

BIOTRANS

Programa de Pós-Graduação em
Biomedicina Translacional

Mestrado e Doutorado



AMAURY PEREIRA ACÁCIO

**DIFERENTES RESPOSTAS ANTIHIPERTENSIVAS E METABÓLICAS À
ROSTAFUROXINA EM RATOS MACHOS NORMONUTRIDOS E DESNUTRIDOS:
EFEITOS NO MANEJO DE Na^+ CORPORAL**

Duque de Caxias

2023

AMAURY PEREIRA ACÁCIO

**DIFERENTES RESPOSTAS ANTIHIPERTENSIVAS E METABÓLICAS À
ROSTAFUROXINA EM RATOS MACHOS NORMONUTRIDOS E DESNUTRIDOS:
EFEITOS NO MANEJO DO Na⁺ CORPORAL**

Tese de Doutorado apresentado ao programa de Pós Graduação em Biomedicina Translacional/BIOTRANS, UNIGRANRIO-UERJZO-INMETRO, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biomédicas.

Orientador: Adalberto Vieyra

**Duque de Caxias
2023**

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UNIGRANRIO – NÚCLEO DE COORDENAÇÃO DE BIBLIOTECAS

Acácio, Amaury Pereira

Diferentes respostas antihipertensivas e metabólicas à Rostafuroxina em ratos machos normonutridos e desnutridos: efeitos no manejo de Na⁺ corporal./ Amaury Pereira Acácio. – Rio de Janeiro, 2023.

77 f.

Orientador: Prof. Dr. Adalberto Vieyra.

Tese de Doutorado (Programa de Pós Graduação em Biomedicina Translacional)

Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO)/ Universidade Estadual do Rio de Janeiro – Zona Oeste (UERJ-ZO)/ Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO).

1. Desnutrição 2. ATPases transportadoras de Na⁺ 3. Rostafuroxina 4. Hipertensão 5. Esteroides cardiotônicos.



ATA DE DEFESA DE TESE DE DOUTORADO

Às 10 horas, do dia 21 de novembro de 2023, o Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional, realizou sessão de apresentação de Tese do Doutorado versando sobre o projeto intitulado "Diferentes respostas antihipertensivas e metabólicas à Rostafuroxina em ratos machos normonutridos e desnutridos: efeitos no manejo de Na⁺ corporal", de autoria de Amaury Pereira Acácio, aluno do Doutorado Acadêmico, sob orientação do Professor Adalberto Ramon Vieyra. A sessão foi aberta pela Profa. Ana Carolina Proença da Fonseca, presidente da Comissão, que nos termos regimentais convocou os demais Membros da Comissão Examinadora: Prof. Leonardo Boldrini, Prof. Luís Eduardo Quintas e Prof. Carlos Frederico Leite Fontes e do Prof. Adalberto Ramon Vieyra. Em seguida, passou a palavra ao candidato para apresentação de seu trabalho. Após a apresentação, o candidato foi arguido pelos examinadores e suas respostas foram consideradas satisfatórias.

O presidente declarou o doutorando Amaury Pereira Acácio apto, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biomédicas, de acordo como o Regulamento do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional do convênio tripartite entre UNIGRANRIO, INMETRO e UERJ. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão, em que foi lavrada a presente ata, que será assinada pelos Membros da Comissão Examinadora.

Duque de Caxias, 21 de novembro de 2023.

Ana Carolina Proença da Fonseca

Profa. Dra. Ana Carolina Proença da Fonseca
Universidade UNIGRANRIO | AFYA
Presidente da Banca

Prof. Dr. Leonardo Boldrini

Prof. Dr. Leonardo Boldrini
Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia – INMETRO

Prof. Dr. Luís Eduardo Quintas

Prof. Dr. Luís Eduardo Quintas
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof. Dr. Carlos Frederico Leite Fontes

Prof. Dr. Carlos Frederico Leite Fontes
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Prof. Dr. Adalberto Ramon Vieyra

Prof. Dr. Adalberto Ramon Vieyra
Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Agradecimentos

À Deus, em primeiro lugar pela oportunidade de viver e poder estar terminando esse Doutorado.

À minha mãe Marlene Pereira Acácio e irmão Maurício Pereira Acácio, sempre presentes e apoiadores em momentos cruciais da minha vida. Obrigado a Deus pelas chances a mim proporcionadas de poder compartilhar momentos tão especiais.

À minha namorada, Aghatta Medeiros, pelo apoio incondicional e o entendimento de momentos em que eu estava ausente.

À Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO), por me proporcionar a oportunidade de desenvolvimento e qualificação profissional.

Ao meu orientador, Professor Adalberto Vieyra por me conceder a oportunidade de participar de sua linha de pesquisa e crescer em sabedoria dentro de uma área tão abrangente como a Fisiologia Renal.

Ao Laboratório Físico-Química Biológica Aída Hasson-Voloch e o Laboratório de Farmacologia Renal pelo convívio e troca de conhecimentos.

Ao Coordenador, Docentes e Servidores do Programa de Pós-Graduação, pela

Atenção e presteza.

Aos amigos da UFRJ e BIOTRANS pelo incentivo e apoio prestados.

E, em especial, ao meu grupo de trabalho composto pela Técnica Glória Sarmiento, o pós doutor Humberto Muzi e aos alunos de iniciação científica João Pedro Veloso e a Camile Rodrigues que além de todo o apoio técnico laboratorial para a execução da tese, não mediram esforços para me auxiliarem em todos os momentos, sem as quais não seria possível a realização desta Tese.

“Nenhuma grande descoberta foi feita jamais sem um palpite ousado.”

Isaac Newton.

Resumo

O objetivo da presente Tese foi investigar se a desnutrição crônica modifica as respostas à Rostafuroxina em ratos jovens desnutridos e hipertensos. Hipotetizamos que a alta atividade do sistema renina-angiotensina-aldosterona local encontrado em ratos desnutridos poderia sustentar estas mudanças. A desnutrição crônica foi induzida em ratos machos usando uma dieta multideficiente conhecida como Dieta Básica Regional (DBR), mimetizando hábitos alimentares em regiões empobrecidas em todo o mundo. Os animais receberam a DBR – ou uma dieta controle/CTR para roedores – desde o desmame até 90 dias; e Rostafuroxina (1 mg/kg de massa corporal) foi administrada por via oral durante os últimos 30 dias. Ratos desnutridos tornaram-se hipertensos aos 55–60 dias de idade (registro por pletismografia de cauda). Durante os últimos dois dias, os ratos foram alojados em gaiolas metabólicas para medir ingesta de alimento/energia, água e Na^+ , e volume urinário. Sangue e rins foram coletados após a eutanásia no dia 90. A Rostafuroxina aumentou a ingestão de alimento/energia e Na^+ em ratos CTR e DBR, mas teve efeitos opostos no balanço de Na^+ (ingestão menos excreção urinária): negativo em CTR e positivo em DBR. A droga normalizou a diminuição da concentração plasmática de Na^+ encontrada em ratos DBR, aumentou o volume urinário em DBR, mas não em CTR, e diminuiu e aumentou a concentração urinária de Na^+ nos grupos DBR e CTR, respectivamente. A Rostafuroxina diminuiu a atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ sensível a ouabaína e aumentou a da $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ sensível a furosemida e resistente a ouabaína das células do túbulo proximal em ambos os grupos; e normalizou a pressão arterial sistólica em DBR sem efeito em ratos CTR. Concluimos que a desnutrição crônica modifica a resposta à Rostafuroxina da pressão arterial, do metabolismo calórico, da distribuição de Na^+ nos compartimentos líquidos, da mobilização de Na^+ de compartimentos não osmóticos, do balanço hídrico e de Na^+ e a atividade das ATPases renais transportadoras de Na^+ .

Palavras-chave: Rostafuroxina; hipertensão arterial; desnutrição crônica; Dieta Básica Regional; balanço de sódio e água; ATPases renais transportadoras de Na^+

Abstract

The aim of this PhD Thesis was to investigate whether chronic undernutrition modifies the response to rostafuroxin in juvenile rats. Chronic undernutrition was induced in male rats using a multideficient diet known as Regional Basic Diet (RBD), mimicking alimentary habits in impoverished regions worldwide. Animals were given RBD – or a control/CTRL normal diet for rodents – from weaning to 90 days, and rostafuroxin (1 mg/kg body mass) was orally administered during the last 30 days. Undernourished rats became hypertensive at 55–60 days of age (tail-cuff recording). During the last two days, the rats were hosted in metabolic cages to measure ingestion of food/energy, water, and Na^+ ; and urinary volume. Blood and kidneys were collected after euthanasia on day 90. Rostafuroxin increased food/energy and Na^+ intake in CTRL and RBD rats but had opposite effects on Na^+ balance (intake minus urinary excretion): negative in CTRL and positive in RBD. The drug normalized the decreased plasma Na^+ concentration found in RBD rats, increased urinary volume in RBD but not in CTRL, and decreased and increased urinary Na^+ concentration in the RBD and CTRL groups, respectively. Rostafuroxin decreased the ouabain-sensitive ($\text{Na}^+ + \text{K}^+$)ATPase and increased the ouabain-resistant, furosemide-sensitive Na^+ -ATPase from proximal tubule cells in both groups, and normalized the systolic blood pressure in RBD without effect in CTRL rats. We conclude that chronic undernutrition modifies the response of blood pressure, caloric metabolism, Na^+ distribution in liquid compartments, mobilization of Na^+ from non-osmotic compartments, Na^+ and water balance, and activity of renal Na^+ -transporting ATPases to rostafuroxin.

Keywords: Rostafuroxin; arterial hypertension; chronic undernutrition; Regional Basic Diet; sodium and water balance; renal Na^+ -transporting ATPases

Lista de Ilustrações

pag

Figura 1. Evolução da desnutrição no mundo entre 2005 a 2021.....	15
Figura 2. Distribuição mundial da fome, considerando níveis de insegurança alimentar de 2021.....	16
Figura 3. Associação de processos de geração de gases de efeito estufa e aquecimento global com insegurança alimentar e com desnutrição e obesidade.....	17
Figura 4. Modelo proposto para interações entre mudanças climáticas e COVID-19.....	18
Figura 5. Citações (até 2020) do trabalho de Teodósio <i>et al.</i> (1990) em diferentes disciplinas e processos.....	24
Figura 6. Bufadienolídeos.....	26
Figura 7. Molécula de Rostafuroxina.....	28
Figura 8. Linha do tempo da obtenção e do tratamento dos grupos experimentais.....	33
Figura 9. Massa corporal dos animais no 90º dia de vida.....	39
Figura 10. Ingesta de ração e energia em 24h.....	41
Figura 11. Dosagem da concentração de albumina plasmática ([albumina] _{pls}).....	43
Figura 12. Ingesta de Na ⁺ em 24 h.....	44
Figura 13. Ingesta de água em 24 h.....	46
Figura 14. Medidas de volume urinário em 24 h, concentração urinária de Na ⁺ e excreção urinária de Na ⁺ em 24 h.....	48
Figura 15. Balanço de Na ⁺ em 24 h.....	50
Figura 16. Balanço de água em 24 h	53
Figura 17. Concentração plasmática de Na ⁺ ([Na ⁺] _{pls}).....	55
Figura 18. Atividade das ATPases transportadoras de Na ⁺ em túbulos proximais renais.....	58
Figura 19. Pressão arterial sistólica.....	60
Figura 20. “Graphical Abstract” do manuscrito vinculado à Tese (ANEXO I)	63

Lista de tabelas**pag**

Tabela 1. Composição da dieta controle (CTR) e da Dieta Básica Regional (DBR).....	23
---	----

Lista de abreviaturas e siglas

$[Na^+]_{pls}$:	Concentração plasmática de sódio
$[Na^+]_{ur}$:	Concentração urinária de sódio
AMP :	Adenosina monofosfato
Ang II:	Angiotensina 2
Ang-(3–4):	Angiotensina 3-4
ANOVA:	Análise de Variância
ARRIVE:	Pesquisa Animal: Cuidados em experimentos <i>in vivo</i>
ATP :	Adenosina trifosfato
Bis-TRIS-Propano :	1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamino)propano
Ca^{2+} :	Cálcio
CEUA :	Comissão de Ética para o Uso de Animais
COVID-19:	Doença do Coronavírus de 2019
CTR :	Grupo Controle
DBR :	Dieta Básica Regional
EDTA :	Ácido etilenodiamino tetra acético
FAO :	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FIOCRUZ:	Fundação Oswaldo Cruz
GBD:	Carga Global de Morbidade
HCl :	Ácido Clorídrico
HEPES :	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanossulfônico
HNO_3 :	Ácido Nítrico
K^+	Potássio
KCl :	Cloreto de Potássio
MC	Massa corporal
$MgCl$:	Cloreto de Magnésio
Na^+	Sódio
NaCl :	Cloreto de Sódio
NCD:	Doenças Crônicas Não Transmissíveis
P_i :	Fosfato inorgânico
PLS:	Plasmático
PMSF :	Fluoreto de Fenilmetilsulfonilureia
PST 2238 :	17beta-(3-furil)-5beta-androstano-3beta, 14beta, 17alfa-triol
Rosta:	Rostafuroxina
RPM :	Rotações por minuto
SRAA:	Sistema Renina-Angiotensina-Aldosterona
Src-SH2:	Domínio SH2 da proto-oncogênica tirosina kinase
TRIS :	Hidroximetil-aminometano
Ur:	Urinário
UNICEF:	Fundo das Nações Unidas para a Infância

WHO:

Organização Mundial da Saúde

1. Introdução

1.1. A desnutrição no mundo. Coexistência com outras pandemias num contexto histórico.

A Humanidade, ao longo da História de milênios, conviveu com a fome e a desnutrição de maneira crônica em vastas e mutantes regiões do mundo, com agravamentos agudos que – muitas vezes – foram de longa duração (Otter, 2010). A fome, definida como *uma sensação física desconfortável ou dolorosa causada pelo consumo insuficiente de energia alimentar* (WHO, 2021) se separa conceitualmente da desnutrição, definida como *a condição de um indivíduo cujo consumo habitual de alimentos é insuficiente para fornecer em média a quantidade de energia dietética necessária para manter uma vida normal ativa e saudável* (FAO, 2022). Todavia, a própria FAO tem usado a prevalência de desnutrição como indicador para estimar a fome no mundo, de modo que a fome pode ser referida – e compreendida – como desnutrição (FAO, 2022) e, portanto, como categorias intercambiáveis. Categorias que se ressentem da desigualdade socioeconômica e que identificam a fome como a principal consequência da primeira, agravada pela precariedade de acesso a serviços de saúde, água potável e saneamento básico (Global Hunger Index, 2022). Aos dois conceitos se soma o da insegurança alimentar, definida como *falta de garantias para o acesso regular e permanente a alimentos em quantidade e qualidade suficiente para a sobrevivência* (FAO, 2022).

Na insegurança alimentar podem ser reconhecidos diferentes níveis. Ela é considerada **moderada** *quando as pessoas reduzem a qualidade e/ou a quantidade de seus alimentos e estão inseguras sobre a sua capacidade de obtê-los devido à falta de dinheiro ou outros recursos*. Torna-se **severa** *quando as pessoas permanecem sem alimentos, passando um dia ou mais sem se alimentar, tornando-se um indicador de fome* (FAO, 2022). Estes documentos recentes também estimam em aproximadamente

800.000.000 pessoas aqueles que se encontram atualmente em situação de fome no mundo. Um aumento de 150.000.000 pessoas desde o início da pandemia de COVID-19, refletindo desigualdades exacerbadas entre os países na recuperação econômica e na perda de renda entre os mais afetados pela pandemia. A Figura 1 mostra a evolução temporal da prevalência de desnutrição no mundo 2005–2021, que permite visualizar um aumento acelerado a partir do início da pandemia depois de um decréscimo inicial e de estabilização a partir de 2015. Em números, um aumento de 8% para quase 10%.

Se a Figura 1 apresenta dados referentes ao mundo como um todo, a Figura 2 individualiza para cada país os diferentes níveis de desnutrição por severidade, sendo que o nível baixo corresponde a $\leq 9,9\%$ da população sob condições (somadas) de insegurança alimentar/desnutrição e o extremamente alarmante a partir de uma porcentagem somando $\geq 50\%$. Note-se a existência de níveis alarmantes (35,0–49,9%) em países conflagrados da África Central, na Síria, na Somália, e no Yemen, o que mostra o papel da guerra e da instabilidade política para o crescimento e a persistência da fome em regiões empobrecidas.

A associação entre evolução da desnutrição no mundo e a recente pandemia de COVID-19 acima mencionada, nos conduz a um conceito desenvolvido em anos recentes: o de sindemia ou ocorrência simultânea de várias pandemias (Swinburn *et al.*, 2019), entrelaçadas na causalidade e nas consequências. O estudo do grupo de trabalho do periódico The Lancet mencionava em 2019 apenas as pandemias de desnutrição, de obesidade e de mudanças climáticas constituindo numa sindemia, reconhecida como de grandes proporções (Dietz & Pryor, 2022). As Figuras 3 e 4 esquematizam, respectivamente as propostas/processos envolvendo mudanças que as entrelaçam com desnutrição e obesidade (Figura 3) e com a recente pandemia de COVID-19 (Figura 4), que poderá ser outra ainda desconhecida em futuros não previsíveis.

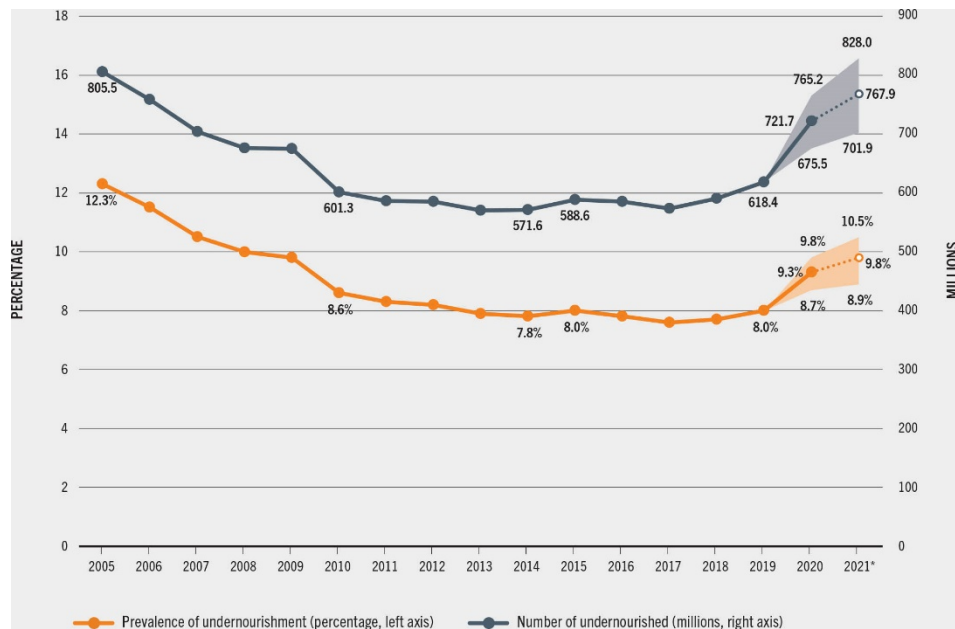


Figura 1. Evolução da desnutrição no mundo entre 2005 e 2021. O gráfico apresenta porcentagens (curva laranja) e número absoluto de pessoas desnutridas em milhões (curva azul). Retirado de FAO, 2022; com permissão.

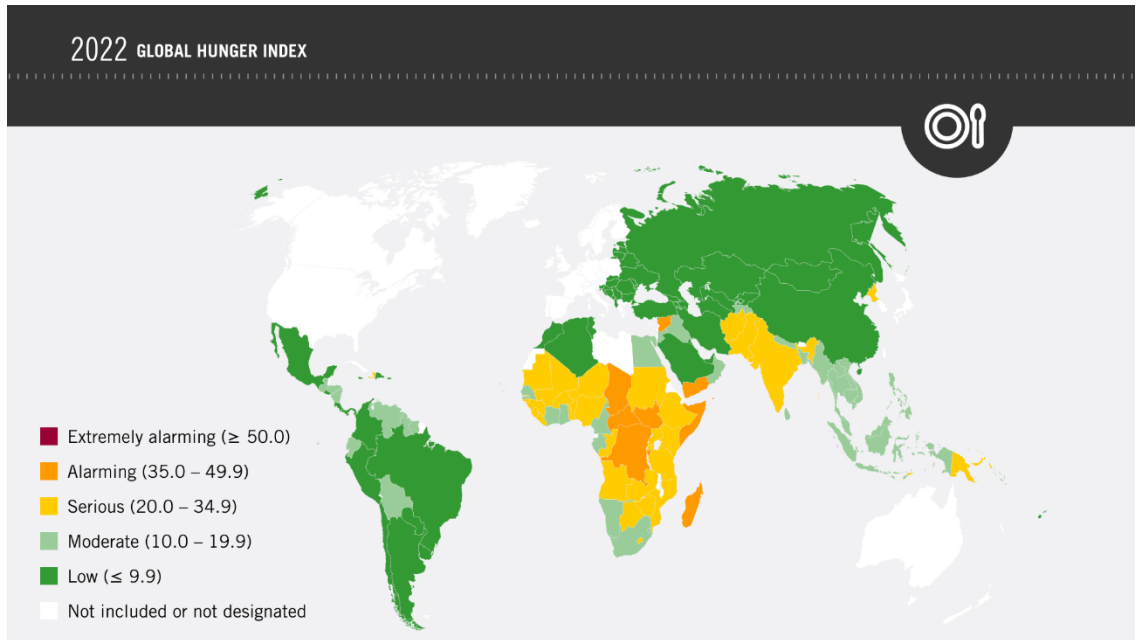


Figura 2. Distribuição mundial da fome, considerando níveis de insegurança alimentar. Retirado de FAO, 2022; com permissão.

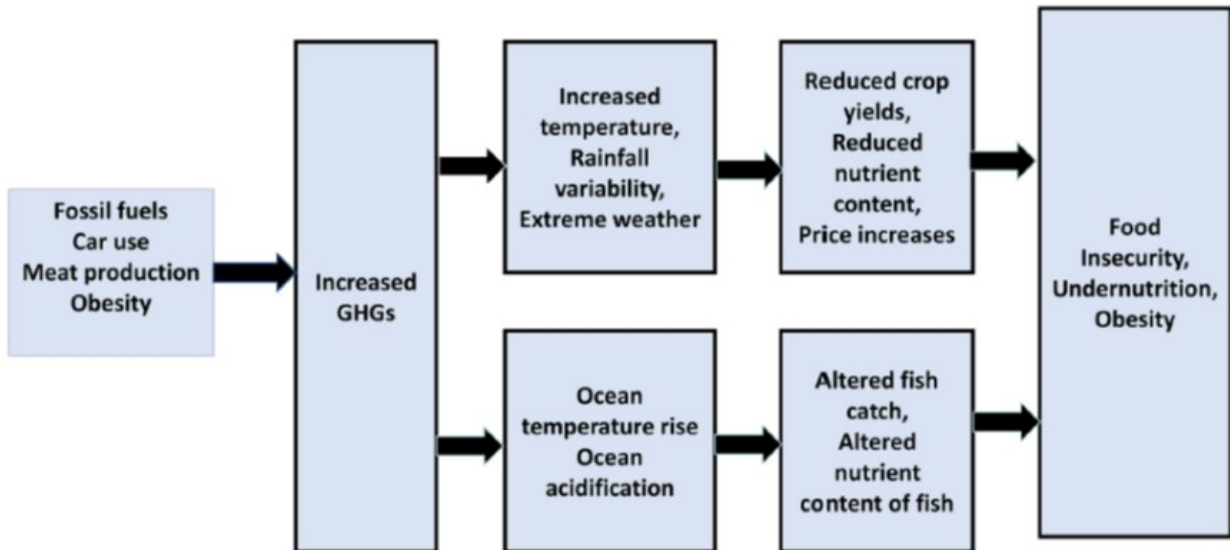


Figura 3. Esquema que associa processos de geração de gases de efeito estufa e aquecimento global com insegurança alimentar e com desnutrição e obesidade. Retirado de Dietz & Pryor, 2022; com permissão.

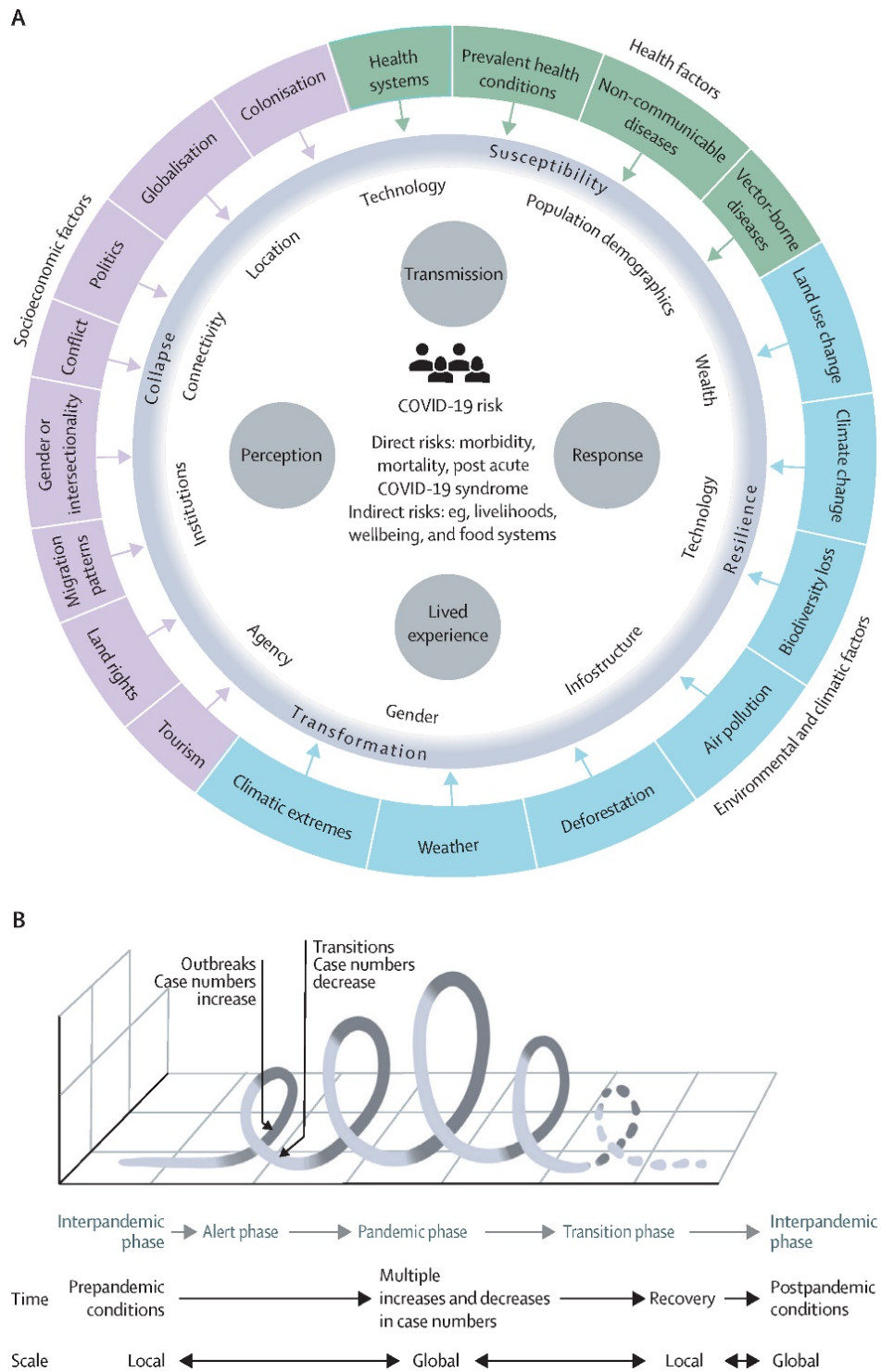


Figura 4. Modelo proposto para interações entre mudanças climáticas e COVID-19. **(A)** Fatores socioeconômicos, climáticos e de saúde aumentando o risco de COVID-19 através do impacto em diferentes alvos. **(B)** Fases de crescimento e involução da pandemia da COVID-19 considerando tempos e escalas geográficas diferentes. Note-se a associação entre a pandemia de COVID-19 e a patologias crônicas não transmissíveis indicada na parte superior externa do esquema. Retirado de Ford *et al.*, 2022; com permissão.

1.2. A desnutrição no Brasil: O agravamento nos últimos anos.

Embora a Figura 2 mostre o Brasil com um nível de insegurança alimentar baixo ($\leq 9,9\%$), a situação não pode ser considerada aceitável em número absoluto de pessoas e, fundamentalmente, em função da evolução em anos recentes e das acentuadas disparidades regionais. Desde uma perspectiva diferente, deve ser considerado que o país havia saído do Mapa da Fome da FAO em 2014, mas voltou a figurar em anos seguintes, com agravamento especial ao longo da pandemia de COVID-19 (c.f. Guedes, 2022; agência senado). Merece citação o seguinte texto da mesma publicação, que quantifica esse quadro de insegurança alimentar: *“Em 2022, o Segundo Inquérito Nacional sobre Insegurança Alimentar no contexto da pandemia de COVID-19 apontou que 33,1 milhões de pessoas não têm garantido o que comer – o que representa 14 milhões brasileiros em situação de fome. Conforme o estudo, mais da metade (58,7%) da população brasileira convive com a insegurança alimentar em algum grau: leve, moderado ou grave.”* (c.f. Guedes, 2022; agência senado).

A análise da distribuição geográfica destas porcentagens nos mostra outra dimensão da gravidade deste quadro no Brasil. A média nacional de 58,7% esconde que ela chega a 68% no Nordeste e a 72% no Norte. Assim, a fome faz parte do dia-a-dia de 21% das famílias do Nordeste e de 26% das famílias da região Norte, sendo de 15% no país como um todo.

A questão do impacto da desnutrição em populações vulneráveis para além dos números mostrados na Figura 2, mereceram atenção em documento da Associação Brasileira de Nutrição em 2018 com base em relatório da FAO. Este relatório destacava que a fome, a desnutrição e a falta de micronutrientes têm impacto mais alto sobre as pessoas de baixa renda, mulheres, povos indígenas, afrodescendentes e famílias rurais da América Latina (incluindo o Brasil) e do Caribe. Comparativamente, as mulheres são mais afetadas que os homens e os indígenas mais do que os não indígenas, com uma

diferença que se acentua em crianças (Associação Brasileira de Nutrição, 2018).

Pela sua contemporaneidade, não se pode deixar de analisar a situação das populações indígenas no Brasil, especialmente em relação às crianças, estudada a partir de 2014. Em 2020, um relatório da UNICEF e da FIOCRUZ apontava que 80% das crianças yanomamis apresentava baixa estatura para a idade, 50% baixo peso para a idade e 70% diversos quadros de anemia e, para exemplificar o risco de associação entre a dupla carga de má nutrição (desnutrição com baixa estatura para a idade e risco de sobrepeso/obesidade), esta porcentagem alcançava quase 20% (UNICEF, 2020). Aos fatores já introduzidos acima, foram apontados o gasto energético dos grandes deslocamentos no interior da floresta para caça e coleta num cenário de abandono sanitário com limitado – ou impedido – acesso aos serviços básicos de saúde e de assistência social, além de uma permanente exposição a doenças endêmicas típicas da região, como malária e tuberculose (Pantoja *et al.*, 2014; Botto *et al.*, 2016; Caldart *et al.*, 2016; c.f. Orellana *et al.*, 2019).

Fora das situações de desigualdade acima mencionadas e de suas consequências, o Observa Infância, iniciativa da FIOCRUZ (2021), destaca que a grave crise econômica, a pandemia, a piora da renda familiar, o aumento da insegurança alimentar, o preço dos alimentos, as condições de moradia, a falta de saneamento básico, a queda das taxas de imunização e a desestruturação do sistema de saúde em todos os níveis levaram a um aumento significativo das hospitalizações associadas à desnutrição infantil, inclusive em grandes centros urbanos (Sociedade Brasileira de Pediatria, 2022).

1.3. Comorbidades da desnutrição.

Este aspecto, relacionado com processos patológicos que coexistem com quadros de desnutrição, pode ser abordado a partir de diferentes perspectivas ou situações: (i) idade dos acometidos; (ii) doenças frequentes provocadas pela desnutrição;

(iii) doenças agravadas pela desnutrição; (iv) caráter agudo ou crônico; (v) geográficas; (vi) sociais. Em alguns estudos, estas perspectivas se mesclam, como é caso de morbididades de idosos que vivem em situação de *home care*. Ou o caso de crianças submetidas às condições socioeconômicas analisadas na seção anterior. E, para mencionar outra possível combinação de maior complexidade, idade com caráter agudo e crônico da doença mais condições sanitárias precárias. Exemplificaremos a última destas situações combinadas e complexas com a alta frequência de tuberculose (com suas fases agudas e crônicas), pneumonias (tipicamente agudas), gastroenterites (agudas com potencial evolução para a cronicidade) e anemias (de evolução prolongada e de diferente etiologia), nos quadros de desnutrição infantil (Moate *et al.*, 2022).

Quadros de desnutrição, especialmente crônica, têm sido associados à gênese ou ao agravamento de lesões renais e cardiovasculares (Eroğlu, 2019; Lu *et al.*, 2022); mas a desnutrição durante a gestação também pode ser associada a variadas patologias renais e cardiovasculares da prole em roedores (Luzardo *et al.*, 2011; Kawarazaki & Fujita, 2021). Das mútuas interrelações entre desnutrição e doenças cardiovasculares e renais têm surgido mais recentemente o conceito de *diet-related noncommunicable diseases* (NCDs) (Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors Study/GBD, 2019) que aponta – em contraste com as patologias infecciosas agudas e crônicas acima mencionadas – para doenças como infarto de miocárdio, e acidente vascular cerebral ambos frequentemente associados a elevada pressão arterial, certos tipos de cânceres e diabetes, havendo-se demonstrado que dietas não saudáveis e nutrição pobre se encontram entre os principais fatores para estas doenças em todo o mundo (World Health Organization, 2022).

1.4. Modelos para o estudo da desnutrição em ensaios pré-clínicos: O significado da Dieta Básica Regional.

A maioria dos modelos de dietas empregados em estudos pré-clínicos de desnutrição é hipoproteica ou hipocalórica (Brown *et al.*, 2015; Eyzaguirre-Velasquez *et al.*, 2017; Vaughan *et al.*, 2018), não levando em consideração que a restrição alimentar implica também em deficiência de micronutrientes como vitaminas e minerais (Awuchi *et al.*, 2020), associada ou não a variadas alterações estruturais e funcionais do trato digestivo (Salameh *et al.*, 2019).

A conhecida como Dieta Básica Regional (DBR), formulada por Naíde Teodósio *et al.* pouco mais de 30 anos atrás (Teodósio *et al.*, 1990) com base nos hábitos alimentares das populações de vastas regiões de cultivo de cana de açúcar de Pernambuco, incorpora as diferentes carências tanto de macronutrientes (proteínas e lipídeos) quanto de micronutrientes como vitaminas e minerais (Tabela 1) (Teodósio *et al.*, 1990). Os quatro componentes desta dieta são farinha de mandioca (65 g%), feijão mulatinho (18 g%), batata doce (13 g%) e carne de charque (4 g%), ingredientes que pela sua natureza apontam também para o aspecto qualitativo da carência proteica e lipídica, devendo-se também destacar a ausência total de suplementação vitamínica (multicarência) e que a maioria das calorias é proveniente de glicídios, não de lipídeos. Muito embora os ingredientes possam ser diferentes, a DBR mimetiza também dietas carenciadas que são consumidas em diferentes regiões empobrecidas (rurais e urbanas) de países em desenvolvimento do Oriente Médio, América Latina e África, e em cinturões de pobreza de cidades de países desenvolvidos (Mc Laren & Pellet, 1970; Murillo *et al.*, 1974; Ramos-Aliaga, 1978).

A importância da DBR no estudo da desnutrição e do impacto desta na patogenia de várias doenças e disfunções afetando diversos órgãos e tecidos, é revelada pelo seu contínuo emprego em laboratórios de diferentes países do mundo ao longo dos últimos 30 anos e pelas citações recebidas (Figura 5) (Jannuzzi *et al.*, 2022). Como acima

Tabela 1. Composição das dietas controle (CTR) e multicarenciada (DBR)¹

	CTR ²	DBR ²
Proteínas % (g/100 g de alimento seco)	23 ³	8 ⁵
Carboidratos % (g/100 g de alimento seco)	41 ³	78 ⁵
Lipídeos % (g/100 g de alimento seco)	2,5 ³	1,7 ⁵
Na ⁺ (g/100 g de alimento seco)	0,34 ⁴	0,24 ⁴
Fe ³⁺ (g/100 g de alimento seco)	0,018 ³	0,007 ⁵
Ca ²⁺ (g/100 g de alimento seco)	1,8 ³	0,04 ⁵
K ⁺ (g/100 g de alimento seco)	0.9 ⁴	0.3 ⁴
Suprimento calórico (kcal/100 g de alimento seco)	278 ³	356 ⁵
Suplemento vitamínico ⁶	Sim ³	Não

¹ Adaptado de Muzi-Filho *et al.* (2015).² CTR, controle; DBR, Dieta Básica Regional.³ Como indicado pelo fabricante (Neovia Nutrição e Saúde Animal, Descalvado, Brasil)).⁴ Determinações por fotometria de chama.⁵ Composição porcentual com base nas determinações realizadas no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL), Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco (Teodósio *et al.*, 1990).⁶ Reeves (1997).

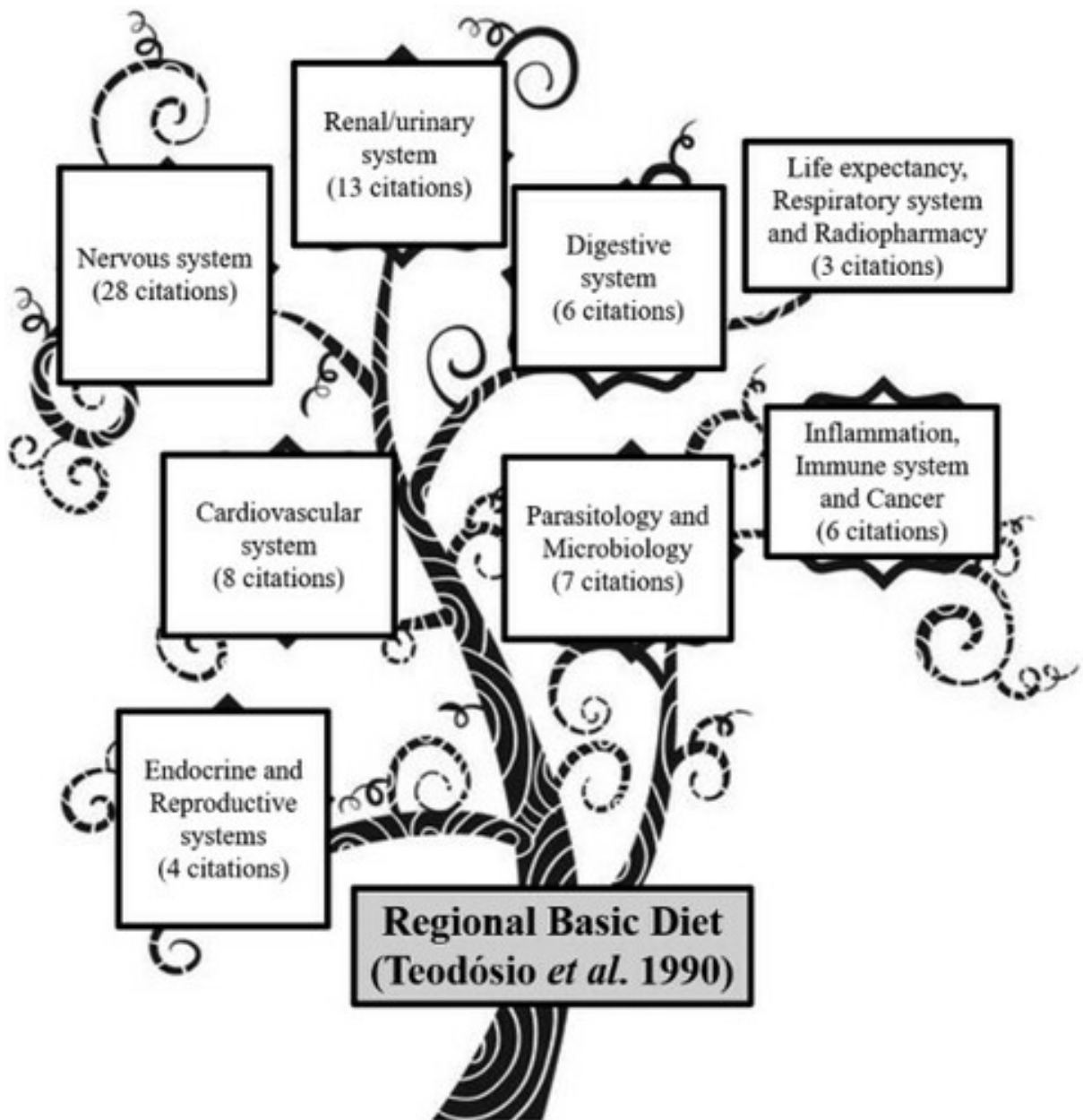


Figura 5. Citações (até 2020) do trabalho de Teodósio *et al.* (1990) em diferentes disciplinas e processos. Retirado de Jannuzzi *et al.* (2022), com permissão.

mencionado, as variadas situações de multicarência alimentar não apenas persistem como também se agravam em diferentes regiões do planeta. Por isso a DBR permanece como um interessante modelo para o estudo da desnutrição como ela é encontrada na realidade de vastas populações humanas e de como a desnutrição afeta diferentes órgãos e tecidos e diferentes funções fisiológicas e processos patológicos (Jannuzzi *et al.*, 2022).

1.5. Esteroides cardiotônicos circulantes: Uma nova visão da homeostasia dos líquidos corporais e da pressão arterial.

Os esteroides cardiotônicos circulantes (denominados em conjunto como “ouabaína endógena”) são compostos encontrados nos líquidos biológicos de espécies animais nos quais foram procurados, que desempenham um papel central na homeostasia de Na⁺ (Bagrov *et al.*, 2009). Com grande diversidade estrutural, todos eles apresentam, entretanto, um núcleo esteroidal em sua estrutura considerado o responsável pela ação farmacológica (Schönfeld *et al.*, 1985; Carvalho, 2019). Dentro dessa diversidade é possível agrupá-los em duas grandes classes em função do outro elemento estrutural central: o anel lactônico. Estas duas classes se resumem: (i) aos cardenolídeos (palavra derivada do grego *kardiā* – coração e “enolídeo” referente ao anel de lactona), e (ii) aos bufadienolídeos (palavra derivada do latim *bufo* – sapo) (Figura 6).

Os esteroides cardiotônicos são conhecidos desde o século XVIII por suas propriedades terapêuticas na insuficiência cardíaca congestiva (c. f. Blaustein, 1993). Mas os esteroides cardiotônicos também participam no desenvolvimento de disfunções cardiovasculares como a hipertensão arterial (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007). A proposta de sua existência data de 1885, em um estudo pioneiro da função cardíaca (Ringer, 1885; Schoner, 2002). Todavia, sua produção endógena em mamíferos – incluindo o homem – bem como seu papel fisiológico passaram a ser conhecidos a partir

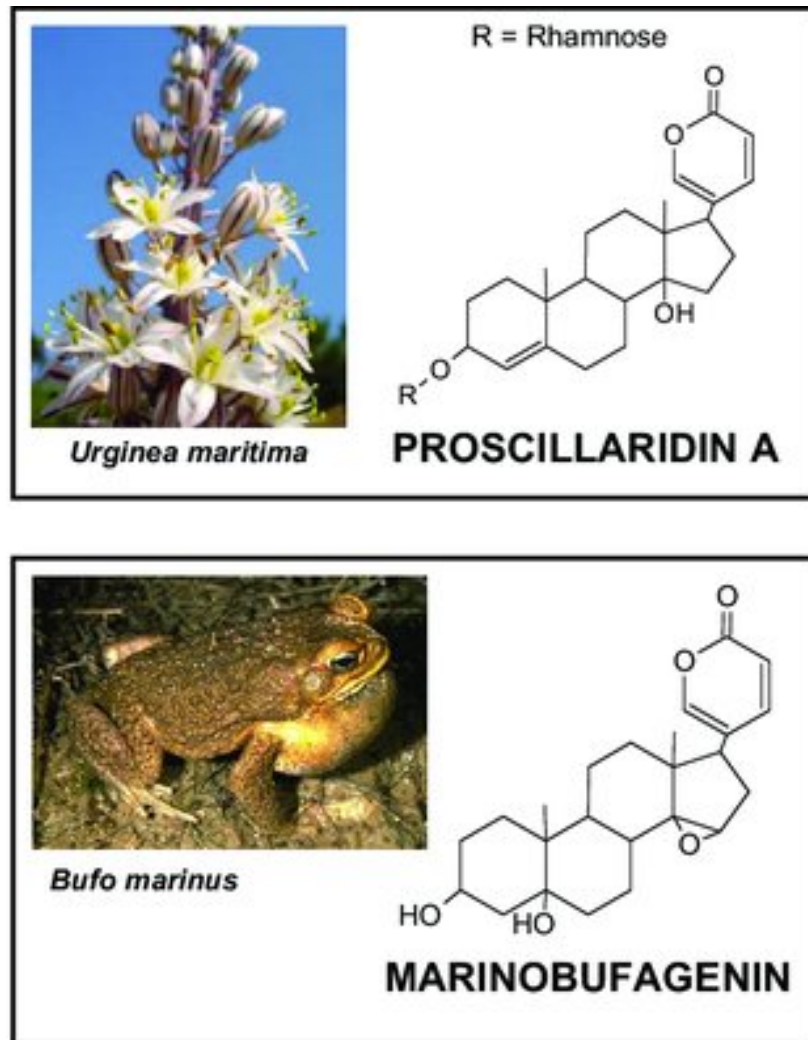


Figura 6. Bufadienolídeos Proscillaridina A (extraído da planta *Urginea maritima*) e Marinobufagenina (encontrado no sapo *Bufo marinus*). Retirado de Bagrov *et al.* (2009), com permissão.

dos anos de 1960 (De Wardener *et al.*, 1961), quando receberam o nome genérico de “Terceiro Fator” envolvido, junto com a aldosterona e o ritmo de filtração glomerular, na regulação da natriurese e, portanto, da homeostasia corporal de Na^+ . Circulando em concentrações nanomolares e subnanomolares, a “ouabaína endógena” funciona como um hormônio que, paradoxalmente, estimula processos celulares que culminam com a ativação da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ (Haas *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2000; Ferrandi *et al.*, 2004) e, portanto, com aumento da reabsorção de Na^+ através do epitélio renal (Ferrandi *et al.*, 2010). Todavia, também é possível induzir condições que revelam inibição da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$. Poucos anos depois das observações de De Wardener *et al.* (1961), os experimentos de Cort & Lichardus (1963) mostraram a existência de uma substância presente no sangue da veia jugular de gatos com a artéria carótida ocluída, capaz de induzir natriurese em ratos. Sessenta anos depois, estes experimentos podem ser interpretados como resultado da estimulação central da produção de “ouabaína endógena”.

1.6. Rostafuroxina: Um fármaco derivado da digitoxigenina ainda misterioso.

Rostafuroxina (um derivado da digitoxigenina) (Ferrari *et al.*, 2006) (Figura 7) é um agente anti-hipertensivo que atua como um antagonista dos esteroides cardiotônicos, incluindo a “ouabaína endógena” (Nesher *et al.*, 2009), cujo principal alvo molecular é a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ (Ferrandi *et al.*, 2002). Sintetizada nos anos de 1990, recebeu o nome de composto PST 2238 (Quadri *et al.*, 1997), foi caracterizada como sendo capaz de inibir “in vitro” a ligação da ouabaína à $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ de túbulos renais de rins de cachorro e de reduzir a pressão arterial de ratos com hipertensão arterial monogênica (ratos Milan hipertensos).

Os primeiros estudos sobre a ação anti-hipertensiva da Rostafuroxina enfatizaram o papel de dois mecanismos genético/moleculares no estabelecimento de hipertensão

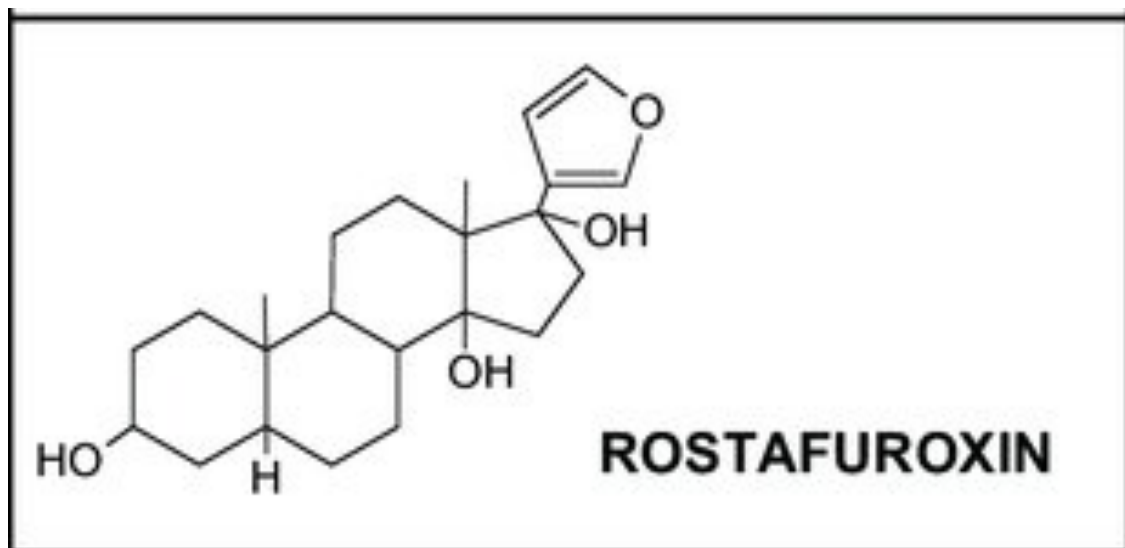


Figura 7. Rostafuroxina. Retirado de Bagrov *et al.* (2009), com permissão.

arterial em ratos e humanos (para uma revisão já clássica ver Ferrari, 2010): (i) a “ouabaína endógena”, já considerada à época um hormônio regulador da homeostasia salina com níveis circulantes geneticamente controlados (Ferrandi *et al.*, 1992, 1997; Manunta *et al.*, 2001); (ii) o polimorfismo de genes que codificam para a proteína do citoesqueleto aducina (Bianchi *et al.*, 1994; Casari *et al.*, 1995; Cusi *et al.*, 1997). A aducina participa em processos celulares chave como polimerização da actina, a regulação do volume celular e do transporte iônico, o contato célula:célula, o controle do tempo de residência da (Na⁺+K⁺)ATPase na membrana plasmática, o manejo de Ca²⁺ e diversos processos de sinalização celular (Matsuoka & Bennett, 2000; Efendiev *et al.*, 2004; Torielli *et al.*, 2008).

Ferrandi *et al.* (2010) propuseram – e apresentaram evidências – que variantes da isoforma α da aducina formam um complexo com a (Na⁺+K⁺)ATPase capaz de interagir com o domínio Src-SH2 da tirosina kinase Src. Como consequência desta interação aumenta a atividade desta tirosina kinase e a fosforilação da (Na⁺+K⁺)ATPase dependente da Src que, por sua vez, resulta no aumento da atividade da bomba. A Rostafuroxina exerceria seus efeitos natriuréticos e anti-hipertensivos bloqueando a ativação da Src em casos de variantes pró-hipertensivas da aducina.

2. Objetivos

2.1. Geral.

Investigar se a alteração no estado nutricional, especificamente a nesta Tese a desnutrição multifatorial crônica, modifica as respostas à esteroides cardiotônicos endógenos – e, portanto, à administração de Rostafuroxina – em processos e mecanismos associados ao controle da pressão arterial e à homeostasia dos líquidos corporais (água e Na⁺) em ratos machos na idade juvenil.

2.2. Específicos.

2.2.1. Investigar possíveis influências da administração prolongada de Rostafuroxina na evolução da massa corporal de ratos Wistar machos depois do desmame, até uma idade juvenil, alimentados com uma dieta controle (CTR) e com uma dieta multicarenciada (DBR).

2.2.2. Investigar um possível efeito da administração de Rostafuroxina na ingesta de alimentos e de calorias em ratos controle e cronicamente desnutridos.

2.2.3. Estudar variações da concentração de albumina plasmática como marca-dora de desnutrição crônica e um possível efeito modificador da Rostafuroxina.

2.2.4. Estudar o efeito da Rostafuroxina na ingesta alimentar de Na^+ e de água em ratos normonutridos e cronicamente desnutridos.

2.2.5. Investigar possíveis modificações no volume urinário, na concentração urinária de Na^+ e na excreção urinária de Na^+ em 24 h provocadas pela administração continuada de Rostafuroxina.

2.2.6. Investigar a repercussão da administração continuada de Rostafuroxina no balanço corporal diário de Na^+ e no balanço de água.

2.2.7. Estudar as repercussões de possíveis efeitos da desnutrição crônica e da administração prolongada de Rostafuroxina na concentração plasmática de Na^+ .

2.2.8. Investigar a evolução da pressão arterial sistêmica em ratos cronicamente desnutridos, estudando o efeito da administração de Rostafuroxina.

2.2.9. Estudar os efeitos da desnutrição crônica nas ATPases renais transportadoras de Na^+ , comparando-os com os exercidos na pressão arterial, investigando ainda possíveis efeitos da Rostafuroxina.

3. Material e Métodos

3.1. Considerações éticas.

Todos os procedimentos envolvendo animais foram aprovados sob o Protocolo 012/19 e submetidos à Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Rio de Janeiro/UFRJ (CEUA), onde a parte experimental da Tese foi desenvolvida, no marco do Termo de Cooperação entre esta Instituição e a UNIGRANRIO. Eles foram realizados seguindo as recomendações do Comitê Internacional de Editores de Periódicos Médicos. E os aspectos específicos envolvendo o trato e o cuidado com animais seguiram as orientações ARRIVE (Perci du Sert *et al.*, 2020).

3.2. Animais e tratamentos.

Ratos machos Wistar foram criados, alojados e tratados no Biotério de Doenças Negligenciadas e Desnutrição, vinculado ao Laboratório de Físico-Química Biológica Aída Hassón-Voloch no Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ. Os animais foram obtidos por acasalamento pelo método de harém, no qual 1 macho e 3 ou 4 fêmeas virgens (todos com 3–4 meses de vida) foram alojados por 14 dias na mesma gaiola, sendo alimentados com dietas normais para roedores (dieta comercial da Neovia Nutrição e Saúde; Tabela 1). Depois do nascimento da prole, os filhotes (machos e fêmeas) foram alojados com a respectiva mãe para garantir uma lactação uniforme, em condições controladas de temperatura ($23 \pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclo de luz claro/escuro (12h/12h). Após o desmame (28º dia após o nascimento), os filhotes machos (24–30 em cada uma das seis criações ao longo do desenvolvimento da Tese e pesando 50–70 g) foram divididos aleatoriamente – para evitar o “efeito ninhada” (Dickinson *et al.*, 2016) – em dois grupos com o mesmo número de animais: (1) controle (CTR, ratos que receberam a dieta convencional para roedores; (2) desnutrido (DBR, ratos que receberam a dieta multicarenciada). A partir do dia 60 de vida cada grupo foi subdividido em outros dois:

(CTR e DBR) que continuaram recebendo a alimentação diferenciada e outros, o **(3)** controle + Rostafuroxina (Aobius, Gloucester, USA) (CTR + Rosta) que passou a receber o fármaco (1 mg/kg massa corporal) diluído em etanol 99,5% (solução inicial de 10 mg/ml) diariamente por via oral, a partir do dia 60 e até o dia 90; e o **(4)** desnutrido + Rostafuroxina (DBR + Rosta), recebendo o fármaco na mesma dose e via de administração e pelo mesmo período. No 88º dia os ratos foram hospedados em gaiolas metabólicas individuais para aclimatação e posterior registro de ingesta de alimento e água e para coleta de urina, entre os dias 89 e 90. Os animais dos 4 grupos tiveram acesso livre à água e à respectiva comida, sendo mantidos em gaiolas ventiladas (Alesco, Monte Mor, Brasil). Não houve morte de ratos ao longo deste período. No dia 90 os ratos foram eutanasiados por decapitação, colhendo-se sangue e removendo os rins para a preparação de frações de membrana (ver adiante).

A Figura 8 mostra o fluxograma de intervenções acima descritas, incluindo a formação dos grupos ao longo do tempo.

3.3. Dietas.

A dieta CTR era uma dieta comercial para roedores adquirida, como acima mencionado, da Neovia Nutrição e Saúde Animal, e sua composição se encontra na Tabela 1. A DBR era artesanalmente preparada, com controle bromatológico, no Laboratório de Análise e Processamento de Alimentos do Instituto de Nutrição Josué de Castro da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Os feijões, a farinha de mandioca, a carne de charque e as batatas doces eram cozidos, desidratados a 60°C por 48 h, pulverizados e misturados com água antes de serem suplementados com gordura de carne de boi (7 g em 2 kg de ração). A pasta úmida era cortada na forma de pequenos cubos no formato da dieta CTR, desidratados a 60°C durante 24 h e guardados na geladeira.

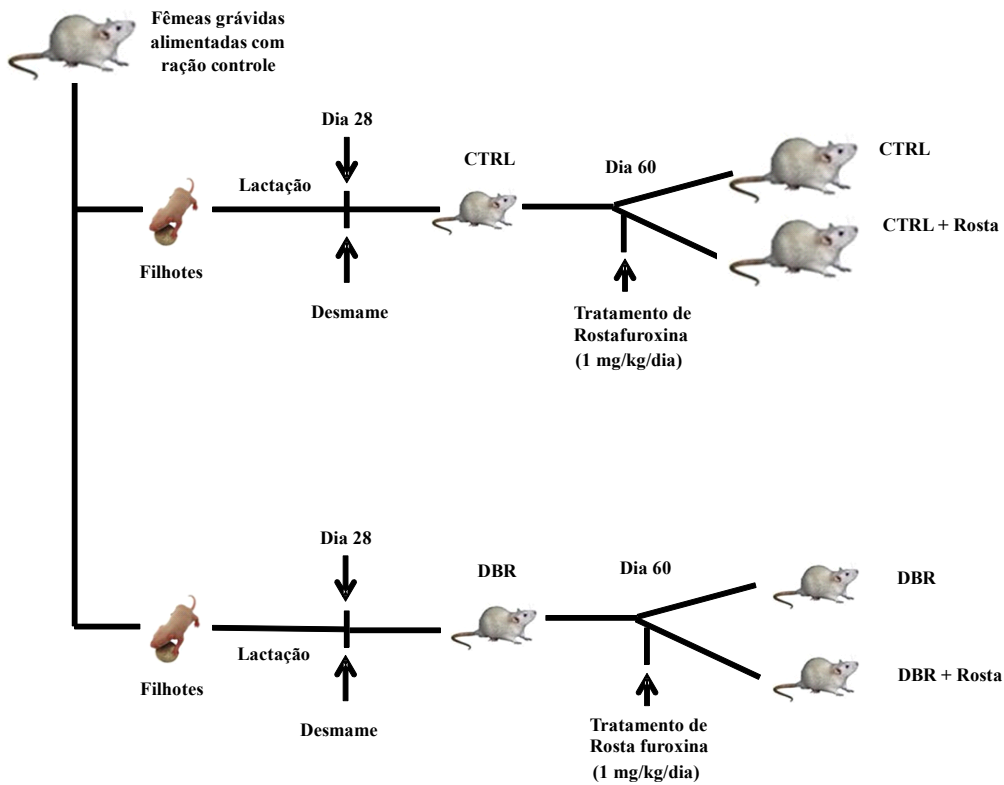


Figura 8. Linha do tempo da obtenção e do tratamento dos grupos experimentais. Para detalhes, ver texto. O tamanho amostral da prole foi estabelecido com base em experimentos piloto e visando empregar o menor número de animais. Foram realizadas seis criações durante o desenvolvimento da Tese. Como controle de reprodutibilidade foram utilizadas a massa corporal e o comprimento focinho–cauda. No dia 88 pela manhã os ratos foram hospedados em gaiolas metabólicas para a aclimação por 24 h até o dia 89, quando começou um novo período de 24 h para registro de ingesta e ração e para a coleta de urina.

3.4. Medida da massa corporal.

A massa corporal era aferida semanalmente numa balança de prato. A medida não podia ser feita de forma cega devido à grande diferença de massa corporal entre os animais normonutridos e os desnutridos.

3.5. Determinações do conteúdo da Na^+ nas dietas, da ingesta de Na^+ , das concentrações plasmática e urinária de Na^+ e da excreção urinária de Na^+ em 24 h.

O conteúdo de Na^+ das dietas era determinado por fotometria de chama (Analyser, São Paulo, Brasil) após extração com HNO_3 1 N (5 ml:0,5 g de ração pulverizada). A suspensão era agitada durante 48 h a temperatura ambiente, deixada sedimentar espontaneamente durante 24 h para finalmente proceder à determinação da concentração de Na^+ do sobrenadante. A ingesta de Na^+ era determinada entre os dias 89 e 90 com os ratos nas gaiolas metabólicas, a partir da medida do consumo de ração e do conteúdo de Na^+ desta.

A concentração plasmática de Na^+ ($[\text{Na}^+]_{\text{pls}}$) era medida – também por fotometria de chama – no plasma recuperado por centrifugação em centrífuga clínica, a 3.000 rpm durante 10 min, do sangue obtido durante a eutanásia no dia 90 (~10 ml de ratos CTR e ~4 ml de ratos DBR, suplementados com 0.1 ml de EDTA 100 mM). O plasma recuperado era diluído 100, 200 e 500 vezes com água deionizada antes da medida no fotômetro de chama. Para a determinação de concentração de Na^+ nas amostras de urina ($[\text{Na}^+]_{\text{ur}}$), estas eram centrifugadas e diluídas na mesma forma. As concentrações eram calculadas por regressão linear. A excreção urinária de Na^+ em 24 h (no dia 90 dias, último na gaiola metabólica) era calculada a partir do volume urinário no mesmo período e da $[\text{Na}^+]_{\text{ur}}$.

3.6. Determinação da concentração de albumina plasmática.

A concentração de albumina plasmática foi medida utilizando um *kit* comercial

(Quibasa-Bioclin, Belo Horizonte, Brasil), seguindo as instruções do fabricante.

3.7. Medida da pressão arterial sistólica.

A pressão arterial foi medida por pletismografia de cauda imediatamente antes da eutanásia dos animais utilizando o equipamento V2.01 (Insight Equipamentos Científicos, Ribeirão Preto, Brasil). Os sinais digitais foram registrados e processados por um software apropriado (Medidor de Pressão 1.0, Insight Equipamentos Científicos). No dia das aferições (dia 90 depois de aclimatação na gaiola nas 24 h anteriores), os ratos foram aclimatados em uma câmara térmica (30–32°C) por 10 a 15 min, e os registros só foram realizados com os animais sem movimentação. Cinco determinações foram feitas para cada animal e foi utilizada a média dos cinco valores (Feng *et al.*, 2008; Pereira-Acácio *et al.*, 2022).

3.8. Obtenção das frações enriquecidas de membrana plasmática de túbulos proximais renais.

Frações enriquecidas de membrana plasmática de células de túbulos proximais renais foram utilizadas para medir a atividade das ATPases transportadoras de Na⁺. As frações foram isoladas como descrito previamente (Vieyra *et al.*, 1986; Vieira-Filho *et al.*, 2011; Dias *et al.*, 2014) a partir do *cortex corticis*, porção mais externa da região cortical renal na qual mais de 90% da população celular corresponde a túbulos proximais (Whittembury & Proverbio, 1970; Proverbio & Del Castilho, 1981). Os rins, removidos imediatamente após a eutanásia, foram mantidos numa solução gelada contendo sacarose 250 mM, HEPES-Tris 10 mM (pH 7,4), EDTA 2 mM, 0,15 mg/ml de inibidor de tripsina e PMSF 1 mM. O córtex renal era dissecado cuidadosamente para evitar com regiões mais interna do parênquima e frações transversas finas (0,5 mm) eram cortadas usando um micrótomo Stadie-Riggs. Os cortes eram homogeneizados em 4 ml da

solução acima por grama de tecido, utilizando um homogeneizador de vidro com pistilo de vidro imerso em um balde de gelo. O homogenato resultante era centrifugado a $755\times g$ durante 15 min para remover células não rompidas, detritos celulares e núcleos. Uma centrifugação a $8.500\times g$ durante 20 min permitia a remoção das mitocôndrias. O sobrenadante desta segunda centrifugação era submetido a uma nova e final centrifugação a $35.000\times g$ durante 45 min para obter um sedimento enriquecido em membrana plasmática, imediatamente ressuspenso em um volume de ~4 ml de sacarose 250 mM e estocado em ultracongelador a -80°C . Esta diluição levava a concentrações de proteína total (determinada pelo método de Lowry *et al.* (1951)) variando entre 15–20 mg/ml em ratos CTR e entre 5–10 mg/ml em ratos DBR. Controles previamente realizados, como descritos em Vieyra *et al.* (1986) e Coka-Guevara *et al.* (1999) mostraram que a contaminação com membranas intracelulares (mitocôndria, lisossoma, retículo) é mínima (<5%). A fração final enriquecida de membrana plasmática contém fragmentos de membrana apical; porém, como a localização das ATPases transportadoras de Na^{+} é na membrana basolateral, não foram feitos procedimentos de separação por gradiente de Percoll como em Axelband *et al.* (2009).

3.9. Atividades das ATPases transportadoras de Na^{+} .

As atividades das ATPases transportadoras de Na^{+} , a sensível à ouabaína ($(\text{Na}^{+}+\text{K}^{+})\text{ATPase}$) e a resistente à ouabaína e sensível à furosemida ($\text{Na}^{+}\text{-ATPase}$) foram determinadas pela quantificação de fosfato inorgânico (P_i) liberado na hidrólise do ATP (Taussky & Shorr, 1953). A atividade era calculada da seguinte forma: (i) $(\text{Na}^{+}+\text{K}^{+})\text{ATPase}$ a partir da diferença entre os valores de atividade obtidos na ausência e na presença de ouabaína 2 mM (neste caso, as membranas eram pré-incubadas na ausência ou na presença do inibidor durante 10 min, na presença de Na^{+} a temperatura ambiente); (ii) a atividade da $\text{Na}^{+}\text{-ATPase}$ era calculada pela diferença entre a atividade

total medida na presença de ouabaína e aquela obtida na presença de furosemida 2 mM (Pereira-Acácio *et al.*, 2022). Os meios de reação tinham a seguinte composição. (1) Para $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$: Bis-TRIS-propano 50 mM (pH 7,4), EDTA 0,2 mM, MgCl_2 5 mM, NaCl 120 mM, ATP 5 mM, KCl 24 mM e 0,05 mg/ml de proteína (fração de membranas). A reação era iniciada pela adição de ATP e KCl em concentrações suficientes para as concentrações finais mencionadas. (2) Para $\text{Na}^+\text{-ATPase}$: HEPES-TRIS 20 mM (7,0), MgCl_2 10 mM, NaCl 120 mM, ATP 5 mM e 0,1 mg/ml de proteína, na ausência ou na presença de furosemida 2 mM. Neste caso, as membranas eram pré-incubadas por 10 min a 37°C com 2 mM de ouabaína para garantir a inativação completa da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e a reação era iniciada pela adição de ATP. Outras adições aos meios de reação são detalhadas nas correspondentes legendas das figuras. Em ambos os casos a reação (0,5 ml de volume final) era parada após 10 min adicionando um volume igual de uma suspensão de carvão ativado em HCl 0,1 N livre de P_i (por sucessivas lavagens com o ácido). A mistura era centrifugada a 3.000 rpm durante 10 min numa centrífuga Beckman (rotor JA-20) e o sobrenadante era utilizado para a dosagem do P_i .

3.6. Análise estatística.

O tamanho amostral foi estabelecido em estudos piloto utilizando ratos normonutridos e desnutridos que mostraram coeficientes de variação intraensaio e interensaio menores que 5–6% para as diferentes determinações planejadas. O cegamento das medidas de massa corporal e de pressão arterial sistólica não foi possível devido à visível diferença de tamanho corporal entre os ratos CTR e DBR. As determinações bioquímicas puderam ser cegadas porque um dos integrantes da equipe preparava as amostras e outro levava a cabo os experimentos. As randomizações dos ratos nas diferentes criações foram realizadas utilizando sequências de números ao acaso. As randomizações dos ratos para o tratamento com Rostafuroxina ou não

ocorreram nos grupos CTR e DBR separadamente. A distribuição normal dos resultados foi conferida utilizando o teste de Shapiro-Wilks. Os valores numéricos de cada variável eram calculados e as comparações estatísticas correspondentes eram realizadas usando o software GraphPad Prism 8.01 (GraphPad Software, Inc., San Diego, USA). Todos os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão (DP). As análises foram realizadas usando ANOVA-2 fatores seguidas do teste de Bonferroni para pares selecionados (distribuição normal) ou Kruskal-Wallis seguido do teste de Dunn (distribuição não normal). As diferenças entre as médias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

4. Resultados e Discussão

4.1. Massa corporal, ingesta de alimento, de energia, de Na⁺ e de água: Efeitos da administração de Rostafuroxina.

A Figura 9 mostra a acentuada diminuição (~60%), aos 90 dias de vida, da massa corporal dos ratos que receberam a dieta multicarenciada DBR a partir do desmame, quando comparada com a massa corporal dos ratos CTR normonutridos. Observa-se que a administração de Rostafuroxina nos 30 dias anteriores não exerceu tampouco qualquer efeito na massa corporal de ambos os grupos. Esta acentuada diminuição de massa corporal nos ratos DBR é certamente devida à diminuição do conteúdo proteico da dieta (de 23% para 8%) e também de lipídeos (de 2,5% para 1,7%) (Tabela 1). À diminuição da quantidade de proteínas deve ser acrescentada também – por sua importância no crescimento – a pobre qualidade das proteínas, uma vez que a fonte das mesmas são os feijões e a carne de charque. Proteínas animais, com sua mais alta qualidade, são usualmente consideradas superiores às de origem vegetal (van Vliet *et al.*, 2015), embora outras evidências apontem para o oposto em termos de risco de

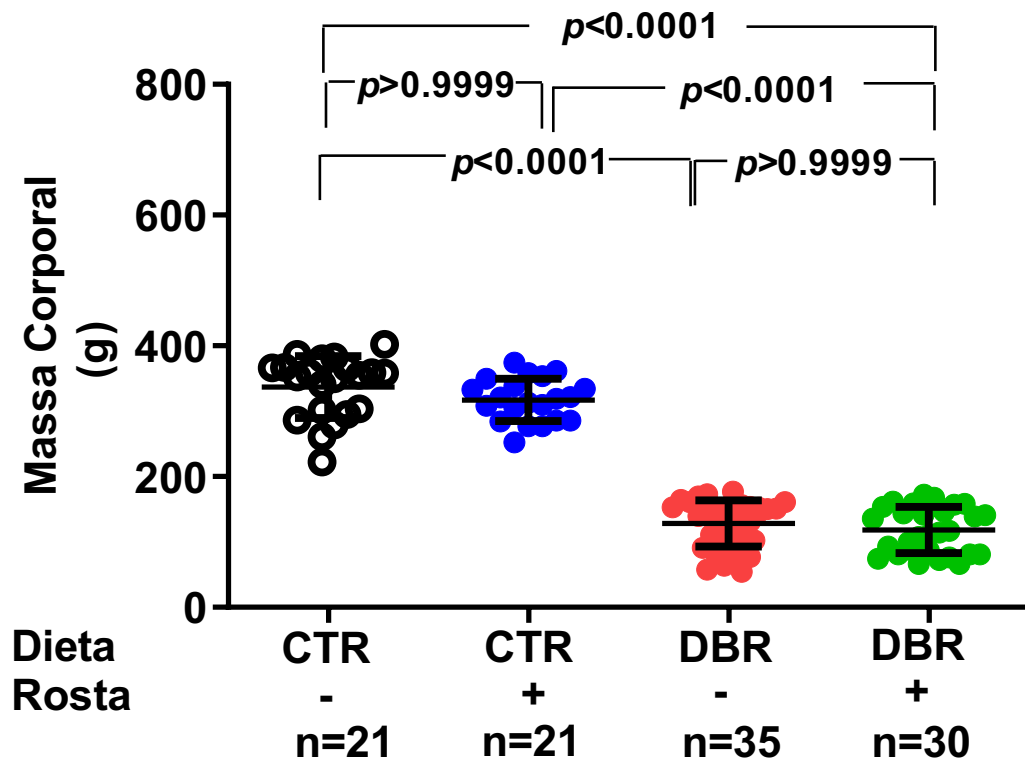


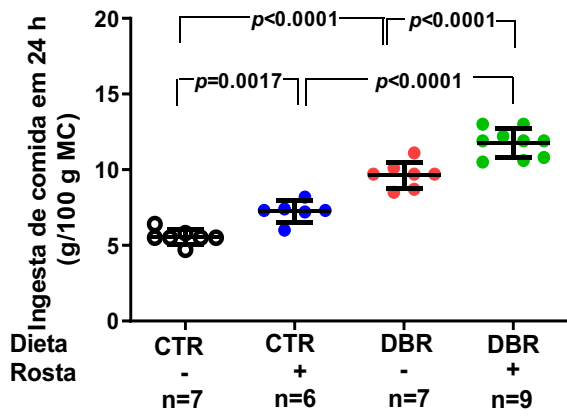
Figura 9. Massa corporal dos animais no 90º dia de vida. A figura indica a massa corporal dos animais CTR e DBR. Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados na *abscissa*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na *abscissa* abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de p estão indicados dentro da figura. As diferenças foram avaliadas usando o teste de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunn para pares selecionados.

doenças cardiovasculares (Zhubi-Bakija *et al.*, 2021).

Esta diminuição de massa corporal começou a ocorrer de maneira significativa a partir da primeira semana da administração das dietas diferenciadas (Pereira-Acácio *et al.*, 2022), com consequências estruturais e funcionais em órgãos e tecidos com alta demanda metabólica, como rins, coração e sistema nervoso central, que se encontram ainda em desenvolvimento. A diminuição do crescimento em humanos tem sido apontada como um fator associado ao desenvolvimento de doenças cardiovasculares e renais (Martins *et al.*, 2017).

Quando se avalia o consumo de alimento na mesma idade de ratos hospedados nas gaiolas metabólicas (Figura 10A), é possível observar um aumento de aproximadamente 70% nos ratos DBR em relação ao grupo CTR (valores corrigidos para 100 g de massa corporal). De forma interessante, a administração de Rostafuroxina provocou um aumento significativo da ingesta de alimento em ambos os grupos (compare 1ª com 2ª barra, e 3ª com 4ª barra). A combinação de mais elevado consumo de alimento com o mais elevado conteúdo de energia da dieta deficiente (Tabela 1) resultou em aproximadamente 110% maior ingesta energética nos ratos DBR em relação aos ratos CTR (Figura 10B) e, como esperado a partir dos resultados de consumo de alimento, os ratos tratados com Rostafuroxina incorporaram muito mais energia, tanto no grupo CTR quanto no grupo DBR. Estes resultados sugerem que, nestes animais desnutridos, mecanismos compensatórios que possivelmente envolvem circuitos neuronais no sistema nervoso central (Schwartz *et al.*, 2000; Morton *et al.*, 2006; Farr *et al.*, 2016) culminaram com ingesta aumentada de alimento e energia. Esta rede neuronal poderia ser ativada pela Rostafuroxina, e o efeito estimulatório poderia envolver passos nos quais a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ participa (Kurita *et al.*, 2015; Otero-Rodiño *et al.*, 2019), sendo modulada por “ouabaína endógena” em associação com flutuações dos níveis do Na^+ tissular (Schoner & Scheiner-Bobis, 2007; Pavlovic, 2020). Antagonizando a

(A)



(B)

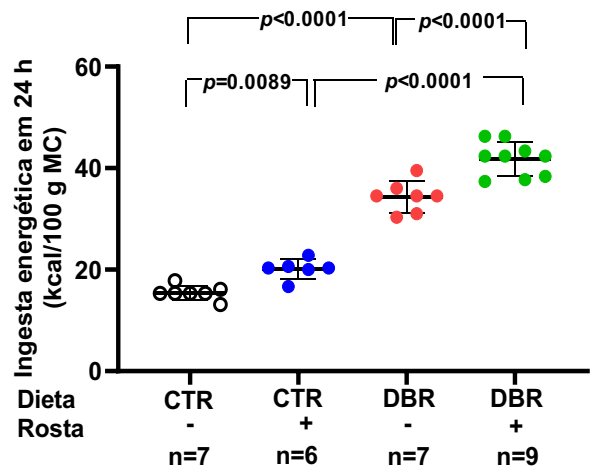


Figura 10. Ingesta de ração e energia em 24 h. A figura (A) ingestão de ração e a figura (B) ingestão de energia foram medidas entre o dia 89 e 90 de vida. Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados nas *abscissae*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na abscissa abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de p estão indicados dentro dos painéis. As diferenças foram avaliadas usando ANOVA-1 fator seguida do teste de Bonferroni para pares selecionados.

ouabaína endógena, a Rostafuroxina ativaria estes circuitos, levando ao aumento encontrado na ingesta de alimento e energia.

O estado de desnutrição dos ratos DBR se revela também na diminuída concentração plasmática de albumina ($[albumina]_{pls}$) no grupo RBD em comparação com os ratos CTR (Figura 11), que revela uma influência no metabolismo hepático nesse grupo de ratos. A falta de suplementação com vitaminas na DBR (Tabela 1), incluindo a vitamina B6 (fosfato de piridoxal), cofator chave nas reações de transaminação (Cheney *et al.*, 1967), bem como a diminuição da ingesta de aminoácidos essenciais pela ingesta de proteínas de baixa qualidade, contribuiriam para esta hipoalbuminemia, assim como para a redução do crescimento corporal como um todo (Munro, 1970) (Figura 9). A administração de Rostafuroxina diminuiu a $[albumina]_{pls}$ nos ratos desnutridos, sem influência significativa nos ratos normonutridos. Até onde chega nosso conhecimento, este é um efeito metabólico não descrito da Rostafuroxina, diminuição da $[albumina]_{pls}$ nos ratos DBR sem influência no grupo CTR.

Poderia ser postulado que o efeito do fármaco no metabolismo proteico hepático depende da suprarregulação do sensoreamento do metabolismo energético no fígado mediado pela AMP kinase, uma vez que esta kinase desempenha um papel regulatório central (Viollet *et al.*, 2006; Foretz & Viollet, 2018). Em condições controle, níveis intracelulares baixos de AMP (e altos de ATP) resultando numa baixa atividade da AMP kinase, acompanhados de baixas concentrações de esteroides cardiotônicos, bloqueariam os efeitos da Rostafuroxina. Apoia esta hipótese a observação de que, apenas as altas concentrações de esteroides cardiotônicos, mas não as baixas, provocam inibição da síntese proteica em mioblastos (Pauw *et al.*, 2000).

Apesar do menor conteúdo de Na^+ na DBR, a ingesta de Na^+ apresentou uma tendência de ser maior nos ratos desnutridos (corrigida pela massa corporal) quando comparada com a dos ratos CTR ($p = 0,0632$) (Figura 12), e a administração de

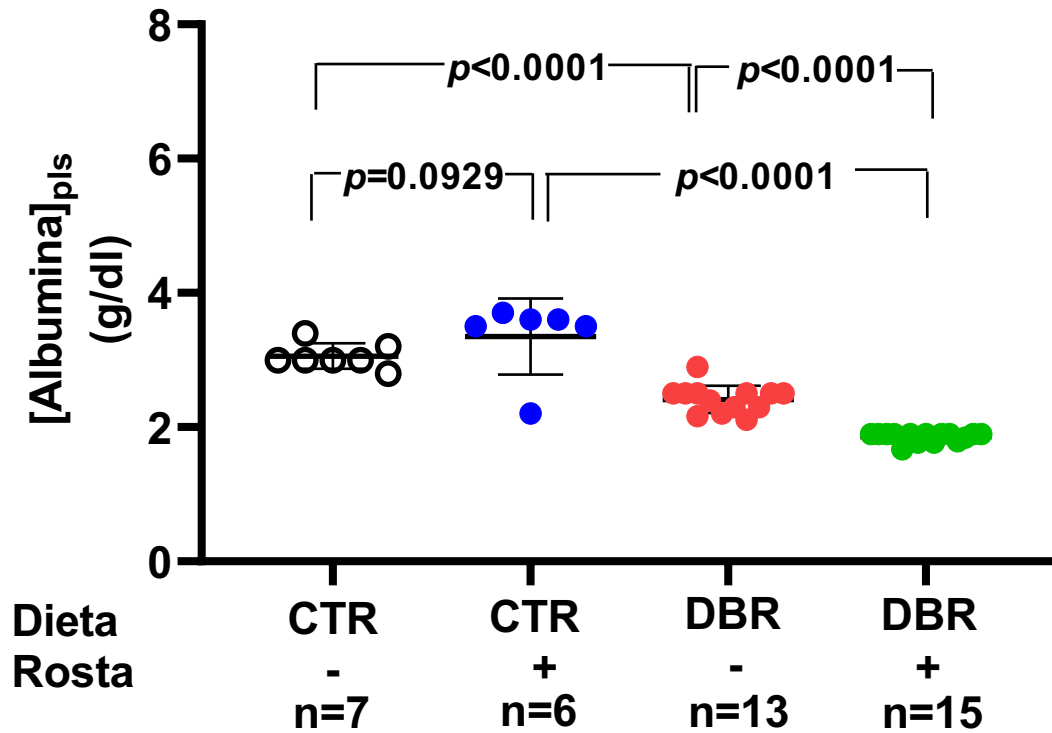


Figura 11. Dosagem da concentração de albumina plasmática ($[albumina]_{pls}$). A concentração plasmática de albumina foi medida nos plasmas coletados no dia 90 de idade. Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados na *abscissa*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na abscissa abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de p estão indicados dentro da figura. As diferenças foram avaliadas usando ANOVA-2 fatores seguida pelo teste de Bonferroni para pares selecionados.

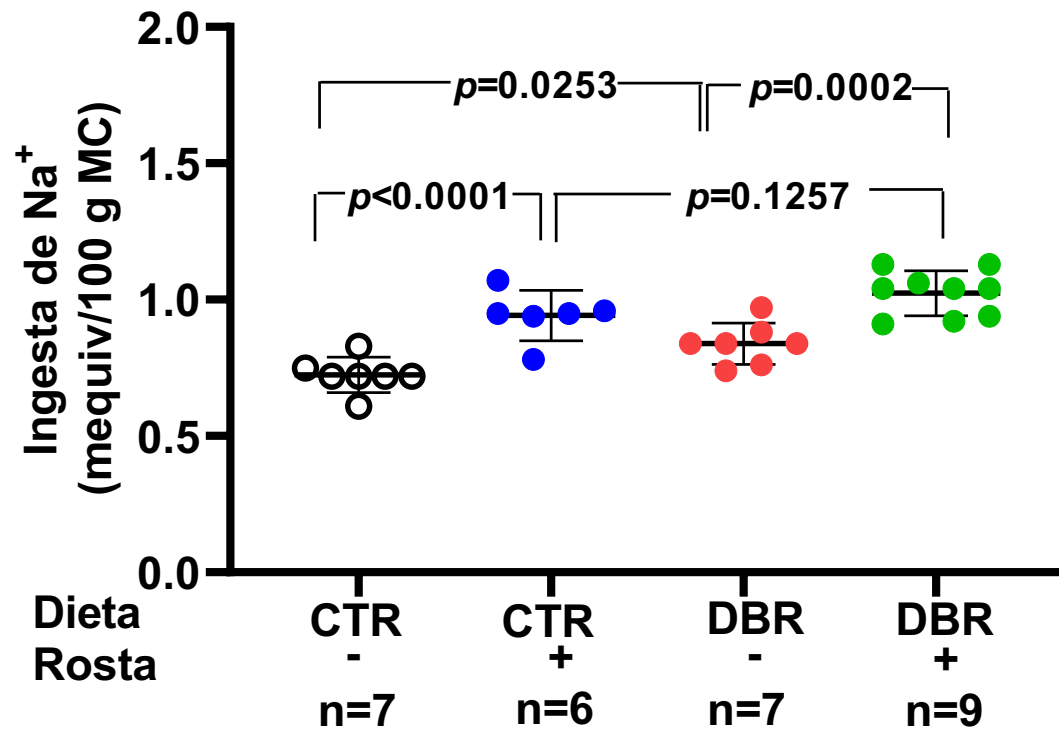


Figura 12. Ingesta de Na^+ em 24 h. A ingestã de Na^+ em 24 h foi calculada do conteúdo de Na^+ na dieta e a ingestã de ração ($n = 6-9$). Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estã indicados na *abscissa*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na abscissa abaixo da coluna de pontos correspondentes. As diferenças foram avaliadas usando ANOVA-2 fatores seguida pelo teste de Bonferroni para pares selecionados.

Rostafuroxina resultou num aumento significativo da ingesta de sal nos dois grupos (30% no CTR e 20% no DBR). Há mais de duas décadas e, mais recentemente, foram publicados resultados um tanto diferentes acerca de potenciais efeitos da “ouabaína endógena” na massa corporal, na ingesta de alimentos e na ingesta de Na^+ em ratos e seres humanos (Tordoff, 1996; Lewis *et al.*, 2014; Simonini *et al.*, 2018). A infusão crônica de ouabaína em ratos levou ao aumento da massa corporal, mas não teve efeito na ingesta de alimento e de Na^+ , uma dissociação entre aumento de massa corporal e ingesta alimentar que poderia ser explicado por uma eficiência anabólica maior. Todavia, estas observações – e seu contraste com os resultados mostrados na Figura 12 e especialmente os efeitos da Rostafuroxina – poderiam ser explicados se a ouabaína de origem externa e a “ouabaína endógena” não fossem os mesmos compostos ou, em outras palavras, se os digitálicos endógenos não representassem a autêntica ouabaína (Lewis *et al.*, 2014; Simonini *et al.*, 2018). Adicionalmente, a Rostafuroxina poderia ativar outras estruturas para além do sistema nervoso central, e.g. o eixo hipotálamo-hipófise-suprarrenal, estimulando a secreção de glicocorticoides que estimulam o apetite e a ingesta de alimento (Torres & Nowson, 2007; Chao *et al.*, 2017).

A ingesta de líquido (água) nos ratos alojados na gaiola metabólica também foi registrada entre os dias 89 e 90 (Figura 13). Os ratos CTR ingeriram ~11 ml de água em 24 h e os ratos do grupo DBR ~14 ml de água em 24 h (valores corrigidos para 100 g de massa corporal), uma diferença estatisticamente significativa, sem efeito adicional da Rostafuroxina em nenhum dos grupos. O aumento na ingesta de água nos ratos DBR pode ser discutido em termos do aumento da ingesta alimentar – e, portanto, de solutos – pelos ratos desnutridos (Figura 10A), o que implica em maior ingesta de solutos. E a falta de efeitos da Rostafuroxina na ingesta de água – em contraste com o observado na ingesta de Na^+ - poderia ser explicado pela existência de diferentes mecanismos reguladores ao nível do sistema nervoso central. Embora haja conjuntos neuronais

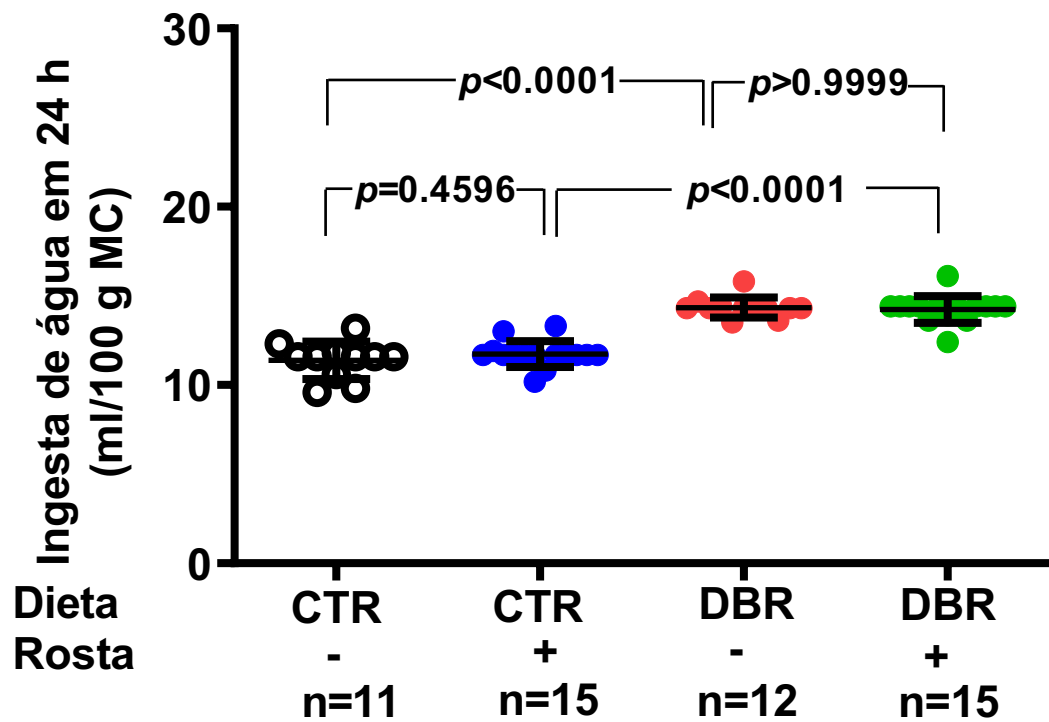


Figura 13. Ingesta de água em 24 h. A ingestão de água foi medida entre os dias 89 e 90 de vida. Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados na *abscissa*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na *abscissa* abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de p estão indicados dentro da figura. As diferenças foram avaliadas usando ANOVA-2 fatores seguida pelo teste de Bonferroni para pares selecionados.

comuns envolvidos na regulação da saciedade e da sede (Tan et al., 2022), a existência de diferentes circuitos participantes de uma regulação diferenciada também foi descrita. uma década atrás (Yosten, 2014), bem como o papel de diferentes hormônios circulantes que atuariam em sensores diferentes. Enquanto a angiotensina II (Ang II) elemento central do sistema renina-angiotensina-aldosterona (para uma atualizada revisão ver Forrester, 2018) desempenha um papel preponderante na regulação da sede, cabe à leptina fazê-lo em relação ao apetite e, portanto, em relação à ingesta de alimento ingerido (McKinley *et al.*, 2019) quando disponível *ad libitum*. Como já mencionado pouco acima, a existência de circuitos e núcleos específicos para estes dois hormônios – e possivelmente para outros – confeririam seletividade ao efeito da Rostafuroxina – ou à falta dele – na ingesta de alimento e água apresentados nas Figuras 12 e 13.

4.2. Excreção urinária de Na^+ , volume urinário, balanço de Na^+ , balanço de água, e concentração plasmática de Na^+ em ratos CTR e DBR: Efeitos da administração de Rostafuroxina.

A excreção urinária de Na^+ em 24 h (Figura 14C) dos ratos com idade de 90 dias foi calculada a partir do volume urinário no mesmo período e a concentração urinária de Na^+ ($[\text{Na}^+]_{\text{ur}}$). É importante registrar que o desenho da gaiola metabólica impede a contaminação da amostra de urina com alimento ou fezes. O volume urinário (Figura 14A) foi ligeiramente, mas significativamente alto em ratos do grupo DBR, e a Rostafuroxina provocou uma diurese extra nos animais desnutridos sem influência no grupo CTR, uma evidência de ação seletiva no interstício medular renal – onde ocorre a concentração da urina – modificada pelo estado nutricional. A análise da $[\text{Na}^+]_{\text{ur}}$ (Figura 14B) revela um valor 40–45% menor nos ratos DBR quando comparados com os CTR e, também, efeitos opostos da Rostafuroxina dependendo do estado nutricional: enquanto o fármaco promoveu um aumento de 25% na $[\text{Na}^+]_{\text{ur}}$ em ratos normonutridos, ele provocou uma acentuada diminuição adicional de mais de 50% nos ratos DBR

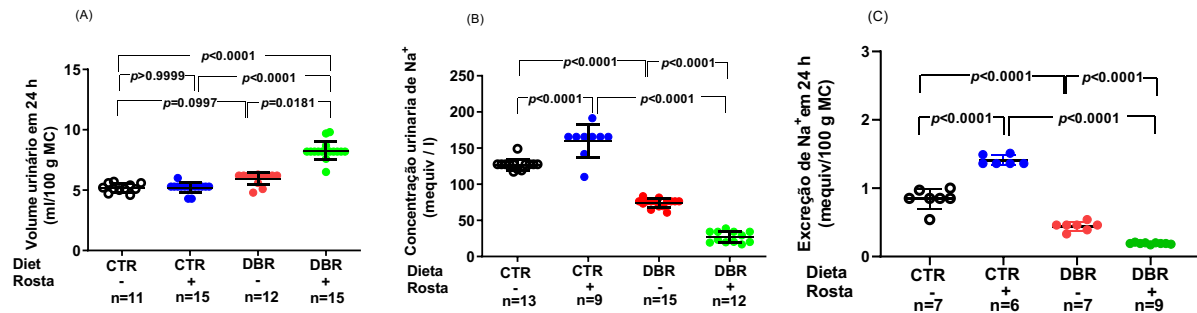


Figura 14. Medidas de volume urinário em 24 h, concentração urinária de Na⁺ e excreção urinária de Na⁺ em 24 h. (A) volume urinário entre os dias 89 e 90 de vida. (B) concentração urinária de Na⁺. (C) excreção urinária de Na⁺ entre os dias 89 e 90 de vida ($n = 11-15$). Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados nas *abscissae*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na abscissa abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de p estão indicados dentro dos painéis. As diferenças foram avaliadas usando o teste de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunn para pares selecionados.

(compare barras 3^a e 4^a na Figura 14B). O conjunto de resultados das Figuras 14A e 14B se projeta naquilo que, de forma oposta, é mostrado na Figura 14C sobre a excreção urinária de Na⁺ em 24 h: (i) aumento de ~100% provocado pela Rostafuroxina em relação ao grupo CTR não tratado; (ii) diminuição de 50% no grupo DBR também em relação ao grupo CTR não tratado; (iii) diminuição de 55% no grupo DBR + Rosta em relação aos ratos desnutridos não tratados; (iv) diminuição de 80% no grupo DBR + Rosta em comparação ao CTR. A mais notável diferença se observa ao comparar os dois grupos tratados com Rostafuroxina: um valor quase 90% menor no grupo DBR.

Os resultados da Figura 14C merecem discussão com os apresentados na Figura 12. Enquanto nos ratos normonutridos uma análise do efeito da administração de Rostafuroxina mostra um paralelismo entre estímulo da ingesta de sal e o estímulo de sua excreção, observa-se, nos ratos DBR não tratados, uma diminuição da excreção que se acentua nos ratos submetidos ao tratamento com Rostafuroxina. Este comportamento diferente pode ser mais bem apreciado e discutido ao analisar o balanço de Na⁺ nesse período (Figura 15).

O balanço de Na⁺, no mesmo intervalo de 24 h entre o dia 89 e o dia 90 de idade dos ratos hospedados nas gaiolas metabólicas, foi calculado pela diferença entre a ingesta de Na⁺ (Figura 12) e a excreção urinária de Na⁺ (Figura 14C), ambas corrigidas para 100 g de massa corporal. Quando hospedados nas gaiolas, os ratos CTR apresentaram um pequeno balanço negativo de Na⁺ de aproximadamente -0,10 mequiv/100 g de massa corporal em 24 h, uma aproximação de zero, como ocorre habitualmente com uma parte da população de ratos alojados em gaiolas metabólicas por um curto período de tempo (Brensilver *et al.*, 1985).

Este balanço de Na⁺ se tornou mais negativo (-0,50 mequiv /100 g de massa corporal em 24 h, quando estes animais receberam Rostafuroxina, um resultado esperado em função dos efeitos do fármaco inicialmente descritos (Schoner & Scheiner

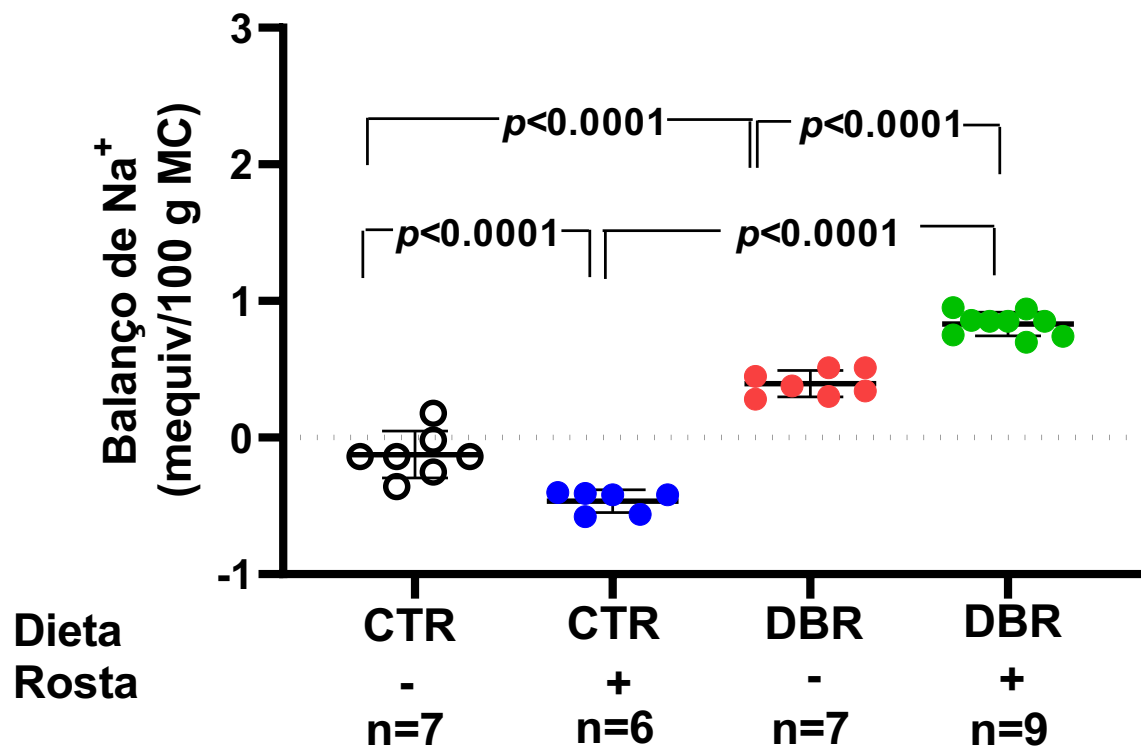


Figura 15. Balanço de Na^+ . O balanço de Na^+ foi calculado como a diferença entre a ingestão de Na^+ e a excreção urinária de Na^+ em 24 h entre os dias 89 e 90 de vida. Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados na *abscissa*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na abscissa abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de p estão indicados dentro da figura. As diferenças foram avaliadas usando ANOVA-2 fatores seguida pelo teste de Bonferroni para pares selecionados.

Bovis, 2007; Nesher *et al.*, 2009). Esta ação foi atribuída a uma influência neutralizadora do efeito estimulante da “ouabaína endógena” circulante em concentrações subnanomolares sobre a $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$, especialmente sobre aquela localizada na medula externa (Ferrandi *et al.*, 2002), devido ao papel da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ residente na membrana basolateral da alça de Henle, e de transportadores funcionalmente acoplados a ela, no controle final da excreção urinária de sal em condições fisiológicas e patológicas (Rocha & Kokko, 1973).

Como descrito acima, este quadro foi confirmado no caso dos ratos CTR, que apresentaram uma $[\text{Na}^+]_{\text{ur}}$ aumentada e uma também aumentada excreção urinária de Na^+ quando submetidos a uma administração crônica de Rostafuroxina (Figuras 14B e 14C). Todavia, um notável e contrastante efeito – revelador da influência do estado nutricional às respostas a este fármaco – foi encontrado nos ratos DBR: suas diminuídas $[\text{Na}^+]_{\text{ur}}$ e excreção urinária de Na^+ em 24 h se tornaram ainda menores quando receberam Rostafuroxina (também Figuras 14B e 14C).

Estes resultados paradoxais poderiam ser explicados se, como postulado acima, os ratos desnutridos apresentassem uma produção aumentada de “ouabaína endógena”, incluindo regiões do sistema nervoso central, que poderiam levar a uma atividade também aumentada do nervo renal provocando uma resposta antinatriurética (Lim *et al.*, 2000). Nestas condições, a ativação anormal do nervo renal poderia constituir a base subjacente de uma oposta e intensa influência antinatriurética da Rostafuroxina, cujas ações dependem da dose e são também dependentes dos níveis de ouabaína quando o composto é infundido (Ferrandi *et al.*, 2004).

O balanço de água (Figura 16) foi calculado como a diferença entre a ingesta de água e o volume urinário, sempre no mesmo período de 24 h entre os dias 89 e 90. Exceto para o caso dos ratos DBR (8 ml em 24 h), todos os outros grupos tiveram um balanço positivo de 6 ml em 24 h, i.e. similar, ao encontrado em ratos CTR. Estes valores

indicam que, após a administração de Rostafuroxina, foi induzido um acentuado efeito diurético nos ratos DBR, conclusão apoiada no aumento do volume urinário mostrado na Figura 14A (4ª barra).

Os resultados das Figuras 14A e 16 são particularmente interessantes e merecem especial discussão porque os efeitos anti-hipertensivos da Rostafuroxina foram inicialmente descritos como não associados a efeitos diuréticos, apesar da acentuada ação natriurética já discutida acima (Ferrandi *et al.*, 2002; Nesher *et al.*, 2009), não apresentando efeitos colaterais dos diuréticos em humanos, como demonstrado em ensaios clínicos (Citterio *et al.*, 2021). Todavia, no caso dos ratos desnutridos, mas não no caso dos ratos normonutridos, encontramos um claro efeito diurético, também provavelmente devido a uma ação medular do fármaco neste grupo de ratos. Esta observação nos permite concluir novamente que o estado nutricional dos animais influencia um importante efeito da “ouabaína endógena” e do seu antagonista.

Uma vez que os pioneiros estudos já discutidos acima mais de uma vez (Ferrandi *et al.*, 2002; Nesher *et al.*, 2009) foram realizados com ratos normonutridos, a falta de ação diurética poderia ocorrer somente em animais adequadamente nutridos. Por esta razão é que, nesta Tese, investigamos se a Rostafuroxina modificaria o balanço de água corporal como resultado de modificações na ingesta e no volume urinário e se – como no caso da ingesta de alimento/energia – haveria uma influência do estado nutricional. Assim, os resultados apresentados nas Figuras 14A e 16, completam e reforçam as ideias discutidas anteriormente, na oportunidade da descrição dos resultados de ingesta de água (Figura 13), de que a falta de indução de polidipsia por parte do fármaco em ambos os grupos de animais sugere que os circuitos hipotalâmicos no encéfalo anterior que controlam a sede (Leib *et al.*, 2016) não teriam $(Na^+ + K^+)ATPase$ como uma maquinaria sinalizadora central, apesar da injeção intravenosa de ouabaína diminuir a ingesta de água em ratos (Bergmann *et al.*, 1967). E que, em consequência,

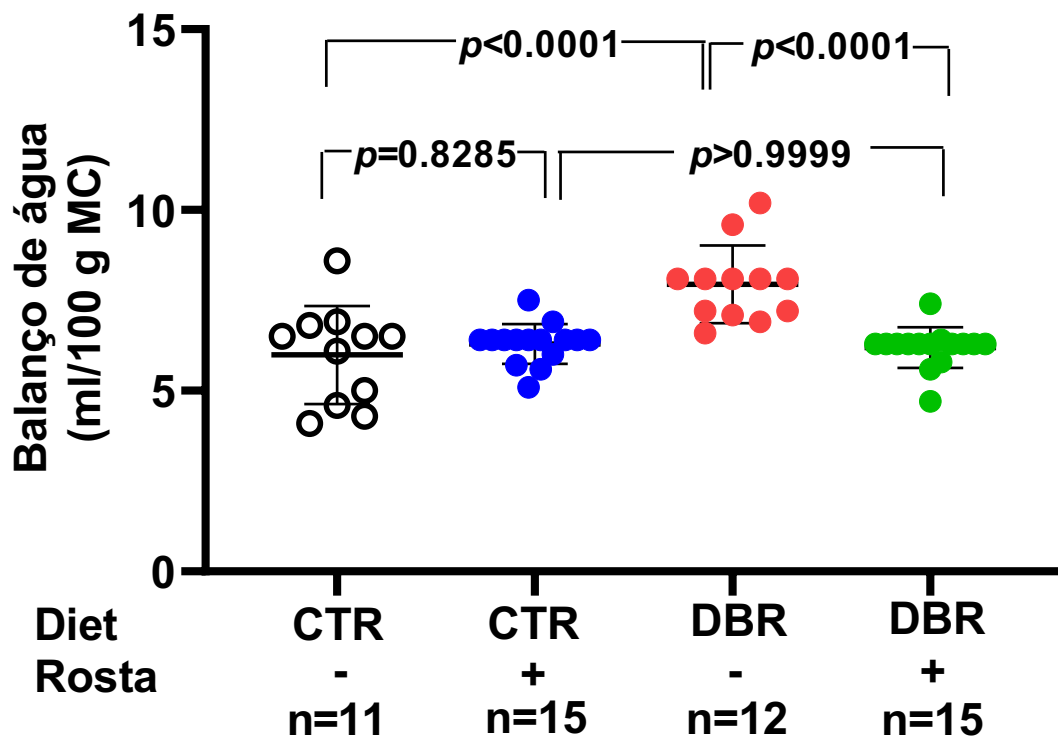


Figura 16. Balanço de água. O balanço de água foi calculado como a diferença entre a ingesta de água e o volume urinário em 24 h entre os dias 89 e 90 de vida. Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados na *abscissa*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na abscissa abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de p estão indicados dentro da figura. As diferenças foram avaliadas usando ANOVA-2 fatores seguida pelo teste de Bonferroni para pares selecionados.

modificações do balanço de água pela Rostafuroxina resultariam de efeitos periféricos a nível renal com modulação central exercida pelo nervo renal (Lim *et al.*, 2000), normalizando assim o balanço de água. Mudanças no balanço corporal de Na^+ e água repercutem na concentração plasmática de Na^+ ($[\text{Na}^+]_{\text{pls}}$) e na distribuição deste íon nos diferentes compartimentos (Adachi *et al.*, 2005). Com esta ideia, foram formuladas as seguintes perguntas: (i) como se encontra, comparativamente, a $[\text{Na}^+]_{\text{pls}}$ de ratos CTR normonutridos e DBR desnutridos? (ii) há efeitos diferentes da Rostafuroxina na $[\text{Na}^+]_{\text{pls}}$ destes dois grupos? A Figura 17 apresenta os valores de $[\text{Na}^+]_{\text{pls}}$ nos quatro grupos, permitindo resumir as informações contidas da seguinte forma: (i) há uma diminuição de ~20 mequiv/l no grupo DBR em relação ao grupo CTR; (ii) a administração de Rostafuroxina provoca uma pequena, porém significativa, elevação da $[\text{Na}^+]_{\text{pls}}$ da ordem dos 5 mequiv/l nos ratos CTR; (iii) no caso dos ratos DBR, a administração do fármaco restaura os valores encontrados nos ratos CTR.

Discutindo inicialmente as diferenças entre os grupos CTR e DBR, dois processos – não excludentes – poderiam levar à diminuição encontrada nos ratos desnutridos, apesar do balanço positivo de Na^+ mostrado na Figura 15. O balanço positivo de água mostrado na Figura 16, associado à expansão do volume plasmático que os ratos DBR apresentam (Silva *et al.*, 2014a), poderiam indicar um estado de hiponatremia hipervolêmica, resultante de um pronunciado déficit da excreção de água livre, que leva a uma retenção inadequada de água em comparação com a concentração de Na^+ no compartimento plasmático (Fortune & Garcia-Tsao, 2013). Com a normalização do balanço de água provocado pela Rostafuroxina (Figura 16), a hiponatremia seria corrigida.

Uma outra hipótese, que emerge das observações de que tanto ratos CTR quanto DBR tratados com Rostafuroxina consomem uma quantidade significativamente maior de Na^+ (Figura 12), e de que os ratos desnutridos apresentam uma $[\text{Na}^+]_{\text{pls}}$ bem menor

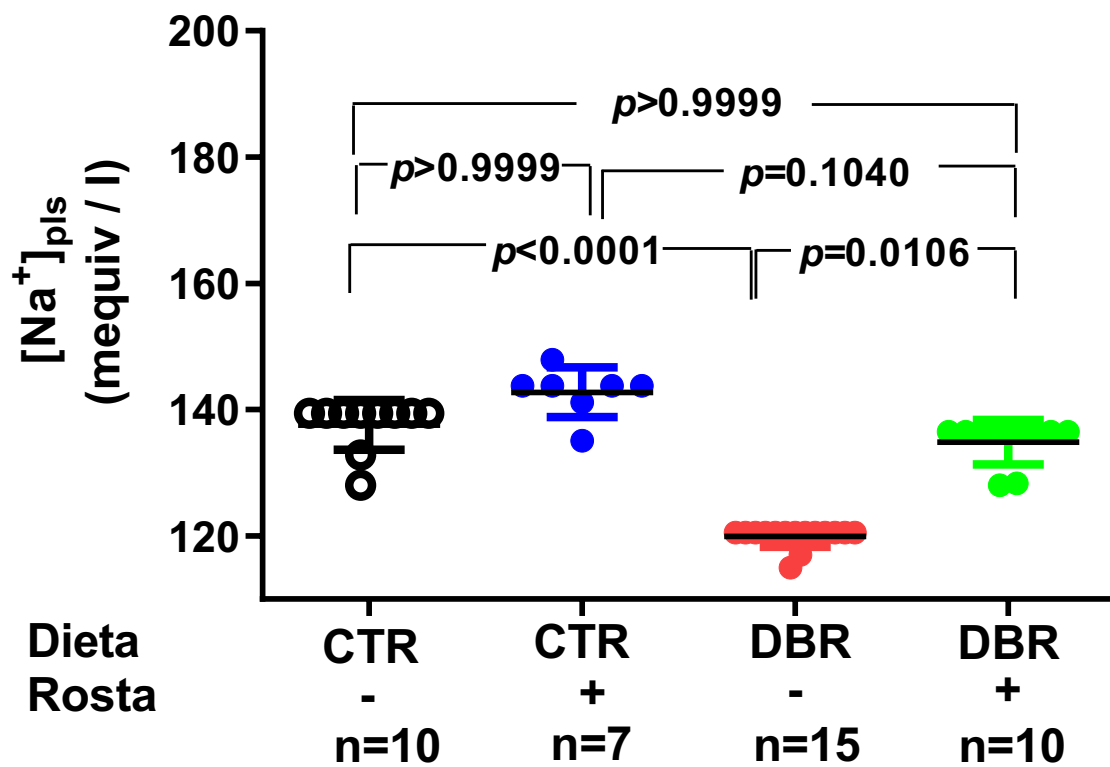


Figura 17. Concentração plasmática de Na^+ ($[Na^+]_{pls}$). As medidas de Na^+ foram realizadas nos plasmas coletados no dia 90 de vida. Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados na *abscissa*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na abscissa abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de p estão indicados dentro da figura. As diferenças foram avaliadas usando o teste de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunn para pares selecionados.

que os do grupo CTR (menos ~20 mequiv/l como já mencionado) restaurada pela Rostafuroxina (Figura 17), é a de que alto Na^+ se encontra presente – em maior quantidade nos ratos DBR – em compartimentos osmoticamente silenciosos, como hipotetizado alguns anos atrás (Titze *et al.*, 2002, 2003) e recentemente revisitado (Canaud *et al.*, 2019). O aumento da $[\text{Na}^+]_{\text{pls}}$ encontrado nos ratos que receberam Rostafuroxina é, por outro lado, compatível com a mobilização do Na^+ destes depósitos pelo fármaco, de maneira mais acentuada nos ratos DBR.

Esta segunda hipótese é reforçada pelas observações e o raciocínio elaborado a seguir a partir delas. Quando a Rostafuroxina foi administrada aos ratos CTR, foi encontrado um balanço diário significativamente negativo em torno de ~0,6 mequiv de Na^+ /100 g de massa corporal em 24 h, apesar de não se observar modificação da ingesta (Figura 12), uma observação que reforça a ideia de que a Rostafuroxina mobiliza o íon de compartimentos osmoticamente inativos (Titze *et al.*, 2014), passando transitoriamente por um compartimento plasmático ligeiramente concentrado (Figura 17) e sendo eliminado depois na urina como se comprova pelo efeito natriurético mostrado na Figura 14B. Aplicando este raciocínio aos ratos DBR, o balanço diário positivo de 0,4 mequiv/100 g de massa corporal (Figura 15) significa um armazenamento cumulativo de Na^+ ao longo do período experimental do estudo (62 dias) de ~25 mequiv por 100 g de massa corporal. O valor do balanço diário de Na^+ praticamente dobrou nos ratos que receberam Rostafuroxina (4ª coluna da Figura 15) ao mesmo tempo que a excreção urinária de Na^+ diminuiu em 85% (Figura 14C), possivelmente devido a uma resposta anormal ao fármaco numa condição de níveis provavelmente elevados de esteroides cardiotônicos, mimetizando as condições experimentais antinatriurética estabelecidas por Lim *et al.* (2000).

4.3. ATPases renais transportadoras de Na⁺ e pressão arterial sistólica em ratos normonutridos e desnutridos: Efeitos da Rostafuroxina.

Na seção anterior, ao se discutir o retorno dos valores de balanço de água dos ratos DBR para aqueles encontrados no grupo CTR quando se administra Rostafuroxina, foi hipotetizado que os rins e, portanto, os processos de transporte tubular primário acompanhados do fluxo secundário de água seriam modulados pelos esteroides cardio-tônicos e sensíveis à Rostafuroxina.

O transporte ativo de Na⁺ através do epitélio dos túbulos renais é um processo crucial na regulação do conteúdo de Na⁺ e do balanço de fluído nos diferentes órgãos e compartimentos líquidos (McDonough, 2010; Zhuo & Li, 2013). A Figura 18 mostra a influência oposta do status nutricional e da administração de Rostafuroxina nas duas ATPases transportadoras de Na⁺ presentes na membrana basolateral das células dos túbulos renais (Silva *et al.*, 2014a), que são responsáveis pela reabsorção de mais de 70% do Na⁺ filtrado nos glomérulos (Vieyra *et al.*, 2016; Eaton & Pooler, 2018). A atividade da bomba principal, a (Na⁺+K⁺)ATPase sensível à ouabaína (Figura 18A), diminuiu em torno de 30% nos ratos DBR em comparação ao CTR como previamente descrito (Pereira-Acácio *et al.*, 2022), com a Rostafuroxina promovendo uma diminuição adicional em ambos os grupos. Todavia, esta diminuição não acompanha a da massa corporal (~60%), comparação que permite postular que o transporte de Na⁺ mediado pela (Na⁺+K⁺)ATPase estaria suprarregulado nos ratos DBR. No caso da Na⁺-ATPase resistente à ouabaína e sensível à furosemida (Figura 18B), a desnutrição provocou um aumento de ~50% na sua atividade, igualada em níveis ainda mais altos nos grupos CTR + Rosta e DBR + Rosta após sua suprarregulação nos animais que receberam o fármaco.

Apesar de que a atividade hidrolítica da (Na⁺+K⁺)ATPase em preparações de membrana não reflita quantitativamente a estequiometria de transporte iônico:hidrólise

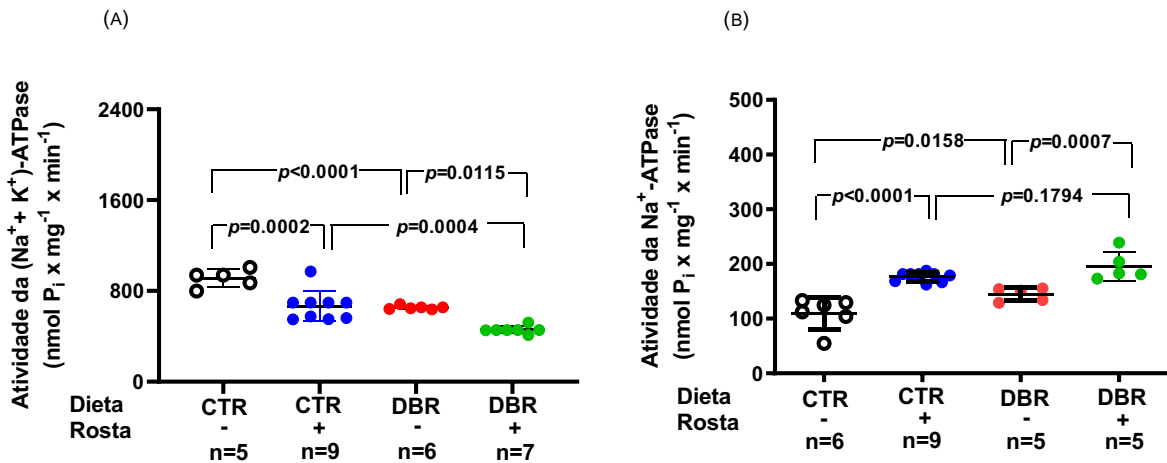


Figura 18. Atividade das ATPases transportadoras de Na⁺ em túbulos proximais renais. As medidas foram feitas em preparações enriquecidas de membrana plasmática isoladas da região externa do córtex renal (*cortex corticis*) no dia 90 de idade. (A) (Na⁺+K⁺)ATPase sensível a ouabaína. (B) Na⁺-ATPase resistente à ouabaína e sensível à furosemida. Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados nas *abscissae*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média ± DP. O número de animais é dado na abscissa abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de *p* estão indicados dentro dos painéis. As diferenças foram avaliadas usando ANOVA-2 fatores seguida pelo teste de Bonferroni para pares selecionados.

de ATP em células intactas, é possível propor que menos Na^+ do total filtrado é reabsorvido nos túbulos proximais dos ratos desnutridos devido à menor demanda de transporte em ratos de menor tamanho. Todavia, a comparação acima entre decréscimo da atividade da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ e da massa corporal permite reiterar aqui a proposta de que a reabsorção em massa do Na^+ filtrado estaria aumentada, hipótese que ganha suporte com as observações das Figuras 14B e 14C sobre concentração e excreção urinária de Na^+ . Ao mesmo tempo, a suprarregulação em uma ordem de magnitude da $\text{Na}^+ - \text{ATPase}$ resistente à ouabaína significaria que o ajuste fino de reabsorção de Na^+ mediado por esta ATPase (Bełtowski *et al.*, 2007) contribuiria adicionalmente para a gênese progressiva de hipertensão arterial. Este ponto será apresentado e discutido a seguir, integrando-o com a discussão sobre os efeitos da Rostafuroxina nas ATPases transportadoras de Na^+ .

A Figura 19 mostra que a pressão arterial sistólica registrada no dia 90 – sensível a Losartan e Ang-(3–4) (Pereira-Acácio *et al.*, 2022) – se encontrava aumentada nos ratos DBR, sendo também normalizada pela administração de Rostafuroxina, que não teve qualquer efeito nos ratos CTR. É importante destacar que a influência do fármaco na $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ coincide com o balanço de Na^+ em ratos CTR, e permite propor que a pronunciada inibição que a Rostafuroxina exerce no grupo DBR provavelmente contribui para a normalização da pressão arterial sistólica mostrada na Figura 19. A observação que a administração do fármaco normalizou a pressão arterial sistólica no grupo DBR sem influência em ratos CTR poderia ser discutida a partir das três ideias complementares apresentadas a seguir.

Primeiro, as anormalidades estruturais, funcionais e regulatórias induzidas pela desnutrição crônica que ocorreriam no tecido renal com base na hipótese de Lim *et al.* (2000) acima discutida – e que alterariam as respostas das duas ATPases transportadoras de Na^+ – não se encontrariam em artérias como a aorta torácica e as mesentéricas.

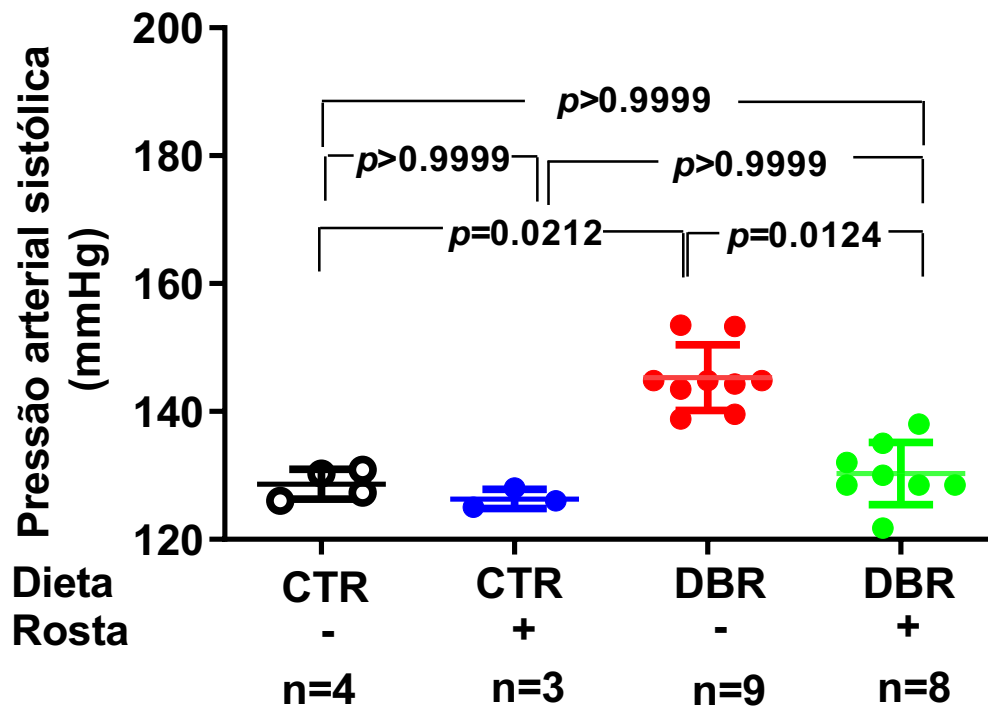


Figura 19. Pressão arterial sistólica. A pressão arterial sistólica foi medida no dia 90 de idade. Dietas e tratamento com ou sem Rostafuroxina estão indicados na *abscissa*. O conjunto de pontos para cada grupo experimental é acompanhado por linhas horizontais que indicam média $\pm$ DP. O número de animais é dado na *abscissa* abaixo da coluna de pontos correspondentes. Os valores de p estão indicados dentro da figura. As diferenças foram avaliadas usando o teste de Kruskal-Wallis seguida pelo teste de Dunn para pares selecionados.

Nos ratos DBR estes vasos apresentariam rigidez, responsável pelo aumento da pressão arterial sistólica quando há alterações nos glicosaminoglicanos da superfície da camada endotelial. É conhecido há quase 40 anos que glicosaminoglicanos são importantes na fisiopatologia da hipertensão (Reynertson *et al.*, 1986), especialmente aqueles encontrados em vasos de resistência (Castro *et al.*, 1999; Roccabianca *et al.*, 2014). De maneira interessante, estas alterações – e a hipertensão sistólica consequente – são encontradas também na obesidade (Luzes *et al.*, 2021), constituindo um paradoxo fisiopatológico que pode ser explicado por que nestas alterações metabólicas opostas (desnutrição e obesidade) há aumento da atividade local do SRAA (Silva *et al.*, 2014b; Luzes *et al.*, 2020).

A segunda ideia – associada à anterior – seria a de que a Rostafuroxina atuaria nesses vasos somente quando um “microambiente pró-hipertensivo” (Dias *et al.*, 2014) (i.e. aumento da atividade do SRAA) se encontra instalado, como nos casos de ratos hipertensos (Ferrandi *et al.*, 2002; Dias *et al.*, 2014; Wenceslau & Rossoni, 2014; esta Tese). Por fim, em terceiro lugar, a remoção do Na^+ estocado nos compartimentos osmoticamente silenciosos representados pelos glicosaminoglicanos da superfície endotelial e do interstício perivascular (Reynertson *et al.*, 1986; Olde Engberink *et al.*, 2015) poderia sustentar o efeito anti-hipertensivo da Rostafuroxina nos ratos desnutridos.

Analisando novamente as Figuras 15 e 18A, é também perceptível que há uma total dissociação entre balanço de Na^+ e $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ nos animais desnutridos tratados e não tratados. Os resultados são compatíveis com a ideia de que ocorreu migração da $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ da membrana para as cavéolas (Gildea *et al.*, 2009), concomitantemente com internalização e ancoragem anormal em proteínas do citoesqueleto, infrarregulando esta bomba (Simonini *et al.*, 2018). O oposto é verdadeiro quando se analisa a Na^+ -ATPase resistente à ouabaína, cuja influência no balanço de Na^+ não é

evidente devido à sua menor atividade (compare as ordenadas das Figuras 18A e 18B), apesar de sua importância no manuseio do Na^+ corporal.

Finalmente, um mecanismo – já mencionado acima – merece nova discussão no contexto dos efeitos anti-hipertensivos da Rostafuroxina e da história do próprio fármaco. Em um tipo de ratos espontaneamente hipertensos com altos níveis de ouabaína endógena circulante, a Rostafuroxina não interagia com o SRAA (Ferrandi *et al.*, 2002) e, portanto, as ações anti-hipertensivas do fármaco pareciam não antagonizar este sistema para prevenir a gênese de hipertensão arterial. No caso dos ratos cronicamente desnutridos por ingesta continuada da DBR, o tubulointerstício cortical apresenta mais de quatro vezes o número de células positivas para Ang II encontrado em ratos CTR (Silva *et al.*, 2014b), uma evidência de atividade do SRAA aumentada. Além disso, a hipertensão sensível à Rostafuroxina que eles desenvolvem é completamente ou parcialmente normalizada pela administração de Losartan e Ang-(3–4, respectivamente (Pereira-Acácio *et al.*, 2022). Como o Losartan é um antagonista de receptores do tipo 1 para Ang II (Timmermans *et al.*, 1995) e Ang-(3–4) – via o eixo Ang II → receptores do tipo 2 – antagoniza todos os efeitos mediados pela ativação do eixo Ang II → receptores do tipo 1 (Miura *et al.*, 2010; Dias *et al.*, 2017), é plausível propor que, em termos de ações em vasos (como a aorta torácica e as artérias mesentéricas), a Rostafuroxina parece ter efeitos opostos e os mesmos alvos finais que a via ativada pelo eixo Ang II → receptores de Ang II do tipo 1. Apoiam esta conclusão as observações, diferentes daquelas de Ferrandi *et al.* (2002), que levaram a propor que a “ouabaína endógena” é regulada pela via de sinalização acoplada a receptores do tipo 2 (Laredo *et al.*, 1997; Dmitrieva *et al.*, 2002; Schoner & Scheiner-Bobis, 2007).

5. Conclusões e significado

As descobertas centrais na presente Tese são que a administração crônica de Rostafuroxina – inicialmente descrita como um fármaco anti-hipertensivo com efeito inibitório na $(\text{Na}^+ + \text{K}^+)\text{ATPase}$ da medula externa renal (Ferrandi *et al.*, 2002) – modula a pressão arterial, a ingesta de alimento e energia, o metabolismo proteico, o balanço de Na^+ , o balanço de fluído e as ATPases transportadoras de Na^+ dos túbulos proximais renais de ratos numa forma que depende do status nutricional dos animais. Foi demonstrado neste trabalho que a Rostafuroxina exerce seus efeitos na pressão arterial em ratos desnutridos e hipertensos, sem qualquer influência em ratos normonutridos e normotensos. Esta seletividade, somada às evidências de interação com o SRAA, pode abrir novas avenidas para o tratamento da hipertensão arterial em humanos normonutridos e desnutridos. A Figura 20, “graphical abstract” do manuscrito que acompanha esta Tese, resume as descobertas e as propostas centrais do presente trabalho.

5. Referências

- Adachi M, Kitamura K, Tomita K.** Regulation of sodium and water balance by the kidney. *Nihon Rinsho* 63: 45–50, 2005.
- Agência Senado.** Brasília, 14 de outubro de 2022 – Disponível em <https://www12.senado.leg.br/noticias/infomaterias/2022/10/retorno-do-brasil-ao-mapa-da-fome-da-onu-preocupa-senadores-e-estudiosos>. Acesso realizado em 13/06/2023.
- Associação Brasileira de Nutrição. (ASBRAN)** – Disponível em <https://www.asbran.org.br/noticias/discriminacao-de-mulheres-indigenas-fao-faz-forte-critica>, 2018. Acesso realizado em 13/06/2023.
- Awuchi CG, Victory IS, Ikechukwu AO, Echeta CK.** Health benefits of micronutrients (vitamins and minerals) and their associated deficiency diseases: A systematic review. *Int J Food Sci* 3: 1–32, 2020. doi: [10.47604/ijf.1024](https://doi.org/10.47604/ijf.1024)
- Axelband F, Assunção-Miranda I, de Paula IR, Ferrão FM, Dias J, Miranda A, Miranda F et al.** Ang-(3–4) suppresses inhibition of renal plasma membrane calcium pump by Ang II. *Regul Pept* 155: 81–90, 2009. doi: [10.1016/j.regpep.2009.03.014](https://doi.org/10.1016/j.regpep.2009.03.014).
- Bagrov AY, Shapiro JI, Fedorova OV.** Endogenous cardiotonic steroids: physiology, pharmacology, and novel therapeutic targets. *Pharmacol Rev* 61: 9–38, 2009. doi: [10.1124/pr.108.000711](https://doi.org/10.1124/pr.108.000711).
- Bełtowski J, Borkowska E, Wójcicka G, Marciniak A.** Regulation of renal ouabain-resistant Na⁺-ATPase by leptin, nitric oxide, reactive oxygen species, and cyclic nucleotides: implications for obesity-associated hypertension. *Clin Exp Hypertens* 29: 189–207, 2007. doi: [10.1080/10641960701361585](https://doi.org/10.1080/10641960701361585).
- Bergmann F, Chaimovitz M, Costin A, Gutman Y, Ginath Y.** Water intake of rats after implantation of ouabain into the hypothalamus. *Am J Physiol* 213: 328–332, 1967. doi: [10.1152/ajplegacy.1967.213.2.328](https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1967.213.2.328).
- Bianchi G, Tripodi G, Casari G, Salardi S, Barber BR, Garcia R, Leoni P et al.** Two points mutations within the adducin genes are involved in blood pressure variation. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 91: 3999–4003, 1994. doi: [10.1073/pnas.91.9.3999](https://doi.org/10.1073/pnas.91.9.3999).
- Blaustein MP.** Physiological effects of endogenous ouabain: control of intracellular Ca²⁺ stores and cell responsiveness. *Am J Physiol* 264(6 Pt 1): C1367–C1387, 1993. doi: [10.1152/ajpcell.1993.264.6.C1367](https://doi.org/10.1152/ajpcell.1993.264.6.C1367).

- Botto C, Basañes M, Escalona M, Villamizar N, Noya-Alárcon O, Cortez J, Vivas-Martínez S, et al.** Evidence of suppression of onchocerciasis transmission in the Venezuelan Amazonian focus. *Parasit Vectors* 9: 1–18, 2016. doi:[10.1186/s13071-016-1313-z](https://doi.org/10.1186/s13071-016-1313-z)
- Brensilver JM, Daniels FH, Lefavour GS, Malseptic RM, Lorch JA, Ponte ML, Cortell S.** Effect of variations in dietary sodium intake on sodium excretion in mature rats. *Kidney Int* 27: 497–502, 1985. doi:[10.1038/ki.1985.38](https://doi.org/10.1038/ki.1985.38).
- Brown CS, Lichter-Konecki U.** Phenylketonuria (PKU): A problem solved? *Mol Genet Metab Rep* 6: 8–12, 2015. doi: [10.1016/j.ymgmr.2015.12.004](https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2015.12.004).
- Caldart RV, Marrero L, Basta PC, Orellana JD.** Factors associated with pneumonia in Yanomami children hospitalized for ambulatory care sensitive conditions in the north of Brazil. *Cien Saude Colet* 21: 1597–1606, 2016. doi: [10.1590/1413-81232015215.08792015](https://doi.org/10.1590/1413-81232015215.08792015)
- Canaud B, Kooman J, Selby NM, Taal M, Francis S, Kopperschmidt P, Maierhofer A et al.** Sodium and water handling during hemodialysis: new pathophysiologic insights and management approaches for improving outcomes in end-stage kidney disease. *Kidney Int* 95: 296–309, 2019. doi:[10.1016/j.kint.2018.09.024](https://doi.org/10.1016/j.kint.2018.09.024).
- Carvalho DCM, Cavalcante-Silva LHA, Lima ÉA, Galvão JGFM, Alves AKA, Feijó PRO et al.** Marinobufagenin Inhibits Neutrophil Migration and Proinflammatory Cytokines. *J Immunol Res* 2019: 1094520, 2019. doi: [10.1155/2019/1094520](https://doi.org/10.1155/2019/1094520).
- Casari G, Barlassina C, Cusi D, Zagato L, Muirhead R, Righetti M, Nembri P et al.** Association of the alpha-adducin locus with essential hypertension. *Hypertension* 25: 320–326, 1995. doi: [10.1161/01.hyp.25.3.320](https://doi.org/10.1161/01.hyp.25.3.320).
- Castro CM, Cruzado MC, Miatello RM, Risler NR.** Proteoglycan production by vascular smooth muscle cells from resistance arteries of hypertensive rats. *Hypertension* 34(4 Pt 2): 893–896, 1999. doi: [10.1161/01.hyp.34.4.893](https://doi.org/10.1161/01.hyp.34.4.893).
- Chao AM, Jastreboff AM, White MA, Grilo CM, Sinha R.** Stress, cortisol, and other appetite-related hormones: prospective prediction of 6-month changes in food cravings and weight. *Obesity (Silver Spring)* 25: 713–720, 2017. doi:[10.1002/oby.21790](https://doi.org/10.1002/oby.21790).
- Cheney MC, Sabry ZI, Beaton GH.** Blood transaminase activities in vitamin B6 deficiency: effect of depletion and repletion on the erythrocyte enzymes. *Can J Physiol Pharmacol* 45: 343–351, 1967. doi: [10.1139/y67-038](https://doi.org/10.1139/y67-038).

- Citterio L, Bianchi G, Scioli GA, Glorioso N, Bigazzi R, Cusi D et al.** Antihypertensive treatment guided by genetics: PEARL-HT, the randomized proof-of-concept trial comparing rosfuroxin with losartan. *Pharmacogenomics J* 21: 346–358, 2021. doi:[10.1038/s41397-021-00214-y](https://doi.org/10.1038/s41397-021-00214-y).
- Coka-Guevara S, Markus RP, Caruso-Neves C, Lopes AG, Vieyra A.** Adenosine inhibits the renal plasma-membrane ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$)-ATPase through a pathway sensitive to cholera toxin and sphingosine. *Eur J Biochem* 263: 71–78, 1999. doi:[10.1046/j.1432-1327.1999.00456.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1999.00456.x).
- Cort JH, Lichardus B.** Hormones and the Kidney. Ed. P. C. Williams. London: 25–38, 1963.
- Cusi D.** Genetic renal mechanisms of hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 6: 192–198, 1997. doi: [10.1097/00041552-199703000-00014](https://doi.org/10.1097/00041552-199703000-00014).
- De Wardener HE, Mills IH, Clapham WF, Hayter CJ.** Studies on the efferent mechanism of the sodium diuresis which follows the administration of intravenous saline in the dog. *Clin Sci* 21: 249–258, 1961.
- Dias J, Ferrão FM, Axelband F, Carmona AK, Lara LS, Vieyra A.** ANG-(3–4) Inhibits renal Na^+ -ATPase in hypertensive rats through a mechanism that involves dissociation of ANG II receptors, heterodimers, and PKA. *Am J Physiol Renal Physiol* 306: F855–863, 2014. doi:[10.1152/ajprenal.00488.2013](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00488.2013).
- Dias J, Axelband F, Lara LS, Muzi-Filho H, Vieyra A.** Is angiotensin-(3–4) (Val-Tyr), the shortest angiotensin II-derived peptide, opening new vistas on the renin-angiotensin system? *J Renin Angiotensin Aldosterone Syst* 18: 1470320316689338, 2017. doi: [10.1177/1470320316689338](https://doi.org/10.1177/1470320316689338).
- Dickinson MB, Hutchinson TF, Dietenberger M, Matt F, Peters MP.** Litter species composition and topographic effects on fuels and modeled fire behavior in an Oak-Hickory Forest in the Eastern USA. *PLoS One* 11: e0159997, 2016. doi: [10.1371/journal.pone.0159997](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0159997).
- Dietz WH, Pryor S.** How can we act to mitigate the global syndemic of obesity, undernutrition, and climate change? *Curr Obes Rep* 11: 61–69, 2022. doi: [10.1007/s13679-021-00464-8](https://doi.org/10.1007/s13679-021-00464-8)

- Dmitrieva RI, Doris PA.** Cardiotonic steroids: potential endogenous sodium pump ligands with diverse function. *Exp Biol Med (Maywood)* 227: 561–569, 2002. doi:[10.1177/153537020222700803](https://doi.org/10.1177/153537020222700803).
- Eaton DC, Pooler JP.** *Vander's Renal Physiology*, 9 ed., McGraw-Hill Education: New York, NY, USA, 2018.
- Efendiev R, Krmar RT, Ogimoto G, Zwiller J, Tripodi G, Katz AI, Bianchi G et al.** Hypertension-linked mutation in the adducin alpha-subunit leads to higher AP2-mu2 phosphorylation and impaired Na⁺,K⁺-ATPase trafficking in response to GPCR signals and intracellular sodium. *Circ Res* 95: 1100–1108, 2004. doi:[10.1161/01.RES.0000149570.20845.89](https://doi.org/10.1161/01.RES.0000149570.20845.89).
- Eroğlu AG.** Malnutrition and the heart. *Turk Pediatri Ars* 54: 139–140, 2019. doi:[10.14744/TurkPediatriArs.2019.03764](https://doi.org/10.14744/TurkPediatriArs.2019.03764).
- Eyzaguirre-Velásquez J, Olavarria-Ramírez L, González-Arancibia C, Díaz-Merino C, Ariz R, López S, Quiroz W et al.** Protein malnutrition during juvenile age increases ileal and colonic permeability in rats. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 64: 707–712, 2017. doi: [10.1097/MPG.0000000000001324](https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000001324).
- Food and Agriculture Organizations of the United Nations (FAO, 2022)** – Disponível em <https://www.fao.org/hunger/en/>. Acesso realizado em 13/06/2023.
- Farr OM, Li C-SR, Mantzoros CS.** Central nervous system regulation of eating: insights from human brain imaging. *Metabolism* 65: 699–713, 2016. doi:[10.1016/j.metabol.2016.02.002](https://doi.org/10.1016/j.metabol.2016.02.002).
- Feng M, Whitesall S, Zhang Y, Beibel M, D'Alecy L, DiPetrillo K.** Validation of volume-pressure recording tail-cuff blood pressure measurements. *Am J Hypertens* 21: 1288–1291, 2008. doi:[10.1038/ajh.2008.301](https://doi.org/10.1038/ajh.2008.301).
- Ferrandi M, Minotti E, Salardi S, Florio M, Bianchi G, Ferrari P.** Ouabainlike factor in Milan hypertensive rats. *Am J Physiol* 263: F739–F748, 1992. doi: [10.1152/ajprenal.1992.263.4.F739](https://doi.org/10.1152/ajprenal.1992.263.4.F739).
- Ferrandi M, Manunta P, Balzan S, Hamlyn JM, Bianchi G, Ferrari P.** Ouabain-like factor quantification in mammalian tissues and plasma: comparison of two independent assays. *Hypertension* 30: 886–896, 1997. doi: [10.1161/01.hyp.30.4.886](https://doi.org/10.1161/01.hyp.30.4.886).
- Ferrandi M, Barassi P, Minotti E, Duzzi L, Molinari I, Bianchi G, Ferrari P.** PST 2238: a new antihypertensive compound that modulates renal Na-K pump function without

diuretic activity in Milan hypertensive rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 40: 881–889, 2002. doi:[10.1097/00005344-200212000-00009](https://doi.org/10.1097/00005344-200212000-00009).

Ferrandi M, Molinari I, Barassi P, Minotti E, Bianchi G, Ferrari P. Organ hypertrophic signaling within caveolae membrane subdomains triggered by ouabain and antagonized by PST 2238. *J Biol Chem* 279: 33306–33314, 2004. doi:[10.1074/jbc.M402187200](https://doi.org/10.1074/jbc.M402187200).

Ferrandi M, Molinari I, Torielli L, Padoani G, Salardi S, Rastaldi MP, Ferrari P, Bianchi G. Adducin -and ouabain-related gene variants predict the antihypertensive activity of rostafuroxin, part 1: experimental studies. *Sci Transl Med* 2: 59ra86, 2010. doi: [10.1126/scitranslmed.3001815](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3001815).

Ferrari P, Ferrandi M, Valentini G, Bianchi G. Rostafuroxin: an ouabain antagonist that corrects renal and vascular Na⁺-K⁺-ATPase alterations in ouabain and adducin-dependent hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R529–535, 2006. doi:[10.1152/ajpregu.00518.2005](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00518.2005).

Ferrari P. Rostafuroxin: an ouabain-inhibitor counteracting specific forms of hypertension. *Biochim Biophys Acta* 1802: 1254–1258, 2010. doi: [10.1016/j.bba-dis.2010.01.009](https://doi.org/10.1016/j.bba-dis.2010.01.009).

Ford JD, Zavaleta-Cortijo C, Ainembabazi T, Anza-Ramirez C, Arotoma-Rojas I, Bezerra J, Chicmana-Zapata V et al. Interactions between climate and COVID-19. *Lancet Planet Health* 6: e825–e833, 2022. doi:[10.1016/S2542-5196\(22\)00174-7](https://doi.org/10.1016/S2542-5196(22)00174-7)

Foretz M, Viollet B. Measurement of AMPK-induced inhibition of lipid synthesis flux in cultured cells. *Methods Mol Biol* 1732: 363–371, 2018. doi:[10.1007/978-1-4939-7598-3_23](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7598-3_23).

Forrester SJ, Booz GW, Sigmund CD, Coffman TM, Kawai T, Rizzo V, Scalia R, Eguchi S. Angiotensin II signal transduction: an update on mechanisms of physiology and pathophysiology. *Physiol Rev* 98: 1627–1738, 2018. doi: [10.1152/physrev.00038.2017](https://doi.org/10.1152/physrev.00038.2017).

Fortune BE, Garcia-Tsao G. Hypervolemic hyponatremia: clinical significance and management. *Clin Liver Dis (Hoboken)* 2: 109–112, 2013. doi: [10.1002/cld.179](https://doi.org/10.1002/cld.179).

Gildea JJ, Israel JA, Johnson AK, Zhang J, Jose PA, Felder RA. Caveolin-1 and dopamine-mediated internalization of NaKATPase in human renal proximal tubule cells.

Hypertension 54: 1070–1076, 2009. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134338](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.109.134338).

Global Burden of Disease Collaborative Network, Global Burden of Disease Study 2019 (GBD 2019). Institute for Health Metrics and Evaluation – IHME – Disponível em <https://vizhub.healthdata.org/gbd-results/>

Global Hunger Index (GHI, 2022) – Disponível em <https://www.globalhungerindex.org/download/all.html>. Acesso realizado em 13/06/2023.

Haas M, Askari A, Xie Z. Involvement of Src and epidermal growth factor receptor in the signal-transducing function of Na⁺/K⁺-ATPase. *J Biol Chem* 275: 27832–27837, 2000. doi: [10.1074/jbc.M002951200](https://doi.org/10.1074/jbc.M002951200).

Jannuzzi LB, Pereira-Acacio A, Ferreira BSN, Silva-Pereira D, Veloso-Santos JPM, Alves-Bezerra DS et al. Undernutrition - thirty years of the regional basic diet: the legacy of Naíde Teodósio in different fields of knowledge. *Nutr Neurosci* 25: 1973–1994, 2022. doi: [10.1080/1028415X.2021.1915631](https://doi.org/10.1080/1028415X.2021.1915631).

Kawarazaki W, Fujita T. Kidney and epigenetic mechanisms of salt-sensitive hypertension. *Nat Rev Nephrol* 17: 350–363, 2021. doi: [10.1038/s41581-021-00399-2](https://doi.org/10.1038/s41581-021-00399-2).

Kurita H, Xu KY, Maejima Y, Nakata M, Dezaki K, Santoso P et al. Arcuate Na⁺,K⁺-ATPase senses systemic energy states and regulates feeding behavior through glucose-inhibited neurons. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 309: E320–333, 2015. doi: [10.1152/ajpendo.00446.2014](https://doi.org/10.1152/ajpendo.00446.2014).

Laredo J, Shah JR, Lu ZR, Hamilton BP, Hamlyn JM. Angiotensin II stimulates secretion of endogenous ouabain from bovine adrenocortical cells via angiotensin type 2 receptors. *Hypertension* 29: 401–407, 1997. doi: [10.1161/01.hyp.29.1.401](https://doi.org/10.1161/01.hyp.29.1.401).

Leib DE, Zimmerman CA, Knight ZA. Thirst. *Curr Biol* 26: R1260–R1265, 2016. doi: [10.1016/j.cub.2016.11.019](https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.11.019).

Lewis LK, Yandle TG, Hilton PJ, Jensen BP, Begg EJ, Nicholls M.G. Endogenous ouabain is not ouabain. *Hypertension* 64: 680–683, 2014. doi: [10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03919](https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.03919).

Lim YC, Jeong HS, Park JS, Shin JH, Kook YJ. Renal functional responses to centrally administered ouabain in anesthetized rabbits. *Methods Find Exp Clin Pharmacol* 22: 573–579, 2000.

- Liu J, Tian J, Haas M, Shapiro JI, Askari A, Xie Z.** Ouabain interaction with cardiac Na⁺/K⁺-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na⁺ and Ca²⁺ concentrations. *J Biol Chem* 275: 27838–27844, 2000. doi: [10.1074/jbc.M002950200](https://doi.org/10.1074/jbc.M002950200).
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275, 1951.
- Lu J, Huang Z, Wang J, Zhao X, Yang Y, Wu B, Kang Y, et al.** Prevalence and prognostic impact of malnutrition in critical patients with acute myocardial infarction: Results from Chinese CIN Cohort and American MIMIC-III Database. *Front Nutr* 9: 890199, 2022. doi: [10.3389/fnut.2022.890199](https://doi.org/10.3389/fnut.2022.890199).
- Luzardo R, Silva PA, Einicker-Lamas M, Ortiz-Costa S, do Carmo M da G, Vieira-Filho LD, Paixão AD et al.** Metabolic programming during lactation stimulates renal Na⁺ transport in the adult offspring due to an early impact on local angiotensin II pathways. *PLoS One* 6: e21232, 2011. doi: [10.1371/journal.pone.0021232](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021232).
- Luzes R, Crisóstomo T, Silva PA, lack R, de Abreu VG, Francischetti EA, Vieyra A.** Angiotensin-(3–4) normalizes blood pressure, decreases Na⁺ and energy intake, but preserves urinary Na⁺ excretion in overweight hypertensive rats. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis* 1867: 166012, 2021. doi: [10.1016/j.bbadis.2020.166012](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2020.166012).
- Manunta P, Messaggio E, Ballabeni C, Sciarrone MT, Lanzani C, Ferrandi M, Hamlyn JM et al.** Salt sensitivity study group of the Italian Society of Hypertension. Plasma ouabain-like factor during acute and chronic changes in sodium balance in essential hypertension. *Hypertension* 38: 198–203, 2001. doi: [10.1161/01.hyp.38.2.198](https://doi.org/10.1161/01.hyp.38.2.198).
- Martins VJB, Sesso R, Clemente APG, Fernandes MBF, Sawaya AL.** Albuminuria, renal function and blood pressure in undernourished children and recovered from undernutrition. *Pediatr Nephrol* 32: 1555–1563, 2017. doi: [10.1007/s00467-017-3602-y](https://doi.org/10.1007/s00467-017-3602-y).
- Matsuoka Y, Li X, Bennett V.** Adducin: structure, function and regulation. *Cell Mol Life Sci* 57: 884–895, 2000. doi: [10.1007/PL00000731](https://doi.org/10.1007/PL00000731).
- McDonough AA.** Mechanisms of proximal tubule sodium transport regulation that link extracellular fluid volume and blood pressure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298: R851–861, 2010. doi: [10.1152/ajpregu.00002.2010](https://doi.org/10.1152/ajpregu.00002.2010).

- McKinley MJ, Denton DA, Ryan PJ, Yao ST, Stefanidis A, Oldfield BJ.** From sensory circumventricular organs to cerebral cortex: neural pathways controlling thirst and hunger. *J Neuroendocrinol* 31: e12689, 2019. doi: [10.1111/jne.12689](https://doi.org/10.1111/jne.12689).
- McLaren DS, Pellett PL.** Nutrition in the middle East. *World Rev Nutr Diet* 12: 43–127, 1970. doi: [10.1159/000387584](https://doi.org/10.1159/000387584).
- Miura S, Matsuo Y, Kiya Y, Karnik SS, Saku K.** Molecular mechanisms of the antagonistic action between AT₁ and AT₂ receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 391: 85–90, 2010. doi: [10.1016/j.bbrc.2009.11.008](https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.11.008).
- Moate T, Rabie T, Minnie C, Mäenpää A.** Comorbidities of child malnutrition in low- and medium-income countries: A systematic review. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 75: 400–410, 2022. doi: [10.1097/MPG.0000000000003558](https://doi.org/10.1097/MPG.0000000000003558).
- Morton GJ, Cummings DE, Baskin DG, Barsh GS, Schwartz MW.** Central nervous system control of food intake and body weight. *Nature* 443, 289–295, 2006. doi: [10.1038/nature05026](https://doi.org/10.1038/nature05026).
- Munro HN.** In Mammalian Protein Metabolism. *New York and London: Academic Press* 4: 299, 1970.
- Murillo B, Cabezas MT, Bressani R.** . Influence of energy density on the use of protein in diets prepared from corn and beans (Article in Spanish). *Arch Latinoam Nutr* 24: 223–241, 1974.
- Muzi-Filho H, Souza AM, Bezerra CG, Boldrini LC, Takiya CM, Oliveira FL, Nesi RT et al.** Rats undernourished in utero have altered Ca²⁺ signaling and reduced fertility in adulthood. *Physiol Rep* 3: e12587, 2015. doi: [10.14814/phy2.12587](https://doi.org/10.14814/phy2.12587).
- Nesher M, Dvela M, Igbokwe VU, Rosen H, Lichtstein D.** Physiological roles of endogenous ouabain in normal rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297: H2026–H2034, 2009. doi: [10.1152/ajpheart.00734.2009](https://doi.org/10.1152/ajpheart.00734.2009).
- Olde Engberink RHG, Rorije NMG, Homan van der Heide JJ, van den Born BJH, Vogt L.** Role of the vascular wall in sodium homeostasis and salt sensitivity. *J Am Soc Nephrol* 26: 777–783, 2015. doi: [10.1681/ASN.2014050430](https://doi.org/10.1681/ASN.2014050430).
- Orellana JDY, Marrero L, Alves CLM, Ruiz CMV, Hacon SS, Oliveira MW, Basta PC.** Association of severe stunting in indigenous Yanomami children with maternal short stature: clues about the intergenerational transmission. *Cien Saude Colet* 24: 1875–1883, 2019. doi: [10.1590/141381232018245.17062017](https://doi.org/10.1590/141381232018245.17062017)

- Otero-Rodiño C, Conde-Sieira M, Comesaña S, Álvarez-Otero R, López-Patiño MA, Míguez JM, Soengas JL.** Na⁺/K⁺-ATPase is involved in the regulation of food intake in rainbow trout but apparently not through brain glucosensing mechanisms. *Physiol Behav* 209: 112617, 2019. doi:[10.1016/j.physbeh.2019.112617](https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2019.112617).
- Otter, C.** Feast and Famine: The Global Food Crisis." Origins: Current Events in Historical Perspective. Ohio State University, 2010. <http://origins.osu.edu/article/feast-and-famine-global-food-crisis>
- Pantoja LN, Orellana JDY, Leite MS, Basta PC.** Cobertura do Sistema de Vigilância Alimentar e Nutricional Indígena (SISVAN-I) e prevalência de desvios nutricionais em crianças Yanomami menores de 60 meses, Amazônia, Brasil. *Rev Bras Saude Mater Infant* 14: 53–63, 2014. doi:[10.1590/S1519-38292014000100005](https://doi.org/10.1590/S1519-38292014000100005).
- Pauw PG, Kaffer CR, Petersen RJ, Semerad SA, Williams DC.** Inhibition of myogenesis by ouabain: effect on protein synthesis. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 36: 133–138, 2000. doi: [10.1290/1071-2690\(2000\)036<0133:IOMBOE>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1290/1071-2690(2000)036<0133:IOMBOE>2.0.CO;2).
- Pavlovic D.** Endogenous cardiotonic steroids and cardiovascular disease, where to next? *Cell Calcium* 86: 102156, 2020. doi:[10.1016/j.ceca.2019.102156](https://doi.org/10.1016/j.ceca.2019.102156).
- Percie du Sert N, Hurst V, Ahluwalia A, Alam S, Avey MT, Baker M et al.** The ARRIVE guidelines 2.0: updated guidelines for reporting animal research. *PLoS Biol* 18: e3000410, 2020. doi:[10.1371/journal.pbio.3000410](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000410).
- Pereira-Acácio A, Veloso-Santos JPM, Nossar LF, Costa-Sarmiento G, Muzi-Filho H, Vieyra A.** Angiotensin-(3-4) normalizes the elevated arterial blood pressure and abnormal Na⁺/energy handling associated with chronic undernutrition by counteracting the effects mediated by type 1 angiotensin II receptors. *PloS One* 17: e0273385, 2022. doi:[10.1371/journal.pone.0273385](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0273385).
- Proverbio F, Del Castillo JR.** Na⁺-stimulated ATPase activities in kidney basal-lateral plasma membranes. *Biochim Biophys Acta* 646: 99–108, 1981. doi: [10.1016/0005-2736\(81\)90276-5](https://doi.org/10.1016/0005-2736(81)90276-5).
- Quadri L, Bianchi G, Cerri A, Fedrizzi G, Ferrari P, Gobbini M, Melloni P et al.** 17 beta-(3-furyl)-5 beta-androstane-3 beta, 14 beta, 17 alpha-triol (PST 2238). A very potent antihypertensive agent with a novel mechanism of action. *J Med Chem* 40: 1561–1564, 1997. doi: [10.1021/jm970162e](https://doi.org/10.1021/jm970162e).

- Ramos-Aliaga R.** Biochemical and nutritional aspects in growing rats receiving proteins of 2 dietary regimens of the Peruvian Andes. *Arch Latinoam Nutr* 28: 378–400, 1978.
- Reeves PG.** Components of the AIN-93 diets as improvements in the AIN-76A diet. *J Nutr* 127: 838S–841S, 1997. doi:[10.1093/jn/127.5.838S](https://doi.org/10.1093/jn/127.5.838S).
- Reynertson RH, Parmley RT, Rodén L, Oparil S.** Proteoglycans and hypertension. I. A biochemical and ultrastructural study of aorta glycosaminoglycans in spontaneously hypertensive rats. *Coll Relat Res* 6: 77–101, 1986. doi:[10.1016/s0174-173x\(86\)80033-4](https://doi.org/10.1016/s0174-173x(86)80033-4).
- Ringer S.** Regarding the influence of the organic constituents of the blood on the contractility of the ventricle. *J Physiol* 6: 361–383, 1885. doi:[10.1113/jphysiol.1885.sp000203](https://doi.org/10.1113/jphysiol.1885.sp000203).
- Roccabianca S, Ateshian GA, Humphrey JD.** Biomechanical roles of medial pooling of glycosaminoglycans in thoracic aortic dissection. *Biomech Model Mechanobiol* 13: 13–25, 2014. doi: [10.1007/s10237-013-0482-3](https://doi.org/10.1007/s10237-013-0482-3).
- Rocha AS, Kokko JP.** Sodium chloride and water transport in the medullary thick ascending limb of Henle. Evidence for active chloride transport. *J Clin Invest* 52: 612–623, 1973. doi:[10.1172/JCI107223](https://doi.org/10.1172/JCI107223).
- Salameh E, Morel FB, Zeilani M, Déchelotte P, Marion-Letellier R.** Animal models of undernutrition and enteropathy as tools for assessment of nutritional intervention. *Nutrients* 11: 2233, 2019. doi: [10.3390/nu11092233](https://doi.org/10.3390/nu11092233).
- Schoner W, Scheiner-Bobis G.** Endogenous and exogenous cardiac glycosides: their roles in hypertension, salt metabolism, and cell growth. *Am J Physiol Cell Physiol* 293: C509–536, 2007. doi:[10.1152/ajpcell.00098.2007](https://doi.org/10.1152/ajpcell.00098.2007).
- Schoner W.** Endogenous cardiac glycosides, a new class of steroid hormones. *Eur J Biochem* 269: 2440–2448, 2002. doi:[10.1046/j.1432-1033.2002.02911.x](https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2002.02911.x).
- Schönfeld W, Weiland J, Lindig C, Masnyk M, Kabat MM, Kurek A et al.** The lead structure in cardiac glycosides is 5 beta, 14 beta-androstane-3 beta 14-diol. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 329: 414–426, 1985. doi: [10.1007/BF00496377](https://doi.org/10.1007/BF00496377).
- Schwartz MW, Woods SC, Porte D, Seeley RJ, Baskin DG.** Central nervous system control of food intake. *Nature* 404: 661–671, 2000. doi:[10.1038/35007534](https://doi.org/10.1038/35007534).

- Silva PA, Monnerat-Cahli G, Pereira-Acácio A, Luzardo R, Sampaio LS, Luna-Leite MA, Lara LS et al.** Mechanisms involving Ang II and MAPK/ERK1/2 signaling pathways underlie cardiac and renal alterations during chronic undernutrition. *PLoS One* 9: e100410, 2014a. doi: [10.1371/journal.pone.0100410](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100410).
- Silva PA, Muzi-Filho H, Pereira-Acácio A, Dias J, Martins JFS, Landim-Vieira M et al.** Altered signaling pathways linked to angiotensin II underpin the upregulation of renal Na⁺-ATPase in chronically undernourished rats. *Biochim Biophys Acta* 1842: 2357–2366, 2014b. doi: [10.1016/j.bbadis.2014.09.017](https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.09.017).
- Simonini M, Casanova P, Citterio L, Messaggio E, Lanzani C, Manunta P.** Endogenous ouabain and related genes in the transition from hypertension to renal diseases. *Int J Mol Sci* 19: 1948, 2018. doi: [10.3390/ijms19071948](https://doi.org/10.3390/ijms19071948).
- Sociedade Brasileira de Pediatria.** A desnutrição infantil voltou? - Disponível em https://www.sbp.com.br/fileadmin/user_upload/23785a-NA_A_Desnutricao_Infantil_Voltou.pdf, 2022. Acesso realizado em 13/06/2023.
- Swinburn BA, Kraak VI, Allender S, Atkins VJ, Baker PI, Bogard JR et al.** The global syndemic of obesity, undernutrition, and climate change: the Lancet Commission report. *Lancet* 393: 791–846, 2019. doi: [10.1016/S0140-6736\(18\)32822-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32822-8).
- Tan B, Nöbauer T, Browne CJ, Nestler EJ, Vaziri A, Friedman JM.** Dynamic processing of hunger and thirst by common mesolimbic neural ensembles. *Proc Natl Acad Sci (USA)* 119: e2211688119, 2022. doi: [10.1073/pnas.2211688119](https://doi.org/10.1073/pnas.2211688119).
- Taussky HH, Shorr E.** A microcolorimetric method for the determination of Inorganic phosphorus. *J Biol Chem* 202: 675–685, 1953.
- Teodósio NR, Lago ES, Romani SA, Guedes RC.** A regional basic diet from northeast Brazil as a dietary model of experimental malnutrition. *Arch Latinoam Nutr* 40: 533–547, 1990.
- Timmermans PB, Duncia JV, Carini DJ, Chiu AT, Wong PC, Wexler RR, Smith RD.** Discovery of losartan, the first angiotensin II receptor antagonist. *J Hum Hypertens* 9 Suppl 5: S3–S18, 1995.
- Titze J, Krause H, Hecht H, Dietsch P, Rittweger J, Lang R, Kirsch KA, Hilgers KF.** Reduced osmotically inactive Na storage capacity and hypertension in the Dahl model. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F134–141, 2002. doi: [10.1152/ajprenal.00323.2001](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00323.2001).

- Titze J, Lang R, Ilies C, Schwind KH, Kirsch KA, Dietsch P, Luft FC, Hilgers KF.** Osmotically inactive skin Na⁺ storage in rats. *Am J Physiol Renal Physiol* 285: F1108–1117, 2003. doi:[10.1152/ajprenal.00200.2003](https://doi.org/10.1152/ajprenal.00200.2003).
- Titze J, Dahlmann A, Lerchl K, Kopp C, Rakova N, Schröder A, Luft FC.** Spooky sodium balance. *Kidney Int* 85: 759–767, 2014. doi:[10.1038/ki.2013.367](https://doi.org/10.1038/ki.2013.367).
- Tordoff MG.** Effect of chronic ouabain infusion on food, water, and NaCl intake, body composition, and plasma hormones of Sprague-Dawley rats. *Physiol Behav* 59: 87–92, 1996. doi:[10.1016/0031-9384\(95\)02047-0](https://doi.org/10.1016/0031-9384(95)02047-0).
- Torielli L, Tivodar S, Montella RC, Iacone R, Padoani G, Tarsini P, Russo O et al.** alpha-Adducin mutations increase Na/K pump activity in renal cells by affecting constitutive endocytosis: implications for tubular Na⁺ reabsorption. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: F478–F487, 2008. doi: [10.1152/ajprenal.90226.2008](https://doi.org/10.1152/ajprenal.90226.2008).
- Torres SJ, Nowson CA.** Relationship between stress, eating behavior, and obesity. *Nutrition* 23: 887–894, 2007. doi:[10.1016/j.nut.2007.08.008](https://doi.org/10.1016/j.nut.2007.08.008).
- UNICEF.** Pesquisa sobre os determinantes sociais da desnutrição de crianças indígenas de até 5 anos de idade em oito aldeias inseridas no Distrito Sanitário Especial Indígena (DSEI) Yanomami. – Disponível em <https://www.unicef.org/brazil/media/22536/file/pesquisa-sobre-determinantes-sociais-da-desnutricao-de-criancas-indigenas-de-ate-5-anos-de-idade-em-oito-aldeias-inseridas-no-dsei-yanomami.pdf>, 2020. Acesso realizado em 13/06/2023.
- Van Vliet S, Burd NA, van Loon LJ.** The skeletal muscle anabolic response to plant- versus animal-based protein consumption. *J Nutr* 145: 1981–1991, 2015. doi: [10.3945/jn.114.204305](https://doi.org/10.3945/jn.114.204305).
- Vaughan M, Dube A, Namadingo H, Crampin A, Gondwe L, Kapira G, Mbughi J, Nyasulu M.** Dietary change, noncommunicable disease and local knowledge: results of a small-scale study of the views of older Malawians. *Wellcome Open Res* 3: 158, 2018. doi: [10.12688/wellcomeopenres.14887.1](https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14887.1).
- Vieira-Filho LD, Lara LS, Silva PA, Santos FT, Luzardo R, Oliveira FS, Paixão AD, Vieyra A.** Placental malnutrition changes the regulatory network of renal Na⁺-ATPase in adult rat progeny: Reprogramming by maternal α-tocopherol during lactation. *Arch Biochem Biophys* 505: 91–97, 2011. doi: [10.1016/j.abb.2010.09.025](https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.09.025).

- Vieyra A, Nachbin L, de Dios-Abad E, Goldfeld M, Meyer-Fernandes JR, de Moraes L.** Comparison between calcium transport and adenosine triphosphatase activity in membrane vesicles derived from rabbit kidney proximal tubules. *J Biol Chem* 261: 4247–4255, 1986.
- Vieyra A, Silva PA, Muzi-Filho H, Dick CF, Araujo-dos-Santos AL, Dias J et al.** The role of the second Na⁺ pump in mammals and parasites. In *Regulation of Membrane Na⁺-K⁺ ATPase*, Chakraborti, S., Dhalla, N.S., Eds., Springer International Publishing: Cham, pp. 93–112, 2016. ISBN 978-3-319-24750-2.
- Viollet B, Foretz M, Guigas B, Horman S, Dentin R, Bertrand L, Hue L, Andreelli F.** Activation of AMP-activated protein kinase in the liver: a new strategy for the management of metabolic hepatic disorders. *J Physiol* 574: 41–53, 2006. doi:[10.1113/jphysiol.2006.108506](https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.108506).
- Wenceslau CF, Rossoni LV.** Rostafuroxin ameliorates endothelial dysfunction and oxidative stress in resistance arteries from deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive rats: the role of Na⁺K⁺-ATPase/CSRC Pathway. *J Hypertens* 32: 542–554, 2014. doi:[10.1097/HJH.000000000000059](https://doi.org/10.1097/HJH.000000000000059).
- Whittembury G, Proverbio F.** Two modes of Na extrusion in cells from guinea pig kidney cortex slices. *Pflügers Arch* 316: 1–25, 1970. doi:[10.1007/BF00587893](https://doi.org/10.1007/BF00587893).
- World Health Organization (WHO, 2021)** – Disponível em <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malnutrition#:~:text=There%20are%204%20broad%20sub,height%20is%20known%20as%20wasting>. Acesso realizado em 13/06/2023
- Yosten GLC, Samson WK.** Separating Thirst from Hunger. In: De Luca LA Jr, Menani JV, Johnson AK, editors. *Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; 2014.
- Zhubi-Bakija F, Bajraktari G, Bytyçi I, Mikhailidis DP, Henein MY, Latkovskis G, Rexhaj Z, et al.** The impact of type of dietary protein, animal versus vegetable, in modifying cardiometabolic risk factors: A position paper from the International Lipid Expert Panel (ILEP). *Clin Nutr* 40: 255–276, 2021. doi: [10.1016/j.clnu.2020.05.017](https://doi.org/10.1016/j.clnu.2020.05.017).
- Zhuo JL, Li XC.** Proximal nephron. *Compr Physiol* 3: 1079–1123, 2013. doi:[10.1002/cphy.c110061](https://doi.org/10.1002/cphy.c110061).