates in a dose-dependent manner (22,23). However, there is little information on the neural mechanisms that mediate the effects of icv insulin administration on renal sodium handling in rats. Thus, insulin and/or insulin-derived peptides may be thought of as neuropeptide precursors that possibly interact with the nitrergic system.

As a hypothesis, we suggest that the action of insulin in the CNS may be modulated by NO synthase activity, consequently altering urinary sodium excretion. To test this hypothesis, we investigated the effects of acute *icv* insulin administration on central mechanisms regulating urinary sodium excretion in simultaneously centrally N<sup>G</sup>-nitro-Larginine methylester (L-NAME)-injected unanesthetized rats and their appropriate control groups.

### Material and Methods

The general guidelines established by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA, http://www.cobea.org.br/index.php)werefollowed throughout the study. Male Wistar-Hannover rats (250-320 g) were randomly assigned to five groups: a) *icv* 0.15 M NaCI-injected (control) rats (N = 10), b) *icv* dose-response insulin-injected rats (N = 10), c) rats injected *icv* with 60 µg L-NAME in combination with 0.15 M NaCI (N = 10) or d) with insulin (N = 10), and e) subcutaneously (*sc*) insulin-injected rats (N = 5). The animals were chronically instrumented with an *icv* guide cannula (17,19) and kept in individual metabolic cages under controlled temperature (25°C) and lighting conditions (7:00 to 19:00 h), with free access to tap water and standard laboratory rodent chow.

www.bjournal.com.br

Briefly, the animals were anesthetized with an intraperitoneal injection of sodium pentobarbital (50 mg/kg body weight) and a stainless steel cannula was stereotaxically implanted into the lateral cerebral ventricle 7 days before the experiments, using previously reported techniques and pre-established coordinates: anteroposterior, 0.2 mm from bregma: lateral. 1.5 mm from bregma, and vertical, 4.0 mm from bregma (17,19). The position of the cannula was confirmed visually by 2% blue Evans infusion through the icv cannula at the end of the experiment. Fourteen hours before the renal test, 60 µmol LiCI/100 g body weight was given by gavage. Systolic arterial blood pressure was estimated in additional groups of conscious rats in the morning 30 min after the icv administration of 0.15 M NaCl, insulin, L-NAME or L-NAME plus insulin by the tail-cuff method, using an electrosphygmomanometer (Narco Bio-System, USA), This indirect approach permits repeated measurements with a close correlation (correlation coefficient = 0.975), compared to direct intra-arterial recording (24). After an overnight fast, each animal received a load of tap water by gavage (5% of the body weight), followed by a second load of the same volume 1 h later. Thirty minutes after the second load (control period), 0, 15 M NaCl (control) or insulin (100 U/mL. Eli Lilly, USA, 206 mOsm/kg H2O) was microinjected icv in a volume of 3 µL at different concentrations (1.26, 12.6, and 126 ng) with a 10-µL Hamilton microsyringe and spontaneously voided urine was collected over four periods of 30 min each into a graduated centrifuge tube. In two groups, rats were centrally injected with 60 µg L-NAME in combination with 0.15 M NaCl, or with 126 ng insulin. In 5 rats, 126 ng insulin was injected sc in a volume of 3 µL.

At the end of the experiment, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital, blood was drawn by cardiac puncture and urine and plasma samples were taken for analysis. Plasma and urine sodium, potassium and lithium concentrations were measured by flame photometry (Micronal, B262, Brazil), while creatinine concentration and cerebrospinal fluid (CSF) osmolarity were determined spectrophotometrically (Instruments Laboratory, Genesys V, USA) and with a wide-range osmometer (Advanced Inst. Inc., USA), respectively. Insulin levels were measured by radioimmunoassay (Diagnostic Products Corp., USA) and plasma glucose concentration by an enzymatic method (Labtest, New Zealand), glomerular filtration rate and lithium clearance (CLi) was used to assess proximal tubule output (17,19,25). Fractional sodium excretion (FE<sub>Na</sub>) was calculated as CNa/Ccr, where CNa is sodium clearance and Ccr is creatinine clearance. The fractional proximal (FEP<sub>Na</sub>) and post-proximal (FEPPNa) sodium excretion was calculated as CLi/Ccr x 100 and CNa/CLi x 100, respectively. Renal parameters, glycemia and insulinemia responses to icv microinjections were calculated as the area under the curve versus time (AUC, in ∆%/min), with all data being reported as percentage of their baseline value during the 30-min control period preceding each 30-min experimental interval.

Braz J Med Biol Res 42(12) 2009

Statistical analysis of the data was performed by ANOVA for repeated measurements. Bonferroni's *post hoc* analysis was used to determine the extent of the differences.  $P \le 0.05$  was taken to indicate statistical significance.

#### Results

Figures 1 and 2 and Table 1 show the effects of *icv* and *sc* insulin, *icv* 0.15 M NaCl or combined insulin + L-NAME microinjection on renal Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> handling. Glycemia and insulinemia results are reported as mean ± SEM. There were no significant differences in daily solid rat chow intake (median: 22.7 g, range: 15.3 to 31.2 g), CSF osmolarity, serum sodium, potassium, and lithium levels and systolic blood pressure (Table 1) in *icv* 0.15 M NaCl-injected rats compared with the other groups. The urinary flow rates did not differ significantly among groups during the studies of

renal tubule sodium handling (Figure 1). The icv microinjection of insulin (1.26, 12.6, and 126 ng in a volume of 3 µL) increased FE<sub>Na</sub> in control (0.15 M NaCl) rats from 855.6  $\pm$ 81.1 to 1189.9 ± 308.9, 1461.6 ± 594.1, and 2055 ± 310.6 ∆%/min, respectively, and FE<sub>K</sub> in control rats from 460.4 ± 100 to 649.2 ± 100.8, 671.2 ± 175.9, and 669.2 ± 60.8  ${\scriptstyle \Delta\%}\slash$  (Figure 1). The enhanced  ${\sf FE}_{Na}$  and  ${\sf FE}_K$  were accompanied by a significant increase in post-proximal sodium excretion compared with the rats injected icv with 0.15 M NaCl (Figure 1). This increase occurred despite an unchanged FEP<sub>Na</sub> and unaffected glomerular filtration rate estimated by Ccr except up to icv administration of 126 ng insulin (Figure 1). Intracerebroventricular injections of 126 ng insulin produced reproducible decreases in glycemia levels (P < 0.03; Table 1), which in turn were not modified by 126 ng sc insulin or icv saline administration. Insulinemia was not altered by icv insulin or 0.15 M NaCI microinjection



Figure 1. Effect of lateral intracerebroventricular microinjection of 0.15 M NaCl (C) or dose-related (1.26, 12.6 and 126.0 ng in a volume of 3  $\mu$ L) insulin in Wistar-Hannover rats on creatinine clearance, fractional excretion of sodium (FE<sub>Na</sub>), proximal (FEP<sub>Na</sub>) and post-proximal (FEPP<sub>Na</sub>) fractional excretion of sodium, and fractional excretion of potassium (FE<sub>K</sub>). AUC = area under the curve. Data are reported as means  $\pm$  SEM. \*P < 0.05 as indicated by the horizontal lines (ANOVA and Bonferroni's contrast test).

Braz J Med Biol Res 42(12) 2009

www.bjournal.com.br



Figure 2. Effect of lateral intracerebroventricular microinjection of 126 ng/3  $\mu$ L insulin (Ins) on creatinine clearance, fractional excretion of sodium (FE<sub>Na</sub>), proximal (FEP<sub>Na</sub>) and post-proximal (FEP<sub>Na</sub>) fractional excretion of sodium and fractional excretion of potassium (FE<sub>K</sub>) compared to *icv* administration of 0.15 M NaCl (C), 126 ng/3  $\mu$ L insulin + 60  $\mu$ g L-NAME (Ins + L-NAME) and 60  $\mu$ g L-NAME in Wistar-Hannover rats. Data are reported as means ± SEM. AUC = area under the curve. "P ≤ 0.05 as indicated by the horizontal lines (ANOVA and Bonferroni's contrast test).

Table 1. Effect of lateral intracerebroventricular (*icv*) or subcutaneous (sc) microinjection of 126 ng/3 µL insulin on cerebrospinal fluid osmolarity, serum sodium, potassium and lithium levels, and insulinemia, glycemia and systolic blood pressure (SBP) compared to *icv* administration of 0.15 M NaCl (control), 126 ng/3 µL insulin + 60 µg L-NAME and 60 µg L-NAME administration in Wistar-Hannover rats.

Groups	Na <sup>+</sup> (mM)	K+ (mM)	Li+ (µM)	Insulinemia (AUC)	Glycemia (AUC)	CSF (mOsm/kg H <sub>2</sub> O)	SBP (mmHg)
NaCl (icv, N = 10)	144 ± 2.3	4.2±0.3	87 ± 16	14.91 ± 2.78 <sup>b</sup>	436 ± 21°	306 ± 2.0ª	132 ± 11.0
Insulin (icv, N = 10)	$143 \pm 2.1$	4.1±0.2	$69 \pm 19$	18.48 ± 2.02d	298 ± 27°.*	301 ± 3.0ª	$127 \pm 9.5$
Insulin + L-NAME (icv, N = 10)	$145 \pm 3.4$	4.2 ± 0.5	91 ± 32	17.72 ± 3.71d	378 ± 58°	307 ± 2.8ª	131 ± 9.0
L-NAME (icv, N = 10)	$142 \pm 2.7$	$3.9 \pm 0.7$	82 ± 28	171	-	17	137 ± 10.2
Insulin (sc, N = 5)	$143 \pm 3.5$	$3.5 \pm 0.2$	$100 \pm 10$	14.03 ± 3.12	398 ± 33	301 ± 4.1ª	132 ± 8.2

Data are reported as means  $\pm$  SEM. AUC = area under the curve (in  $\Delta$ %/min); CSF = cerebrospinal fluid osmolarity; N = number of animals; aN = 3; bN = 5; oN = 7; dN = 6.\*P ≤ 0.05 NaCl vs all groups (ANOVA and Bonferroni's contrast test).

www.bjournal.com.br

Braz J Med Biol Res 42(12) 2009

(Table 1). The urinary sodium excretion response to *icv* 126 ng insulin injection was blunted and significantly reduced by simultaneous *icv* administration of 60 µg L-NAME, from 0.15 M NaCl + 126 ng insulin:  $2054.9 \pm 211.5 \, \Delta\%/min$  to L-NAME + 126 ng insulin:  $1267.4 \pm 134.1 \, \Delta\%/min$  (see Figure 2). This attenuated urinary ion excretion was associated with a significant increase in post-proximal sodium reabsorption (Figure 2). The renal natriuretic responses, confirming previous studies, were not altered by centrally 0.15 M NaCl or isolated 60 µg L-NAME administration (Figure 2). Likewise, C<sub>Cr</sub>, natriuresis and kaliuresis were unaffected by 126 ng insulin administered *sc*.

#### Discussion

In the current study, we confirmed that centrally administered insulin produced a substantial increase in the urinary output of Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup>, and tested the hypothesis that the centrally insulin-induced renal ion excretion is, at least in part, related to changes in CNS NO-dependent neural pathways since the insulin response was significantly attenuated by simultaneous *icv* L-NAME administration. In addition, we showed that blunted insulin-induced natriuresis occurred by increasing post-proximal tubule Na<sup>+</sup> reabsorption, despite an unchanged C<sub>Cr</sub> (Figure 1) and was proportional to the filtered Na<sup>+</sup> load.

Several investigators have shown that insulin infused into the cerebroventricular space can reach neuronal loci through ependymal cells or glial processes and enter the interstices of the underlying cerebral neuropil (12,26,27). Injection of labeled insulin into the lateral cerebral ventricles of rats produced heavy staining in regions closer to the third ventricle (14,28). We and other authors have carried out immunohistochemical analysis of the rat hypothalamus using an insulin receptor-specific antibody and the results showed a high concentration of this receptor in the arcuate nucleus and, to a lesser extent, in some periventricular neuronal bodies (11,12,14,27).

We have shown that acute icv insulin microinjection in rats promotes a dose-dependent increase in sodium excretion, followed by a post-proximal sodium excretion (17, 18, 29). Conversely, intravenous hyperinsulinemic euglycemic clamp and oral glucose test in humans and rats lead to antinatriuresis (30,31). The action of insulin in the CNS produces sympathetic nervous system activation although the neuronal intracellular mechanisms that mediate this are unknown. Muntzel et al. (10), using concentrations (0.42 to 42 µg/µL) close to ours, showed that administration of insulin into the third cerebral ventricle produces regionally nonuniform increases in sympathetic neural outflow. In this study, icv insulin administration failed to significantly increase adrenal or renal nerve activity. On the other hand, studies have shown that insulin injection in the periventricular area significantly reduces the efferent firing rate of peripheral sympathetic nerves and that this hypothalamic

Braz J Med Biol Res 42(12) 2009

effect is abolished when neurons are destroyed by injection of kainic acid (15). We, as well as others (3,4), have shown that carbachol and norepinephrine injection into the septal area, anterior lateral hypothalamus, and subfornical organ as well as the anterior portion of the third ventricle induces a dose-related natriuresis accompanied by a lesser degree of kaliuresis. All of these findings have led us to suggest that the natriuresis observed in the present study may result from either a significant and transient renal sympathetic inhibition or indirectly from a contribution of sympathetic and parasympathetic nervous system activation.

Studies have demonstrated that NO modulates synaptic activity and neuronal discharge rates in a dose-dependent manner. This response was more prominent in stimulus-on than in stimulus-off neurons and the inhibitory effect is partly mediated via purinergic or metabotropic glutamate receptors (22,23,32). Although the rationale for attenuated urinary sodium excretion observed after icv insulin administration in animals simultaneously treated with L-NAME remains unknown, speculatively, it is tempting to suggest that perhaps one of the efferent signals triggered by insulin in the CNS may be nitrergic in nature. Recently, several investigators have demonstrated that NO secretion regulates sympathetic neuronal activity in central cardiovascular control nuclei (33). Thus, it is possible that neurons modulated by insulin and containing nitrergic fibers (34) project from the CNS to peripheral organs, including the kidney.

It has been shown that many brain-specific natriuretic factors are located in periventricular structures related to water and salt balance control (3-5), demonstrating a possible link between insulin and natriuresis. Alternatively, we also cannot rule out the possibility that central NO-dependent neural pathways may control cholinergic, adrenergic or non-adrenergic non-cholinergic neurons and/or the hypothalamic/pituitary release of hormones, which in turn acutely modulates the action of insulin in the brain.

A possible indirect mechanism underlying the increase in renal sodium excretion includes insulin-induced changes in CNS glucose metabolism. However, experiments using relatively large doses of icv insulin or cultured neurons labeled with radioactive 2-deoxy-D-glucose support the traditional view that the brain is not responsive to insulin with respect to glucose uptake and metabolism (35). Furthermore, in a recent study, relatively large doses of icv insulin did not change the measured CSF glucose levels, supporting our conclusion that the insulin effect in the present study was not mediated by glucose deprivation (36,37). Under our experimental conditions, we showed that central insulin (126 ng) by itself decreased blood glucose levels, with no change in insulinemia. Because our experiments were not specifically designed to distinguish the mechanisms involved in this result we cannot rule out, at least in part, that decreased plasma glucose levels are associated with a significantly reduced efferent firing rate of peripheral sympathetic nerves induced by central insulin administra-

www.bjournal.com.br

tion. Taking into account the data from the present study, we suggest that the peripheral effect of insulin on urinary sodium retention may be physiologically counterbalanced by an acute central insulin action.

The remarkable findings of the present study suggest a novel concept, i.e., that central NO-dependent pathways may control the central action of insulin on renal function

#### References

- Brands MW, Hildebrandt DA, Mizelle HL, Hall JE. Sustained hyperinsulinemia increases arterial pressure in conscious rats. Am J Physiol 1991; 260: R764-R768.
- Modan M, Halkin H, Almog S, Lusky A, Eshkol A, Shefi M, et al. Hyperinsulinemia. A link between hypertension obesity and glucose intolerance. J Clin Invest 1985; 75: 809-817.
- Covian MR, Antunes-Rodrigues J, Gentil CG, Saad WA, Camargo LAA, Silva-Netto CR. Neural integration of physiological mechanisms and behavior. Toronto: University of Toronto Press; 1975.
- Gontijo JA, Garcia WE, Figueiredo JF, Silva-Netto CR, Furtado MR. Renal sodium handling after noradrenergic stimulation of the lateral hypothalamic area in rats. Braz J Med Biol Res 1992; 25: 937-942.
- McCann SM, Franci CR, Favaretto AL, Gutkowska J, Antunes-Rodrigues J. Neuroendocrine regulation of salt and water metabolism. *Braz J Med Biol Res* 1997; 30: 427-441.
- Shapiro E, Brown SD, Saltiel AR, Schwartz JH. Short-term action of insulin on Aplysia neurons: generation of a possible novel modulator of ion channels. *J Neurobiol* 1991; 22: 55-62.
- Figlewicz DP, Szot P, Israel PA, Payne C, Dorsa DM. Insulin reduces norepinephrine transporter mRNA *in vivo* in rat locus coeruleus. *Brain Res* 1993; 602: 161-164.
- Knusel B, Michel PP, Schwaber JS, Hefti F. Selective and nonselective stimulation of central cholinergic and dopaminergic development *in vitro* by nerve growth factor, basic fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin and the insulin-like growth factors I and II. *J Neurosci* 1990; 10: 558-570.
- Anderson EA, Hoffman RP, Balon TW, Sinkey CA, Mark AL. Hyperinsulinemia produces both sympathetic neural activation and vasodilation in normal humans. *J Clin Invest* 1991; 87: 2246-2252.
- Muntzel MS, Morgan DA, Mark AL, Johnson AK. Intracerebroventricular insulin produces nonuniform regional increases in sympathetic nerve activity. *Am J Physiol* 1994; 267: R1350-R1355.
- Porter JP. Effect of intrahypothalamic insulin on sympathetic nervous function in rats drinking a high-sucrose solution. Am J Physiol 1994; 266: R1463-R1469.
- Schwartz MW, Bergman RN, Kahn SE, Taborsky GJ Jr, Fisher LD, Sipols AJ, et al. Evidence for entry of plasma insulin into cerebrospinal fluid through an intermediate compartment in dogs. Quantitative aspects and implications for transport. J Clin Invest 1991; 88: 1272-1281.
- Xavier F, Magalhaes AM, Gontijo JA. Effect of inhibition of nitric oxide synthase on blood pressure and renal sodium

www.bjournal.com.br

and that this system might be related to alterations of the brain insulin circuit.

#### Acknowledgments

Research supported by CNPq (#500868/91-3), CAPES and FAPESP (#06/52431-1).

handling in renal denervated rats. Braz J Med Biol Res 2000; 33: 347-354.

- Carvalheira JB, Siloto RM, Ignacchitti I, Brenelli SL, Carvalho CR, Leite A, et al. Insulin modulates leptin-induced STAT3 activation in rat hypothalamus. *FEBS Lett* 2001; 500: 119-124.
- Sakaguchi T, Bray GA. Intrahypothalamic injection of insulin decreases firing rate of sympathetic nerves. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 2012-2014.
- Sauter A, Goldstein M, Engel J, Ueta K. Effect of insulin on central catecholamines. *Brain Res* 1983; 260: 330-333.
- Michelotto JB, Carvalheira JB, Saad MJ, Gontijo JA. Effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling in kidney-denervated rats. *Brain Res Bull* 2002; 57: 613-618.
- Macedo RF, Furlan FC, Marshall PS, Michelotto JB, Gontijo JA. Effect of intracerebroventricularly injected insulin on urinary sodium excretion by cerebroventricular streptozotocintreated rats. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36: 1193-1199.
- Menegon LF, Zaparolli A, Boer PA, de Almeida AR, Gontijo JA. Long-term effects of intracerebroventricular insulin microinjection on renal sodium handling and arterial blood pressure in rats. *Brain Res Bull* 2008; 76: 344-348.
- Shankar R, Zhu JS, Ladd B, Henry D, Shen HQ, Baron AD. Central nervous system nitric oxide synthase activity regulates insulin secretion and insulin action. J Clin Invest 1998; 102: 1403-1412.
- Matarredona ER, Murillo-Carretero M, Moreno-Lopez B, Estrada C. Role of nitric oxide in subventricular zone neurogenesis. *Brain Res Brain Res Rev* 2005; 49: 355-366.
- Kostin A, Stenberg D, Kalinchuk AV, Porkka-Heiskanen T. Nitric oxide modulates the discharge rate of basal forebrain neurons. *Psychopharmacology* 2008; 201: 147-160.
- Mehta B, Begum G, Joshi NB, Joshi PG. Nitric oxidemediated modulation of synaptic activity by astrocytic P2Y receptors. J Gen Physiol 2008; 132: 339-349.
- Lovenberg W. Techniques for measurements of blood pressure. *Hypertension* 1987; 9: 15-16.
- Boer PÁ, Morelli JM, Figueiredo JF, Gontijo JA. Early altered renal sodium handling determined by lithium clearance in spontaneously hypertensive rats (SHR): role of renal nerves. *Life Sci* 2005; 76: 1805-1815.
- Brightham MW. The intracerebral movement of protein injected into blood and cerebrospinal fluid of mice. *Brain Res* 1968; 29: 19-40.
- Schwartz MW, Sipols A, Kahn SE, Lattemann DF, Taborsky GJ Jr, Bergman RN, et al. Kinetics and specificity of insulin uptake from plasma into cerebrospinal fluid. *Am J Physiol* 1990; 259: E378-E383.

Braz J Med Biol Res 42(12) 2009

- van Houten M, Posner BI, Kopriwa BM, Brawer JR. Insulinbinding sites in the rat brain: *in vivo* localization to the circumventricular organs by quantitative radioautography. *Endocrinology* 1979; 105: 666-673.
- Furlan FC, Marshall PS, Macedo RF, Carvalheira JB, Michelotto JB, Gontijo JA. Acute intracerebroventricular insulin microinjection after nitric oxide synthase inhibition of renal sodium handling in rats. *Life Sci* 2003; 72: 2561-2569.
- Defronzo RA, Cooke CR, Andres R, Faloona GR, Davis PJ. The effect of insulin on renal handling of sodium, potassium, calcium, and phosphate in man. J Clin Invest 1975; 55: 845-855.
- Gontijo JA, Muscelli EO. Reduced renal sodium excretion in primary hypertensive patients after an oral glucose load. *Braz J Med Biol Res* 1996; 29: 1291-1299.
- Austgen JR, Fong AY, Foley CM, Mueller PJ, Kline DD, Heesch CM, et al. Expression of group I metabotropic glutamate receptors on phenotypically different cells within the nucleus of the solitary tract in the rat. *Neuroscience* 2009; 159: 701-716.

- Carlson SH, Wyss JM. Neurohormonal regulation of the sympathetic nervous system: new insights into central mechanisms of action. *Curr Hypertens Rep* 2008; 10: 233-240.
- Krowicki ZK, Sharkey KA, Serron SC, Nathan NA, Hornby PJ. Distribution of nitric oxide synthase in rat dorsal vagal complex and effects of microinjection of nitric oxide compounds upon gastric motor function. J Comp Neurol 1997; 377: 49-69.
- Heidenreich KA, de Vellis G, Gilmore PR. Functional properties of the subtype of insulin receptor found on neurons. J Neurochem 1988; 51: 878-887.
- Chowers S, Lavy S, Halpern L. Effect of insulin administered intracistemally on the glucose level of the blood and cerebrospinal fluid in vagotomized dogs. *Exp Neurol* 1968; 14: 383-389.
- Kuo SW, Hsieh JH, Wu WC, Horng HT, Shian LR, Chai CY. Effects of insulin on the cardiovascular integrating mechanisms of brain stem in cats. *Am J Physiol* 1993; 265: E609-E616.