

**Universidade Federal de São Carlos**

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**PIPGCF UFSCar/UNESP**

**ALINE APARECIDA ZENATTI**

**O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A PALATABILIDADE DO  
SABOR SALGADO EM RATOS COM APETITE AO SÓDIO**

**ARARAQUARA**

**2020**

**Universidade Federal de São Carlos**

**Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”**

**Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas**

**PIPGCF UFSCar/UNESP**

**ALINE APARECIDA ZENATTI**

**O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A PALATABILIDADE DO  
SABOR SALGADO EM RATOS COM APETITE AO SÓDIO**

Dissertação apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas PIPGCF UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientador: Laurival Antonio De Luca Jr

**ARARAQUARA**

**2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

---

Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Aline Aparecida Zenati, realizada em 08/05/2020, com o título: O SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA E A PALATABILIDADE DO SABOR SALGADO EM RATOS COM APETITE AO SÓDIO

Comissão Julgadora:

  
Prof. Dr. Laurival Antonio de Luca Junior (UNESP), participando presencialmente

  
Prof. Dr. André de Souza Mecawi (UNIFESP), participando à distância

  
Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marín (UNESP), participando à distância

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

A Ata de Defesa, assinada pelos membros da Comissão Julgadora, consta no Sistema Eletrônico de Informações da UFSCar (SEI) e na Secretaria do Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais Elmo e Rosana, minhas filhas Maria Eduarda e Maria Fernanda, meu orientador Laurival, meus familiares e amigos por todo apoio e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Elmo e Rosana que sempre apoiaram incondicionalmente minhas escolhas, dando todo suporte, além de toda base e educação familiar.

As minhas filhas, por me permitirem ficar horas longe delas, entenderem, me apoiarem e me incentivarem muito.

Ao professor Dr. Laurival Antonio De Luca Jr, pela pessoa incrível, por toda orientação, confiança, paciência, acolhimento, dedicação e incansável disposição em transmitir seus conhecimentos.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara e do programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos.

Emilson, Diulie, Jéssica de Sá, Juliana Pirola por estarem sempre juntos nessa caminhada, toda amizade, parceria, apoio e companheirismo, desde o começo.

Juliana Possari, Mariana Thiele pela ajuda nos longos experimentos.

À Silas Pereira Barbosa pela paciência, dedicação e todo suporte em todos os momentos.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara Silvana A. D. Malavolta, Carla Molina, Mikail D. dos Santos (*in memoriam*) e Ana V. de Oliveira por todo o suporte.

Aos colegas e amigos do laboratório e do Programa de Pós-graduação em especial Emilson, Jéssica de Sá, Gabriela Lucera, Mariana Lauer, Marcos, Bolival, pelas boas conversas, conselhos, auxílios e por tornarem estes anos de muito trabalho mais fáceis.

À todos aqueles que cruzaram meu caminho e atuaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

Aos sujeitos utilizados nesta pesquisa, sem os quais não seria possível sua realização, meu profundo respeito, agradecimento.

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro e suporte na realização deste trabalho.

*Se alguém te oferecer uma oportunidade incrível, mas  
você não tem certeza de que pode conseguir, diga sim – e depois  
aprenda como fazê-lo! (Richard Branson)*

## RESUMO

O sistema renina-angiotensina (SRA) faz parte do mecanismo de busca e ingestão de NaCl hipertônico em ratos com apetite ao sódio. Aqui, investigamos se o antagonismo do SRA afeta respostas motoras orofaciais hedônicas e aversivas - parâmetros de palatabilidade - à infusão intraoral de NaCl 0,3 M (hNaCl). Além disso, a literatura também sugere que o apetite ao sódio seja em parte consequência de redução de respostas nociceptivas ao NaCl hipertônico, para tanto, investigamos se o captopril, bloqueador da enzima conversora de angiotensina II, inibe o apetite ao sódio acompanhado de alterações nas respostas motoras orofaciais à infusão intraoral de NaCl 0,3 M ou capsaicina que ativa nociceptores. Ratos adultos foram depletados de sódio através de injeção subcutânea de furosemida seguida de remoção de sódio ambiente por 24 h. Losartana (intracerebroventricular, 200 µg/µl), antagonista de receptor AT1 de angiotensina II, aumentou em mais de 50 vezes o registro de respostas motoras orofaciais aversivas ao hNaCl, assim invertendo a relação de respostas hedônicas/aversivas. A losartana também bloqueou, nos mesmos animais, a ingestão de hNaCl durante o teste de apetite ao sódio realizado por duas horas logo em seguida ao registro orofacial. O captopril (intraperitoneal, 30 mg/kg) inibiu por volta de 80% o registro das respostas orofaciais hedônicas ao hNaCl. Logo em seguida, os animais tiveram acesso alternado por 180 minutos entre gaiola-alojamento e gaiola-filmagem para registro respectivamente da ingestão e resposta orofacial ao hNaCl. Os animais que receberam veículo tiveram uma redução das respostas hedônicas ao hNaCl dos 30 minutos em diante, igualando-se ao grupo que recebeu captopril. As respostas aversivas permaneceram inalteradas. O captopril não produziu nenhuma alteração nas respostas orofaciais à capsaicina, mas inibiu de 100 a 70% a ingestão de hNaCl até 180 minutos. Os resultados sugerem uma ação encefálica da angiotensina II tornando o sódio hipertônico mais palatável durante a fase consumatória do apetite ao sódio.

**Palavras-chave:** sabor salgado, reatividade gustatória, comportamento afetivo, balanço hidro-eletrolítico, nocicepção

## ABSTRACT

The renin-angiotensin system (RAS) belongs to mechanisms that control the search and ingestion of hypertonic NaCl in rats with sodium appetite. Here we investigate whether the antagonism of RAS affects hedonic and aversive orofacial motor responses -parameters of palatability - to the intraoral infusion of 0.3 M NaCl (hNaCl). In addition, the literature suggests that sodium appetite is at least in part a consequence of reduced nociception to hypertonic NaCl. Therefore, we investigated whether captopril, a converting enzyme blocker, inhibits sodium appetite followed by alterations in orofacial responses to intraoral infusão to either 0.3 M NaCl or capsaicin, which activates nociception. Adult rats were depleted of sodium by combined injection of furosemide followed by 24 h removal of ambiente sodium. Losartan (intracerebroventricular, 200 µg/µl), AT1 angiotensin II receptor antagonist, produced a 50-fold increase in aversive orofacial motor responses to hNaCl, thereby reciprocating the relation of hedonic/aversive responses. Losartan also blocked hNaCl intake of the same animals during the sodium appetite test performed immediately after the orofacial recordings. Captopril (intraperitoneal, 30 mg/kg) inhibited by 80% the hedonic orofacial responses to hNaCl. Immediately thereafter, the animals had an alternate 180-minute access between home cage and recording cage in order to record respectively hNaCl intake and orofacial responses to hNaCl. Animals that received vehicle had reduced hedonic responses to hNaCl from 30 minutes to 180 minutes, matching the captopril group. Their aversive responses remained the same. Captopril had no effect on orofacial responses to capsaicin, but produced a 100-70% inhibition of hNaCl intake until 180 minutes. The results suggest that angiotensin II acts in the brain increasing the palatability of hypertonic sodium during the consummatory phase of sodium appetite.

**Key words:** salty taste, gustatory reactivity affective behavior, dehydration, hydromineral balance.



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Fotomicrografia de corte transversal de encéfalo de animal representativo do grupo testado mostrando o sítio de injeção no VL (indicado pela seta).....	26
Figura 2: Respostas hedônicas (a esquerda) e respostas aversivas (ao centro) ao teste de reatividade gustatória ao NaCl 0,3 M durante a fase do apetite ao sódio induzido por depleção de sódio; teste do apetite ao sódio mostrando o volume ingerido de NaCl 0,3 M ao final de 2h (a direita) em animais com injeções ICV de losartana ou veículo. Número de animais = 4. Valores são representados como média ± EPM.....	27
Figura 3: Respostas hedônicas (a esquerda) e respostas aversivas (ao centro) ao teste de reatividade gustatória ao NaCl 0,3 M durante a fase do apetite ao sódio induzido por depleção de sódio; teste do apetite ao sódio mostrando o volume ingerido de NaCl 0,3 M ao longo de 3h (a direita) em animais com injeções i.p. de captopril ou veículo. Número de animais = 6. Valores são representados como média ± EPM. ....	29
Figura 4: Respostas hedônicas (a esquerda) e respostas aversivas (ao centro) ao teste de reatividade gustatória a capsaicina 0,25 µM durante a fase do apetite ao sódio induzido por depleção de sódio; teste do apetite ao sódio (TAS) em animais com injeções intraperitoneal de captopril ou veículo (a direita) em animais com injeções i.p. de captopril ou veículo. Número de animais = 9. Valores são representados como média ± EPM.....	30
Figura 5: Ingestão de NaCl 0,3 M e água dos animais que receberam veículo no TAS do Experimento 3 (teste 2) comparada à ingestão de NaCl 0,3 M e água medida no TAS do Experimento 2 (teste 1). Número de animais = 9. Valores são representados como média ± EPM. ....	31

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANG I – angiotensina I;  
ANG II – angiotensina II;  
ANOVA – análise de variância;  
AT1 – receptor de angiotensina do subtipo AT1;  
ECA – enzima conversora de angiotensina;  
EPM – erro padrão da média;  
g – grama(s);  
h – hora(s);  
ICV – intracerebroventricular;  
IO – intraoral;  
i.p. – intraperitoneal;  
kg – quilograma(s);  
M – molar (número de mols/litro);  
mg – miligrama(s);  
min – minutos;  
ml – mililitro(s);  
NaCl – cloreto de sódio;  
s.c. – subcutâneo/subcutaneamente;  
SRA – sistema renina angiotensina;  
TRG – teste de reatividade gustatória;  
TAS – teste de apetite ao sódio;  
VEI – veículo;  
VL – ventrículo lateral;  
 $\mu$ g – micrograma(s);  
 $\mu$ l – microlitro(s);  
 $\mu$ m – micrometro (s);  
 $\mu$ M - micromolar

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	13
2. OBJETIVO .....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS .....	18
3.1. Animais .....	18
3.2. Fármacos utilizados.....	18
3.3. Cirurgia para implante de cânulas .....	18
3.4. Adaptação ao sistema de registro de respostas orofaciais ao sabor .....	20
3.5. Injeção intracerebroventricular (ICV).....	20
3.6. Histologia .....	21
3.7. Estatística.....	21
3.8. Sessão experimental: registro de respostas orofaciais e teste de apetite ao sódio.....	21
3.9. Experimento 1: Respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M em animais com apetite ao sódio tratados com losartana.....	22
3.10. Experimento 2: Respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M em animais com apetite ao sódio tratados com captopril .....	23
3.11. Experimento 3: Respostas orofaciais à capsaicina em animais com apetite ao sódio e tratados com captopril .....	24
4. RESULTADOS .....	26
4.1. Análise histológica .....	26
4.2.Experimento 1: Respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M em animais com apetite ao sódio tratados com losartana.....	27
4.3.Experimento 2: respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M em animais com apetite ao sódio tratados com captopril .....	28
4.4.Experimento 3: respostas orofaciais à capsaicina em animais com apetite ao sódio e tratados com captopril .....	29
5. DISCUSSÃO .....	32
6. CONCLUSÃO .....	36
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	37
8. APÊNDICE.....	41
8.1 A) Esquema da localização do local de implante da cânula intra-oral e B) esquema do aparato experimental para o estudo da palatabilidade (reatividade ao sabor) a soluções infundidas diretamente na cavidade oral (Grill e Berridge, 1985).....	41

8.2. Aparato experimental para o estudo da palatabilidade (TRG) usado em nosso laboratório:	
1. Gaiola-filmagem, 2. Espelho, 3. Filmadora, 4. Bomba de infusão, 5. Polietileno PE-50, 6. Seringa hipodérmica 10 ml. ....	42
8.3. Imagem representativa da posição de implante de cânula intraoral em relação ao crânio do animal: 1. Cateter de polietileno, 2. “stop” de silicone, 3. Conexão de aço inoxidável (23G). A. Arco zigomático, B. Órbita, C. Osso temporal. ....	43
8.4. A. Sistema de agulhas para implante de cânula intraoral: 1. Agulha 23G, 2. Agulha 18G. B. Sistema de agulhas acoplado ao polietileno PE-50 e “stop” de silicone. ....	43
8.5. Sequência de imagens mostrando o implante de cânula intraoral. ....	44
8.6. A. Implante no VL, B. Cânula intraoral, acoplada ao polietileno P-50 (C). ....	49

## 1. INTRODUÇÃO

### *O sistema renina-angiotensina*

O sistema renina-angiotensina (SRA) é um sistema bioquímico em cascata cujo eixo é formado por uma enzima proteolítica, a renina, e um octapeptídeo, a angiotensina II (ANG II) presente em vários tecidos.

O eixo do SRA tem o sangue como substrato típico e sua ativação está amplamente envolvida no controle de diversas funções, especialmente aquelas relacionadas ao sistema cardiovascular, rins e à composição dos compartimentos líquidos corporais (FITZSIMONS, 1998). As células justaglomerulares dos rins secretam a renina do sangue em resposta a uma queda na pressão arterial ou na concentração de sódio dos líquidos corporais. O comando da secreção de renina pelas células justaglomerulares tem origem neural simpática e humoral. O comando humoral provém de células sensíveis ao sódio localizadas na mácula densa renal, do simpático medular adrenal (catecolaminas) e de sinais moleculares de vias inflamatórias (ex: prostaglandinas). A renina circulante cliva o angiotensinogênio, globulina secretada pelo fígado, produzindo o decapeptídeo angiotensina I (ANG I). Este por sua vez é sensível à ação da enzima conversora da angiotensina (ECA), localizada especialmente nos pulmões, também encontrada nos rins e células endoteliais do sistema vascular sistêmico. A ECA cliva a ANG I em um octapeptídeo ativo em vários órgãos-alvo, encéfalo entre eles, denominado ANG II.

Estudos clássicos de Fitzsimons realizados na década de 1960 associando o SRA ao comportamento animal foram os primeiros a demonstrar que a ANG II é um hormônio dipsogênico, além de vasoconstritor e ativador da secreção de aldosterona e vasopressina (FITZSIMONS, 1998). Estas várias ações da ANG II mostram como ela pode atuar no controle amplo da composição e distribuição dos líquidos corporais.

A ANG II produz sede atuando principalmente em seus receptores AT1 presentes em órgãos circunventriculares prosencefálicos, localizados fora da barreira hematoencefálica, tais como órgão subfornical e órgão vasculoso da lâmina terminal (FITZSIMONS, 1998). Ela também pode atuar nos núcleos preoptico mediano, paraventricular hipotalâmico, e do trato solitário, assim como na área postrema, seja reforçando o circuito de sede, seja ativando o simpático ou liberação de vasopressina (ALLEN; MCKINLEY; MENDELSON, 1988; LEWIS; ALLEN; VERBERNE; FIGDOR *et al.*, 1986; MCKINLEY; ALLEN; CLEVERS; PAXINOS *et al.*, 1987).

Além de produzir sede, a ANG II tem efeito facilitador e organizador sobre a produção de apetite ao sódio (DE LUCA; MENANI; JOHNSON, 2014; EPSTEIN, 1991; JOHNSON, 2007). Sua ação nos órgãos circunventriculares da lamina terminal também ativam circuitos neurais que facilitam o animal depletado de sódio a procurar e ingerir sódio.

### *Comportamento motivado e sabor: o apetite ao sódio*

Um comportamento motivado apresenta duas fases (BERRIDGE, 2018). A primeira fase, apetitiva, pode ser ativada por um estímulo interno associado a uma necessidade, falta de nutriente por exemplo. O estímulo interno desencadeia vias aferentes endócrinas, neurais, ou ambas, que por sua vez ativam circuitos neurais que movem o animal a buscar um objeto que satisfaça uma necessidade associada ao estímulo interno. Esta fase de busca pode ser medida, por exemplo, pela rapidez com que um animal atinge o objeto do qual necessita, podendo assim, numa segunda fase, consumir o comportamento. Esta segunda fase, chamada consumatória, pode ser medida pelo desempenho com que o animal executa a consumação (por exemplo, quantidade de alimento ingerido).

Quando associadas ao desempenho, respostas somáticas e viscerais produzidas pela estimulação sensorial originada durante a consumação ajudam a fornecer parâmetros emocionais a respeito do comportamento sendo executado. Por exemplo, podemos avaliar o quanto o sabor de um alimento expressa uma emoção positiva, ou palatabilidade, sem efeitos pós-ingestivos, a partir de padrões motores orofaciais emitidos em resposta a uma diminuta infusão IO de componentes do alimento (BERRIDGE, 2018; SPECTOR, 2015). Vale notar que, equivalentes até certo ponto respectivamente ao “wanting” e “liking” de Berridge, a fase apetitiva-ingestão e expressão de palatabilidade não necessariamente compartilham dos mesmos mecanismos (BERRIDGE, 2018).

A consumação do apetite ao sódio, feita através da ingestão de soluções de sódio por um rato de laboratório, envolve um comportamento seletivo que inicia após um atraso de muitas horas (10-12) em resposta a uma depleção de sódio (BRESLIN; KAPLAN; SPECTOR; ZAMBITO *et al.*, 1993; BRESLIN; SPECTOR; GRILL, 1993; DAVID; MENANI; DE LUCA, 2008; PEREIRA; DAVID; VENDRAMINI; MENANI *et al.*, 2005; STRICKER; GANNON; SMITH, 1992). Além disso, soluções hipertônicas de NaCl que produzem poucas respostas motoras orofaciais hedônicas e muitas respostas aversivas em um animal hidratado, produzem o contrário no mesmo animal quando depletado de sódio. Em outras palavras, animal com apetite ao sódio tem um aumento considerável na relação numérica de respostas hedônicas/aversivas ao NaCl

hipertônico, o qual torna-se então mais “hedônico” ou palatável (BERRIDGE; FLYNN; SCHULKIN; GRILL, 1984); Schulkin 1991).

A produção de busca e ingestão de sódio decorrente da falta de sódio depende de mecanismos hormonais. Reforçando o que falamos acima, a ANG II, tem marcante papel desde a fase perinatal até a adulta para organizar a expressão do apetite ao sódio e ingestão de água (HURLEY; JOHNSON, 2015; MECAWI; MACCHIONE; NUÑEZ; PERILLAN *et al.*, 2015; ZHANG; FAN; XIA; GENG *et al.*, 2011). Ela atua nos órgãos sensoriais circumventriculares localizados na lamina terminal (DE LUCA; MENANI; JOHNSON, 2014) e juntamente com a aldosterona pode ativar circuitos neurais conectando prosencéfalo e rombencéfalo comandando assim a ingestão de sódio (EPSTEIN, 1991; GASPARINI; MELO; NASCIMENTO; ANDRADE-FRANZÉ *et al.*, 2019; JOHNSON, 2007; RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2017). Trabalhos recentes de nosso laboratório mostram que injeção intracerebroventricular (ICV) de losartana, antagonista de receptores AT1 de ANG II, inibe o apetite ao sódio quando este é liberado através da desativação de vias inibitórias pontinas (RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2011; RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2017). Além disso, na fase apetitiva, a angiotensina auxiliada pela aldosterona promove intensa busca de sódio, conforme medida pela velocidade com que um rato percorre uma pista para obter solução hipertônica de NaCl (ZHANG; STELLAR; EPSTEIN, 1984).

Parece-nos incerto, entretanto, o quanto os mecanismos envolvendo a angiotensina seriam responsáveis pelo aumento na palatabilidade do sódio hipertônico durante o apetite ao sódio. Por exemplo, salvo engano, ainda não foi investigado se o antagonismo do sistema renina-angiotensina (SRA) alteraria as respostas motoras orofaciais ao sabor salgado. Não sabemos, portanto, se este tipo de antagonismo interfere com a palatabilidade de uma solução hipertônica de NaCl. Além disso, é possível que, ao menos em parte, a fase consumatória do apetite ao sódio resulte de uma redução na atividade do nervo lingual quando em contato com NaCl hipertônico. O nervo lingual conduz informações nociceptivas para o núcleo sensorial do nervo trigêmeo (CARSTENS; KUENZLER; HANDWERKER, 1998; DUBNER; BENNETT, 1983) e sua atividade eletrofisiológica aumenta linearmente a partir da aplicação de NaCl hipertônico em diferentes concentrações na cavidade oral de ratos anestesiados (KAWAMURA *et al.* 1968). Deste modo, a expressão do apetite ao sódio poderia ser interpretada como resultante da combinação do sabor do sódio com redução do efeito aversivo ou nociceptivo deste íon em concentrações hipertônicas (SIMON; DE ARAUJO; GUTIERREZ; NICOLELIS, 2006), mas não são suficientes para demonstrar um real papel da nocicepção sobre a motivação para o animal ingerir sódio. Assim,

podemos perguntar se a fase consumatória do apetite ao sódio estaria associada a uma redução da nocicepção (mecanismo sensorial ativado através de nociceptores) oral. Uma resposta completa a essa pergunta depende de estudos com efetores somáticos e autonômicos que evidenciem participação da nocicepção oral - e sua redução caso a hipótese esteja correta - no animal com apetite ao sódio (BERRIDGE, 2004).

O componente somático da ingestão de sódio pode ser registrado através de vídeo e posteriormente quantificado conforme padrões comportamentais bem definidos no assim chamado teste de reatividade gustatória ou TRG (GRILL & BERRIDGE, 1985). Tais padrões constituem respostas motoras somáticas orofaciais inatas, ingestivas (hedônicas ou positivas) ou aversivas (negativas), a um sabor ou gosto de uma solução infundida intraoralmente. No TRG, o volume total de infusão não é suficiente para que ocorra ação na parede estomacal ou absorção intestinal, sendo assim evitados efeitos pós-ingestão sobre o comportamento. O rato depletado de sódio apresenta, em relação a um animal hidratado, um reconhecido comportamento de aumento de respostas positivas acompanhado de redução de respostas aversivas ao NaCl hipertônico no TRG (BERRIDGE; FLYNN; SCHULKIN; GRILL, 1984). Além disso, lembramos que soluções hipertônicas de NaCl são voluntariamente ingeridas pelo rato no laboratório (DE LUCA; PEREIRA-DERDERIAN; VENDRAMINI; DAVID *et al.*, 2010; PEREIRA; MENANI; DE LUCA, 2010). Este tipo de ingestão decresce conforme aumenta a hipertonicidade do NaCl, sem, porém, chegar a zero. Aliás, a ingestão voluntária de NaCl hipertônico é também sensibilizada pela ANG II conforme dados de nosso e outros laboratórios (DE LUCA; PEREIRA-DERDERIAN; VENDRAMINI; DAVID *et al.*, 2010; EPSTEIN, 1991; PEREIRA; MENANI; DE LUCA, 2010; PEREIRA-DERDERIAN; VENDRAMINI; MENANI; CHIAVEGATTO *et al.*, 2016).

Através da hipótese de que o sabor do NaCl hipertônico envolve ativação de nociceptores da língua e que a depleção de sódio torna o NaCl hipertônico menos aversivo ou mais palatável, podemos prever que a depleção de sódio deva também influenciar o componente nociceptivo somático do comportamento de ingestão de sódio. Mais especificamente, a depleção de sódio deveria reduzir o efeito aversivo de substâncias algigênicas conforme avaliado através do TRG.

Não sabemos, entretanto, se a depleção de sódio ou o antagonismo do sistema renina-angiotensina altera a nocicepção oral.



## 2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o de investigar se o antagonismo do SRA interfere na palatabilidade do sabor salgado em ratos depletados de sódio. Para tanto, testamos a resposta orofacial ao NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio que receberam injeção ICV de losartana, em dose que bloqueia a ingestão de NaCl 0,3 M. Além disso, investigamos, 1) se a injeção intraperitoneal de captopril, inibidor da enzima conversora, em dose que bloqueia tanto a conversão periférica como encefálica (EVERED; ROBINSON; RICHARDSON, 1980), também altera as respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio, e 2) se as alterações produzidas pelo captopril nessas respostas persistem associadas ao bloqueio da ingestão de NaCl 0,3 M durante o teste de apetite ao sódio.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados ratos adultos Holtzman, provenientes da colônia da UNESP de Araraquara, pesando 290-320 g. Estes foram alojados em gaiolas-alojamento individuais em ambiente com ciclo claro-escuro de 12:12 horas e umidade ( $50 \pm 20\%$ ) e temperatura ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) controladas. Os animais tiveram acesso a ração “ad libitum” e dois bebedouros de polipropileno graduados até 100 ml e com bicos de aço inoxidável, cada um deles contendo água e solução de NaCl 0,3 M. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê Institucional de Cuidados e Uso de Animais (CEUA-FOAr, protocolo n° 42/2017), e seguiram as recomendações do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

#### 3.2. Fármacos utilizados

**Furosemida (5 mg/ml)**, natriurético/diurético (Sigma-Aldrich), diluído em água destilada e NaOH (1M, Synth).

**Losartana potássica**, antagonista do receptor AT1 (Sigma-Aldrich), diluído em solução salina 0,9% estéril e injetado no ventrículo lateral (VL) na dose de 200  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2017).

**Captopril (30 mg/kg/ml)**, bloqueador da enzima conversora de angiotensina (Sigma-Aldrich) diluído em solução salina 0,9% estéril.

**NaCl** (0,3 M, Synth; Brasil) diluído em água destilada.

**Cetamina** (80 mg/kg, Cristália; Brasil) anestésico.

**Xilazina** (7mg/kg, Agener; Brasil) anestésico.

**Antibiótico** (80.000 UI de benzilpenicilina mais 33 mg de estreptomicina, Fort Dodge Saúde Animal Ltda, Brasil).

**Analgésico/anti-inflamatório** (0,03 ml de cetoprofeno a 1%, Mundo Animal, Brasil).

#### 3.3. Cirurgia para implante de cânulas

O implante de uma cânula IO foi realizado mediante procedimentos cirúrgicos aperfeiçoados em nosso laboratório (FERNANDES, 2017). Os animais anestesiados (80 mg/kg de

cetamina mais 7 mg/kg de xilazina 7 mg/kg, i.p.) foram imobilizados pela cabeça posicionada em estereotáxico Kopf. Uma incisão longitudinal feita na pele, seguida de divulsão do tecido subcutâneo, expôs o topo do crânio ao qual, limpo e seco, foram fixados três parafusos em disposição triangular (com cuidado para não obstruir o local onde será implantada a cânula do VL). Em seguida, os animais foram removidos do estereotáxico e colocados em decúbito dorsal. Uma cânula IO (tubo de polietileno PE-50, de aproximadamente 6 cm de comprimento) com uma extremidade flambada foi inserida através da boca. A outra extremidade foi mantida intacta para tanto guiar a cânula através do tecido como também receber uma conexão de aço inox conforme descrito adiante. À extremidade flambada foi fixado transversalmente um “stop” de silicone utilizado em limas endodônticas. Uma agulha de 23G foi fixada a uma agulha de 18G formando um sistema de agulhas para, através de encaixe na extremidade intacta, guiar a cânula. A ponta ativa da agulha de 18G serviu para conduzir a cânula através da boca em direção à musculatura mastigatória, penetrando a mucosa em direção ao espaço entre o osso temporal e o arco zigomático, caudal ao olho, proximal ao osso, até atingir o topo da cabeça do animal. A extremidade flambada da cânula foi então definitivamente posicionada dentro da boca, mantido o “stop” faceando a região dos primeiros molares. O sistema de agulhas na extremidade intacta foi finalmente substituído por uma conexão de aço inoxidável (23 G, 10 mm de comprimento). Tendo retornado o animal ao estereotáxico, a extremidade externa da cânula foi então exteriorizada ao topo do crânio, mantida livre a conexão de aço para posterior acoplamento a sistemas de injeção/infusão durante os experimentos. A ancoragem da cânula foi então realizada através de resina acrílica autopolimerizante aderida aos parafusos atarraxados ao crânio.

No Experimento 1, a etapa de ancoragem foi adiada para permitir a realização do implante de cânula-guia intracerebral, mantidos os animais anestesiados com o crânio imobilizado no estereotáxico. Nivelados lambda e bregma, uma cânula-guia de aço inoxidável foi conduzida até que sua ponta entrasse até 2 mm na parte superior do ventrículo lateral. Coordenadas: 0,3 mm posterior ao bregma, 1,6 mm lateral ao cruzamento da sutura sagital e bregma, e 3,6 mm de profundidade a partir da superfície do crânio.

Em seguida, as duas cânulas foram fixadas ao crânio com resina acrílica dental. Um mandril de aço inoxidável foi utilizado para o preenchimento e fechamento da cânula-guia intracerebral.

Imediatamente após a cirurgia, ainda anestesiados, os animais receberam uma injeção intramuscular de antibiótico (80.000 UI de benzilpenicilina mais 33 mg de estreptomicina) e uma

injeção subcutânea de analgésico/anti-inflamatório (0,03 ml de cetoprofeno a 1%). Uma injeção subcutânea de antibiótico feita na mesma dose foi repetida uma semana mais tarde.

### **3.4. Adaptação ao sistema de registro de respostas orofaciais ao sabor**

A perviedade da cânula IO foi avaliada diariamente desde o primeiro dia pós-cirúrgico até o final dos experimentos. Para tanto, ar foi injetado, ao menos uma vez ao dia, em bolo de 1 ml através de seringa conectada à conexão de aço. Em raras ocasiões constatou-se obstrução da cânula. Nesse caso, a mesma foi inicialmente limpa pela introdução e retirada de uma agulha gengival no terço proximal externo. Em seguida a cânula IO foi enxaguada através de injeção primeiramente de água destilada e depois de ar atravessando todo seu trajeto até a cavidade oral.

Adaptação ao sistema de registro de respostas orofaciais foi realizada durante três dias consecutivos ao dia de cirurgia. Em cada dia, cada animal foi transferido de sua gaiola-alojamento por um período total de 20 min para uma gaiola-filmagem localizada na sala de registros orofaciais. A gaiola-filmagem era de vidro transparente, aberta apenas no topo e apoiada numa base de vidro. Um espelho com inclinação de 45° em relação à base de vidro refletia a imagem da superfície inferior do animal para uma filmadora. A cânula IO foi conectada à bomba de infusão pela conexão de aço através de uma linha de PE50 de aproximadamente 60 cm. A bomba foi ligada após 20 minutos e água destilada passou a ser infundida intraoralmente na razão de 1 ml/minuto durante um período total de um minuto. Logo em seguida cada animal foi transferido de volta para a respectiva gaiola-alojamento.

As sessões experimentais iniciaram depois de pelo menos 4 ou 5 dias de terminada a última sessão de adaptação.

### **3.5. Injeção intracerebroventricular (ICV)**

A injeção ICV foi feita utilizando-se seringa Hamilton de 10 µl (Hamilton, Reno, EUA) conectada por um tubo de polietileno (PE – 10; Clay Adams, Parsippany, EUA) a uma agulha injetora. Os animais foram retirados de suas gaiolas-alojamento, sendo removido o mandril de metal e introduzida a agulha injetora (2 mm mais longa que a cânula-guia) no ventrículo lateral. O volume injetado em bolo foi de 1 µl. Logo em seguida o mandril foi recolocado e os animais retornados para a gaiola-alojamento para aguardar o registro de respostas orofaciais seguido do teste de apetite ao sódio.

### **3.6.Histologia**

Ao final dos experimentos, cada rato portando duas cânulas recebeu uma injeção intracerebral de um microlitro de corante azul de Evans a 2%. Os animais foram então profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg; Cristália) e perfundidos transcardicamente com salina 0,9% seguida por formalina 10%. Os encéfalos foram removidos, fixados em formalina 10%, congelados, cortados em seções de 60  $\mu$ m, corados com corante de Giemsa, e analisados por microscopia de luz para confirmar os locais de injeções. Todos animais utilizados tiveram injeção ICV de corante confirmada.

### **3.7.Estatística**

Foram utilizados para análise apenas os resultados de animais depletados de sódio que, ao receberem injeção de veículo das drogas, responderam de modo típico à infusão IO de NaCl hipertônico (BERRIDGE; FLYNN; SCHULKIN; GRILL, 1984), ou seja, que apresentaram um número de respostas orofaciais hedônicas maior do que aquele de respostas aversivas. Comparações entre as médias entre dois grupos foram realizadas através do teste-t ou, no caso da relação número de respostas hedônicas/aversivas, através do teste de Mann-Whitney (Experimento 1). Análise de variância de dois fatores (tratamento e tempo) foi utilizada para medidas repetidas, seguida do teste de Student-Newman-Keuls (Experimento 2). Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média, exceto no caso da relação número de respostas hedônicas/aversivas representados pela mediana e intervalo interquartil (IIQ). Diferenças foram consideradas significantes para  $p < 0,05$ .

### **3.8.Sessão experimental: registro de respostas orofaciais e teste de apetite ao sódio**

Uma sessão experimental foi definida como sendo uma depleção de sódio seguida do registro de respostas orofaciais do animal depletado de sódio, seguido do registro de ingestão de líquidos (teste de apetite ao sódio).

No dia de uma sessão experimental, 24 horas após o início do protocolo de depleção de sódio (ver Experimento 1 adiante), cada animal foi transferido da gaiola-alojamento para a gaiola-filmagem onde foi estabelecida a conexão da cânula IO com a bomba de infusão. Logo após o acionamento da filmadora (Sony, HDR-PJ 200), uma solução de NaCl 0,3 M passou a ser

infundida intraoralmente na razão de 1 ml/minuto durante um período total de um minuto. A contagem do tempo de infusão iniciou a partir da primeira reação motora orofacial do rato. O registro dos movimentos do animal foi realizado durante todo o período de infusão IO.

Imediatamente após o registro das respostas orofaciais, os animais voltaram para a gaiola-alojamento iniciando o teste de apetite ao sódio. Durante a realização desse teste, os animais tiveram acesso a dois bebedouros de vidro graduados (divisões de 0,1 ml), sendo um com NaCl 0,3 M e outro com água. Ao término do teste, os animais tiveram acesso livre à ração e aos bebedouros de 100 ml contendo NaCl 0,3 M e água até a próxima sessão experimental.

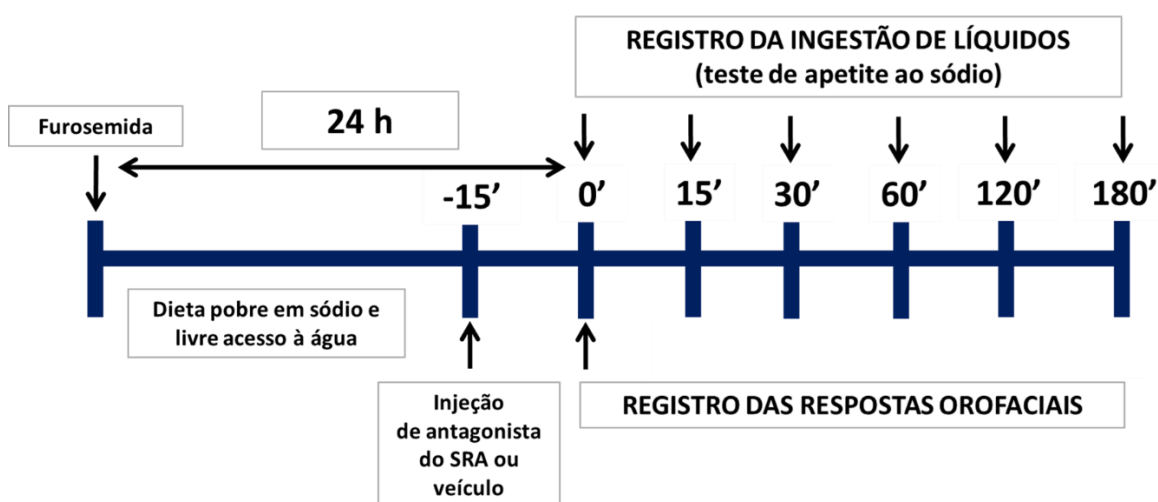
A análise de vídeo foi realizada de modo independente por duas pessoas que ignoravam o teor do tratamento recebido pelos animais. Elas utilizaram uma reprodução lenta de 1/30 a 1/100 da velocidade normal para contagem de cada resposta comportamental. As respostas orofaciais foram definidas de acordo com Berridge (2018) em “hedônicas” - também chamadas de “ingestivas” (GRILL; NORGREN, 1978) - ou “aversivas”. As respostas hedônicas incluíram lambida de pata e protrusão lateral ou medial da língua. Respostas aversivas incluíram abertura extensa da boca com depressão mandibular e retração dos lábios inferiores (“gape”); pronação do corpo roçando o mento no assoalho; limpeza do rosto ou de outras áreas do corpo; agitação dos membros anteriores; sacudida de cabeça; pisadas alternadas das patas anteriores e pisada simultânea das patas para frente e para trás; locomoção rápida ao redor da gaiola.

### **3.9. Experimento 1: Respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M em animais com apetite ao sódio tratados com losartana**

O objetivo deste experimento foi investigar se a injeção ICV de um antagonista de receptor AT1 de ANG II (losartana, 200 µg/µl), altera as respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M de ratos depletados de sódio. A concentração de losartana foi utilizada para bloqueio total do apetite ao sódio e está baseada em investigações anteriores de nosso laboratório em que doses menores inibiram ao redor de 70-80% o apetite ao sódio (RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2011; RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2017; SATO; YADA; DE LUCA, 1996).

No dia seguinte ao período de adaptação, líquidos e ração foram removidos e as gaiolas-alojamento enxaguadas com água. Em seguida, os animais receberam uma injeção subcutânea de furosemida que produz uma perda de ao redor de 2,0 mEq de sódio em aproximadamente duas horas (ROWLAND; FREGLY, 1992; TORDOFF; MCCAUGHEY, 2001). Durante as 24 horas

seguintes os animais tiveram acesso a apenas água e alimento (fubá) com baixo teor (0,001%) de sódio, mas teor normal (0,33%) de potássio. Foi removida a água e ração ao final das 24 horas e os animais ( $n = 06$ ) receberam uma injeção ICV de losartana ( $n = 3$ ) ou respectivo veículo ( $n = 3$ ). Quinze minutos depois, os animais foram transferidos para as gaiolas-filmagem dando início ao registro das respostas orofaciais à infusão IO de NaCl 0,3 M. Ao término dos registros, os animais retornaram para as gaiolas-alojamento para um teste de apetite ao sódio de duas horas. Ao final do teste, os animais ficaram com ração, água e NaCl 0,3 M disponível até a próxima sessão experimental realizada entre 4 e 5 dias depois, quando os animais receberam veículo e losartana de forma contrabalanceada.

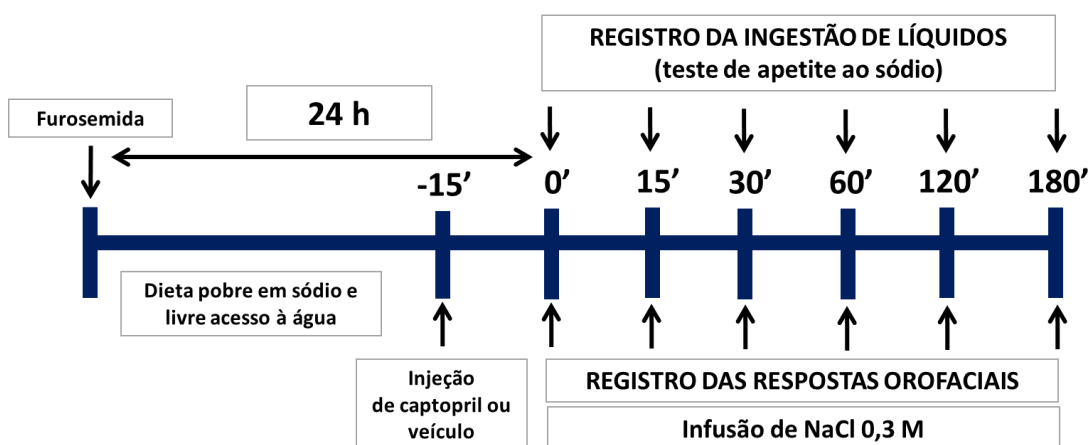


### 3.10. Experimento 2: Respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M em animais com apetite ao sódio tratados com captopril

O objetivo deste experimento foi determinar se a injeção intraperitoneal (i.p.) de um bloqueador da enzima conversora de angiotensina (captopril, 30 mg/kg) altera as respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M de ratos depletados de sódio. Além disso, investigamos se o captopril teria efeito nessas respostas uma vez iniciado o teste do apetite ao sódio. A dose de captopril foi equivalente àquela que bloqueia a conversão da angiotensina tanto na circulação periférica como no encéfalo, e que também bloqueia o apetite ao sódio em nosso laboratório (EVERED; ROBINSON; RICHARDSON, 1980; SATO; YADA; DE LUCA, 1996).

No dia seguinte ao período de adaptação, um novo grupo de animais passou por duas outras sessões experimentais seguindo protocolo semelhante à sessão experimental (figura abaixo). Foi

removida a água e ração ao final das 24 horas de depleção de sódio e então os animais ( $n = 9$ ) receberam uma injeção ip de captopril ( $n = 5$ ) ou respectivo veículo ( $n = 4$ ). Quinze minutos depois, os animais foram transferidos para as gaiolas-filmagem dando início aos registros de respostas orofaciais a serem alternadas com medidas da ingestão de líquidos (teste de apetite ao sódio). O primeiro período de registro de respostas orofaciais foi definido como “instante zero” e ocorreu logo antes de iniciar o teste de apetite ao sódio. Iniciado esse teste nas gaiolas-alojamento, ao final de 15 minutos de livre ingestão de líquidos, os animais foram novamente retornados às gaiolas-filmagem para o próximo período de registro de respostas orofaciais, de onde retornaram mais uma vez para a gaiola-alojamento para o próximo período de ingestão livre, e assim por diante, de modo a se obter medidas das respostas orofaciais alternadas às medidas da ingestão de líquidos aos 15, 30, 60, 120 e 180 minutos. Após os 180 minutos, os animais foram retornados às gaiolas-alojamento onde ficaram com ração, água e NaCl 0,3 M disponível até a próxima sessão experimental realizada entre 4 e 5 dias depois, quando os animais receberam veículo e captopril de forma contrabalanceada.



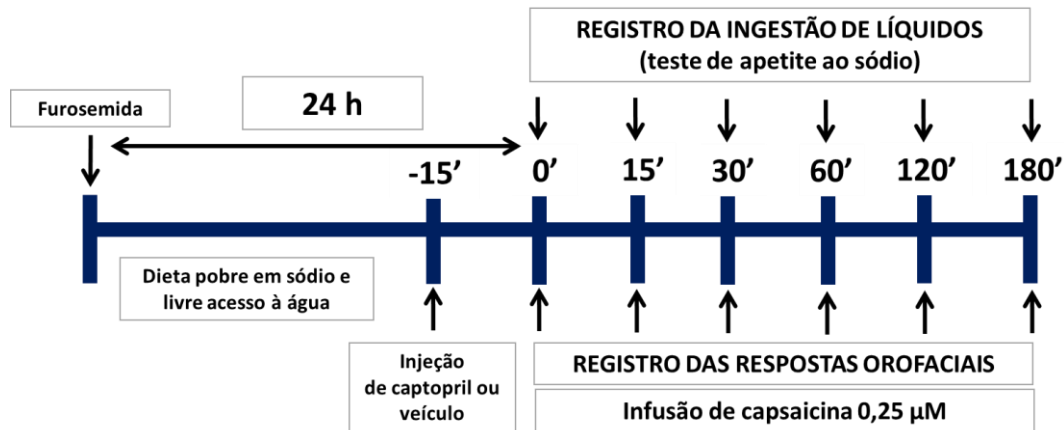
### 3.11. Experimento 3: Respostas orofaciais à capsaicina em animais com apetite ao sódio e tratados com captopril

O objetivo deste experimento foi investigar se o captopril altera as respostas orofaciais à capsaicina de ratos com apetite ao sódio.

Iniciando entre 4 e 5 dias após a última sessão do Experimento 2, os mesmos animais passaram por duas outras sessões experimentais seguindo exatamente o mesmo protocolo exceto



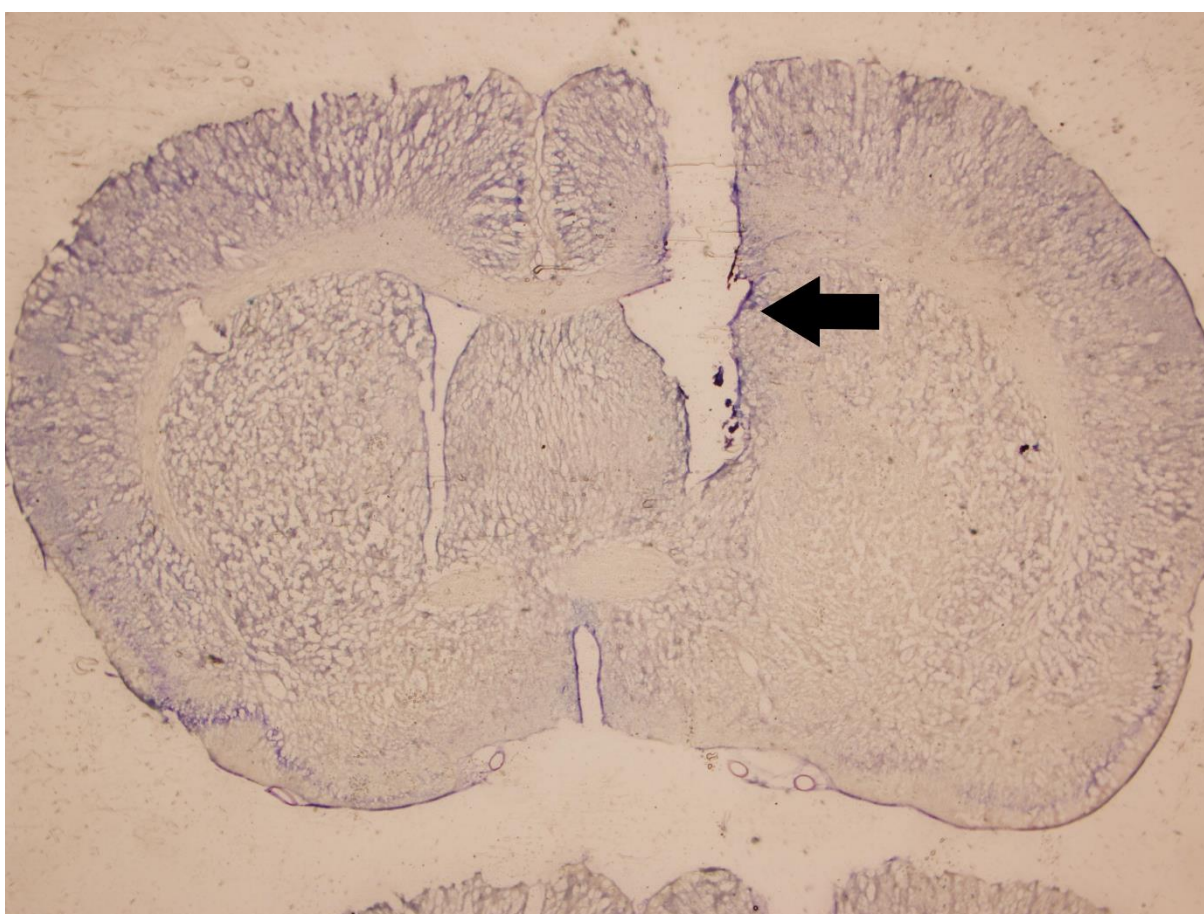
no TRG quando ao invés de NaCl 0,3 M receberam infusão IO de capsaicina 0,25  $\mu\text{M}$ . A concentração de capsaicina deriva de investigações preliminares visando encontrar uma concentração que produzisse efeito aversivo mínimo, semelhante àquele produzido com NaCl 0,3 M em animais hidratados.



## 4. RESULTADOS

### 4.1. Análise histológica

As injeções ICV foram confirmadas em cortes histológicos do encéfalo mostrando o trajeto da cânula em direção ao espaço ventricular (VL), bem como pelo espalhamento de corante neste espaço (Figura 1).



**Figura 1:** Fotomicrografia de corte transversal de encéfalo de animal representativo do grupo testado mostrando o sítio de injeção no VL (indicado pela seta).

#### 4.2. Experimento 1: Respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M em animais com apetite ao sódio tratados com losartana

Foram utilizados para análise, de um total de seis, quatro animais que preencheram o critério de apresentar um número maior de respostas hedônicas do que o número de respostas aversivas à injeção ICV de veículo da losartana.

A injeção ICV de losartana produziu um aumento no número de respostas aversivas à infusão IO de NaCl 0,3 M comparada à injeção ICV de veículo (Figura 2, centro) e inverteu a mediana da relação número de respostas hedônicas/aversivas de 70,5 (IIQ = 347,6) para 0,1 (IIQ = 0,6). Não houve alteração significativa no número de respostas hedônicas ao NaCl 0,3 M (Figura 2, canto esquerdo).

A injeção ICV de losartana bloqueou o apetite ao sódio, inibindo a ingestão de NaCl 0,3 M em mais de 90% comparada à injeção ICV de veículo (Figura 2, canto direito). A ingestão de água no teste de apetite ao sódio foi irrisória conforme esperado e não foi diferente entre os dois grupos ( $0,5 \pm 0,5$  ml/2 h, losartana, e  $2,7 \pm 1,5$  ml/2 h, veículo).

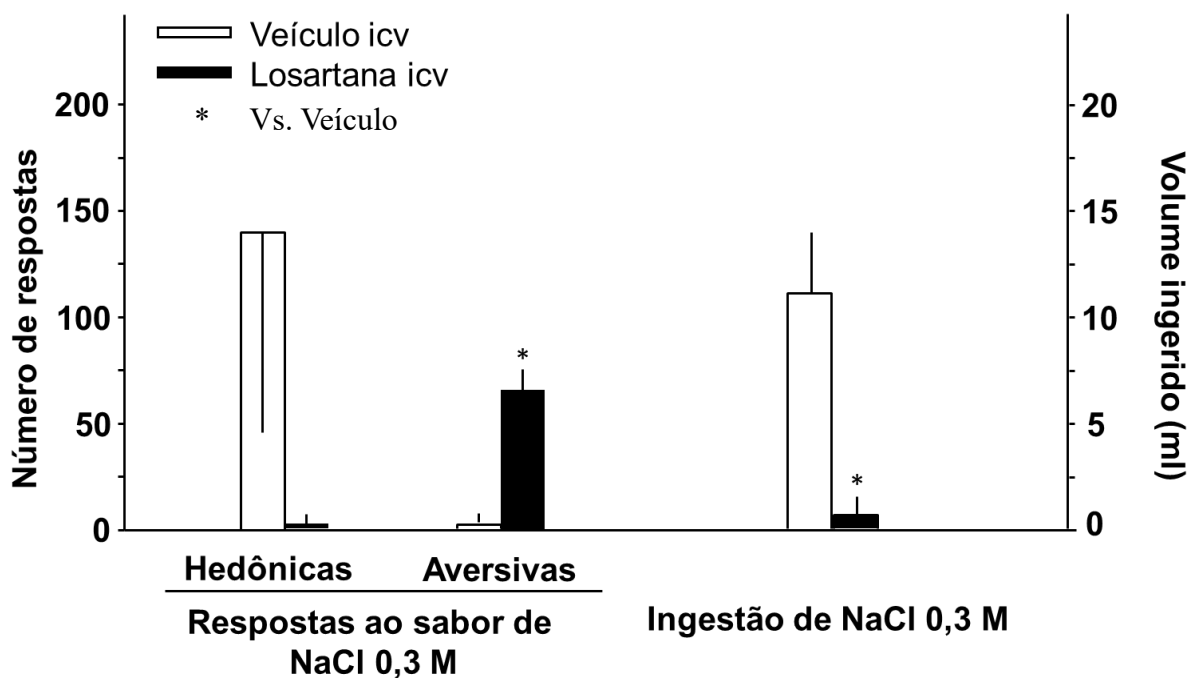


Figura 2: Respostas hedônicas (a esquerda) e respostas aversivas (ao centro) ao teste de reatividade gustatória ao NaCl 0,3 M durante a fase do apetite ao sódio induzido por

**depleção de sódio; teste do apetite ao sódio mostrando o volume ingerido de NaCl 0,3 M ao final de 2h (a direita) em animais com injeções ICV de losartana ou veículo. Número de animais = 4. Valores são representados como média  $\pm$  EPM.**

#### **4.3.Experimento 2: respostas orofaciais ao NaCl 0,3 M em animais com apetite ao sódio tratados com captopril**

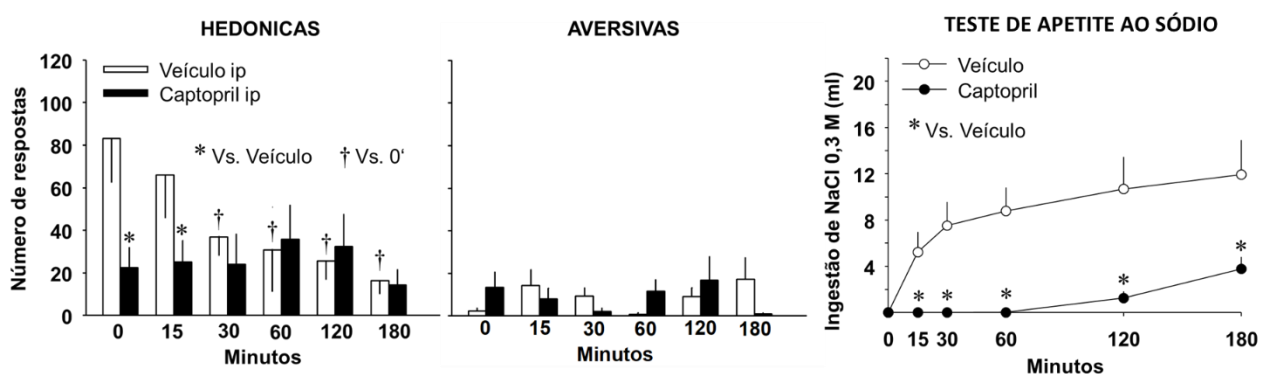
Foram utilizados para análise, de um total de nove, seis animais que preencheram o critério de apresentar um número maior de respostas hedônicas do que o número de respostas aversivas à injeção i.p. de veículo do captopril.

A injeção i.p. de captopril reduziu em 80% o número de respostas hedônicas à infusão IO de NaCl 0,3 M comparada à injeção i.p. de veículo no instante “zero” dos registros de atividade motora orofacial, ou seja, antes do início do teste de apetite ao sódio (Figura 3, canto esquerdo), sem afetar o número de respostas aversivas neste instante (Figura 3, centro).

O número de respostas hedônicas permaneceu o mesmo dentro do grupo que recebeu captopril do início ao final do teste de apetite ao sódio (Figura 3, canto esquerdo). Dentro do grupo que recebeu veículo, entretanto, o número de respostas hedônicas decaiu entre 60 e 80% no período compreendido pelos instantes de 30 a 180 minutos. Neste último período, os dois grupos tiveram número semelhante de respostas hedônicas. Em todos os instantes, de zero a 180 minutos, o número de respostas aversivas não foi alterado em nenhum dos dois grupos (Figura 3, centro).

A ANOVA sobre medidas repetidas de respostas hedônicas mostrou que houve interação entre os fatores tempo e tratamento [ $F(5,25) = 3,3; p < 0,05$ ] e efeito de tempo [ $F(5,25) = 3,5; p < 0,05$ ]. Não houve nenhuma interação ou efeito significativo de tratamento ou tempo sobre medidas repetidas de respostas aversivas.

O captopril suprimiu totalmente a ingestão de NaCl 0,3 M comparado ao veículo durante os primeiros 60 minutos do teste de apetite ao sódio, inibindo a mesma em até 70% aos 120 e 180 minutos (Figura 3, canto direito). Houve efeito significativo de tratamento [ $F(1,5) = 8,8; p < 0,05$ ]. Novamente, os animais ingeriram quantidades irrisórias de água durante o teste de apetite ao sódio ( $1,0 \pm 0,5$  ml/180 min, captopril, e  $5,0 \pm 4,0$  ml/180 min, veículo).



**Figura 3: Respostas hedônicas (a esquerda) e respostas aversivas (ao centro) ao teste de reatividade gustatória ao NaCl 0,3 M durante a fase do apetite ao sódio induzido por depleção de sódio; teste do apetite ao sódio mostrando o volume ingerido de NaCl 0,3 M ao longo de 3h (a direita) em animais com injeções i.p. de captopril ou veículo. Número de animais = 6. Valores são representados como média  $\pm$  EPM.**

#### 4.4. Experimento 3: respostas orofaciais à capsaicina em animais com apetite ao sódio e tratados com captopril

Do mesmo modo que no Experimento 2, os animais que receberam veículo ingeriram NaCl 0,3 M em quantidades que correspondem àquela prevista para produção de apetite ao sódio (Figura 4, à direita).

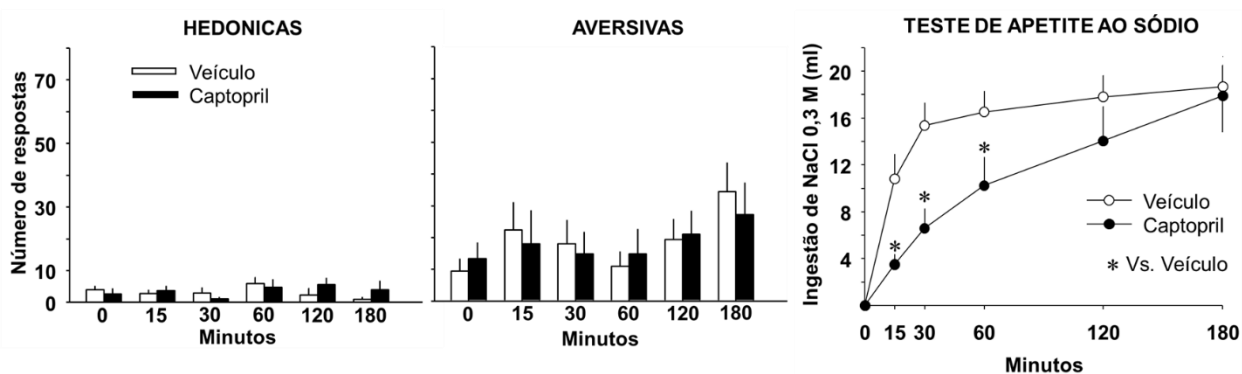
Durante o TAS, o captopril inibiu apenas parcialmente a ingestão de NaCl 0,3 M comparado ao veículo durante os primeiros 60 minutos, deixando de ter efeito aos 120 e 180 minutos (Figura 4, à direita). Houve efeito significativo de tratamento [ $F(1,8) = 5,8$ ;  $p < 0,05$ ], tempo [ $F(4,32) = 57,2$ ;  $p < 0,05$ ] e interação entre tratamento e tempo [ $F(4,32) = 3,7$ ;  $p < 0,05$ ].

Os animais novamente apresentaram irrisória ingestão de água durante todo o TAS sem nenhum efeito do captopril. Não houve efeito de tratamento [ $F(1,8) = 0,0$ ;  $p = 0,984$ ], houve efeito de tempo [ $F(4,32) = 4,4$ ;  $p < 0,05$ ], e não houve interação entre tratamento e tempo [ $F(4,32) = 0,5$ ;  $p = 0,719$ ].

Teste de reatividade gustatória à capsaicina

Durante o TRG, tanto os animais que receberam veículo como aqueles que receberam captopril apresentaram as mesmas respostas orofaciais hedônicas à capsaicina desde o instante zero até os 180 minutos (Figura 4, à esquerda). Não houve efeito nem de tratamento [ $F(1,8) = 0,4$ ;  $p = 0,541$ ], nem de tempo [ $F(5,40) = 1,1$ ;  $p = 0,393$ ], e não houve interação entre tratamento e tempo [ $F(5,40) = 0,9$ ;  $p = 0,511$ ].

As respostas orofaciais aversivas à capsaicina aumentaram significativamente no grupo veículo ao final do TRG (Figura 4, centro). Houve efeito de tempo [ $F(5,40) = 2,6$ ;  $p < 0,05$ ]. Não houve efeito de tratamento [ $F(1,8) = 0,0$ ;  $p = 0,901$ ] e nem interação entre tratamento e tempo [ $F(5,40) = 0,4$ ;  $p = 0,826$ ].

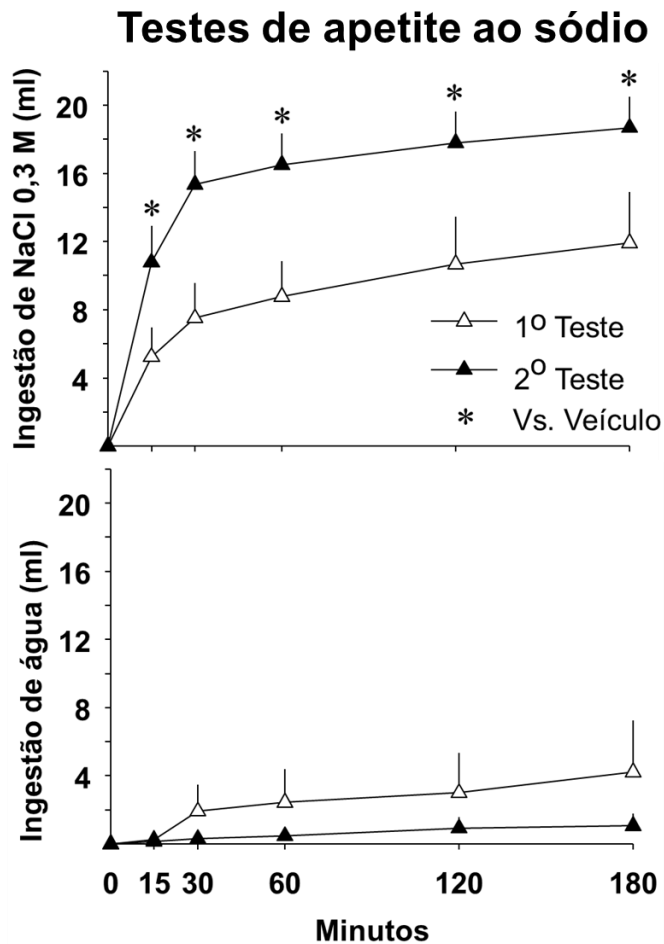


**Figura 4: Respostas hedônicas (a esquerda) e respostas aversivas (ao centro) ao teste de reatividade gustatória a capsaicina 0,25  $\mu$ M durante a fase do apetite ao sódio induzido por depleção de sódio; teste do apetite ao sódio (TAS) em animais com injeções intraperitoneal de captopril ou veículo (a direita) em animais com injeções i.p. de captopril ou veículo. Número de animais = 9. Valores são representados como média  $\pm$  EPM.**

#### Sensibilização do apetite ao sódio

A ingestão de NaCl 0,3 M dos animais que receberam veículo foi significativamente aumentada no TAS do Experimento 3 (teste 2) comparada à ingestão de NaCl 0,3 M medida no TAS do Experimento 2 (teste 1) (Figura 5, superior). Houve efeito significativo de teste [ $F(1,8) = 9,4$ ;  $p < 0,05$ ] e de tempo [ $F(4,32) = 28,3$ ];  $p < 0,05$ ], mas não houve interação entre teste e tempo [ $F(4,32) = 0,7$ ;  $p = 0,581$ ].

A repetição do teste não teve efeito na ingestão de água dos animais que receberam veículo (Figura 5, inferior). Não houve efeito nem de teste [ $F(1,8) = 1,1; p = 0,321$ ], nem de tempo [ $F(4,32) = 2,4; p = 0,068$ ], e não houve interação entre teste e tempo [ $F(4,32) = 1,1; p = 0,388$ ].



**Figura 5: Ingestão de NaCl 0,3 M e água dos animais que receberam veículo no TAS do Experimento 3 (teste 2) comparada à ingestão de NaCl 0,3 M e água medida no TAS do Experimento 2 (teste 1). Número de animais = 9. Valores são representados como média  $\pm$  EPM.**

## 5. DISCUSSÃO

O efeito que o antagonismo do SRA teve sobre o padrão de respostas orofaciais dos animais depletados de sódio sugere que a produção de ANG II, possivelmente atuando no encéfalo seja importante para a palatabilidade aumentada ao sabor salgado durante o apetite ao sódio. Os resultados mostram que o antagonismo do SRA alterou o padrão de respostas orofaciais ao sabor do NaCl 0,3 M infundido intraoralmente em ratos com apetite ao sódio. A alteração correspondeu a uma redução no número de respostas hedônicas e aumento no número de respostas aversivas à infusão IO de diminutas quantidades de NaCl 0,3 M. Conforme tem sido mostrado desde os estudos pioneiros de reatividade ao sabor salgado (BERRIDGE; FLYNN; SCHULKIN; GRILL, 1984; BRESLIN; KAPLAN; SPECTOR; ZAMBITO *et al.*, 1993; SCHULKIN, 1991), o aumento de palatabilidade do sódio é importante para que o animal depletado de sódio ingira o necessário para repor suas perdas e restaurar seu balanço hidro-salino. No presente trabalho, o antagonismo do SRA parece ter interferido nesse aumento de palatabilidade.

A via de injeção do antagonista de receptor AT1 de ANG II, losartana, e a dose do bloqueador de enzima conversora, captopril, sugere que nos animais controle ocorreu um aumento da produção endógena deste peptídeo e sua atuação no encéfalo influenciando as respostas orofaciais ao sabor do NaCl 0,3 M. A dose de losartana que foi injetada ICV é o dobro daquela com a qual temos produzido aproximadamente 70-80% de inibição do apetite ao sódio (RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2011; SATO; YADA; DE LUCA, 1996). O bloqueio da ingestão de NaCl 0,3 M que aqui obtivemos é consistente com o emprego de uma dose maior. Experimentos anteriores de nosso laboratório também sugerem que os efeitos da losartana ICV com doses nessa ordem de magnitude não se devem a vazamento para circulação periférica (DE LUCA; BARBOSA; SUGAWARA; MENANI, 1996; RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2011; RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2017). Ainda, a dose de captopril que utilizamos é suficiente para bloquear os efeitos da enzima conversora de angiotensina tanto periféricamente como no sistema nervoso central e também inibir o apetite ao sódio em outros modelos experimentais (SATO; YADA; DE LUCA, 1996; SCHIFFRIN; GENEST, 1982). É importante também lembrar que doses menores de captopril parecem bloquear a enzima conversora apenas periféricamente devido a restrições da barreira hematoencefálica. Esse efeito compartimentalizado de doses baixas de captopril, ao invés de bloquear a produção de apetite ao sódio, pelo contrário, permite que seja consideravelmente reduzida a latência para que ocorra a expressão deste apetite em animais hipovolêmicos devido a maciça conversão de ANG I em ANG II no encéfalo (EVERED; ROBINSON; RICHARDSON,



1980; SCHIFFRIN; GENEST, 1982; THUNHORST; JOHNSON, 1994; THUNHORST; MORRIS; JOHNSON, 1994). Não podemos descartar totalmente que o captopril tenha interferido na produção periférica local de ANG II, a qual pode agir em canais ENaC localizados nas terminações periféricas das fibras da corda do tímpano, nervo sensível à depleção de sódio (GARCIA; CURTIS; CONTRERAS, 2008; SHIGEMURA; IWATA; YASUMATSU; OHKURI *et al.*, 2013). Entretanto, os resultados são mais consistentes com o antagonismo do SRA interferindo principalmente nos mecanismos de produção de ANG II quando associados à atuação clássica desse peptídeo em receptores AT1 encefálicos para produzir apetite ao sódio. Possivelmente, foram esses mecanismos que atuaram para desencadear a alta relação de respostas hedônicas versus aversivas nos animais controle que receberam veículo dos antagonistas do SRA.

A ação encefálica da ANG II para ativar o apetite ao sódio ocorre primariamente na lamina terminal (DE LUCA; MENANI; JOHNSON, 2014). Ela aciona um complexo circuito que integra o eixo formado pelo tronco encefálico e prosencéfalo, particularmente aquele envolvendo a amígdala central (ANDRADE-FRANZÉ; GASPARINI; DE LUCA; DE PAULA *et al.*, 2017; GALAVERNA; DE LUCA; SCHULKIN; YAO *et al.*, 1992; JOHNSON, 2007; RONCARI; DAVID; DE PAULA; COLOMBARI *et al.*, 2017). Entretanto, apesar da notória importância dos circuitos amigdalares, tanto para o apetite ao sódio como para vias ascendentes gustatórias e expressões emocionais (ANDRADE-FRANZÉ; GASPARINI; DE LUCA; DE PAULA *et al.*, 2017; BERRIDGE, 2018; CANTERAS; MOTA-ORTIZ; MOTTA, 2012; GALAVERNA; DE LUCA; SCHULKIN; YAO *et al.*, 1992; SPECTOR; TRAVERS, 2005), ratos com lesão do núcleo central da amígdala apresentam um padrão inalterado de respostas orofaciais à infusão IO de NaCl hipertônico (GALAVERNA; SEELEY; BERRIDGE; GRILL *et al.*, 1993). É possível, portanto, que partindo da lamina terminal haja uma divergência entre os circuitos neurais que promovem a ingestão de sódio e aqueles que determinam a expressão orofacial ao sabor salgado. A busca por conexões funcionais entre projeções angiotensinérgicas da lamina terminal e áreas romboencefálicas (PORCARI; ARAUJO; URZEDO-RODRIGUES; DE LUCA *et al.*, 2019), assim como vias dopaminérgicas que controlam “wanting” e “liking” associados ao apetite ao sódio (FORTIN; ROITMAN, 2018; VERHAREN; ROELOFS; MENTING-HENRY; LUIJENDIJK *et al.*, 2019), poderão contribuir para se avaliar esta possibilidade futuramente.

O decurso temporal das respostas orofaciais dos animais controle durante o teste de apetite ao sódio, ilustrado na Fig. 3, ocorreu de modo consistente com a produção de saciedade do apetite ao sódio. O número de respostas hedônicas diminuiu consideravelmente por volta de 50% entre 15 e 30 minutos do teste de apetite ao sódio, período em que ocorreu a ingestão de 50 a 60% do

total de NaCl 0,3 M ingerido durante todo o teste. O número de respostas hedônicas continuou caindo acompanhando a redução na ingestão de NaCl 0,3 M até o final do teste aos 180 minutos quando se tornou indistinto do número de respostas aversivas. Uma combinação de efeitos pré- e pós-ingestivos explicam a saciedade durante o teste de apetite ao sódio (FLYNN; CULVER; NEWTON, 2003; ROWLAND; FREGLY, 1992; STRICKER; HOFFMANN, 2006; TORDOFF; MCCAUGHEY, 2001) e os mesmos efeitos podem em princípio explicar também a tendência aqui observada das respostas orofaciais se aproximando daquelas típicas de animais hidratados ou repletos de sódio conforme relatos da literatura (BERRIDGE; FLYNN; SCHULKIN; GRILL, 1984; SCHULKIN, 1991). Interessante notar a semelhança entre as respostas orofaciais dos grupos veículo e captopril conforme o primeiro foi saciando o apetite ao sódio. Alterações hormonais sistêmicas podem ocorrer dentro da primeira hora da ingestão de sódio envolvendo redução da atividade de renina plasmática e redução da secreção de aldosterona (ROWLAND; FREGLY, 1992; TORDOFF; MCCAUGHEY, 2001). O captopril poderia ter atuado simulando um decréscimo na produção de ANG II que ocorreria naturalmente no animal que recebeu veículo com consequente redução do valor hedônico do sabor salgado.

O captopril parece ter alterado o padrão temporal das respostas orofaciais à infusão IO de capsaicina durante o TRG em ratos com apetite ao sódio. As respostas hedônicas no TRG permaneceram as mesmas comparadas ao grupo veículo no instante zero, isto é, quando os animais ainda não tiveram a oportunidade de expressar o apetite ao sódio, seja durante a execução do TAS. Entretanto, as respostas aversivas à capsaicina aumentaram no grupo veículo em relação ao instante zero com o avanço do TRG. É notável que as respostas aversivas dos dois grupos sejam semelhantes graficamente. Assim, o atraso para os animais iniciarem a ingestão de NaCl 0,3 M no grupo captopril pode ter sido a causa das respostas aversivas à capsaicina não terem aumentado significativamente neste grupo ao final do TRG (Fig. 4, à esquerda e centro).

As respostas dos animais à capsaicina nos levam assim a algumas considerações interessantes. Se por um lado deveríamos esperar aumento de respostas hedônicas à capsaicina em animais com apetite ao sódio, o que não aconteceu, por outro lado seria de esperar que as respostas aversivas à capsaicina aumentassem conforme o animal saciasse o apetite ao sódio, conforme aconteceu e está mostrado na Fig. 4 (centro). Nesse sentido poderíamos dizer que os efeitos do sabor salgado e o da nocicepção convergiram. Mais experimentos controlando a concentração de capsaicina e os efeitos da mesma em animais depletados de sódio ainda devem ser realizados para uma conclusão definitiva sobre o papel da nocicepção nas respostas orofaciais ao sabor salgado.

A diferença entre os experimentos 2 e 3 no que se refere ao efeito do captopril na ingestão de NaCl 0,3 M sugere que o efeito deste fármaco parece ter diminuído conforme os animais foram submetidos aos repetidos TAS. É possível que a potência do captopril tenha sido na verdade a mesma, mas que ela tenha sido exercida em animais que estavam com o apetite ao sódio sensibilizado, conforme sugere a Fig. 5, em acordo com o que prediz a literatura (SAKAI; FINE; EPSTEIN; FRANKMANN, 1987).

Nossos resultados sugerem que a ANG II participa dos mecanismos do apetite ao sódio, não apenas ativando a busca e a ingestão de sódio, conforme já descrito na literatura, mas também aumentando o componente afetivo ou emocional positivo deste apetite expresso por reações motoras orofaciais ao sabor salgado durante a fase consumatória.

## 6. CONCLUSÃO

Em resumo, os resultados do presente estudo mostram que: A) o bloqueio dos receptores AT1 de ANG II em áreas prosencefálicas aumentou o número de respostas aversivas em ratos depletados de sódio na fase de apetite ao sódio, bem como inibiu a ingestão de sódio, B) injeções sistêmica de captopril produziu uma diminuição no número de respostas hedônicas e uma inibição na ingestão de sódio em ratos depletados de sódio.

Os dados sugerem que a produção de ANG II seja importante para a palatabilidade aumentada do sabor salgado durante o apetite ao sódio, visto os efeitos que o antagonismo do SRA teve sobre o padrão de respostas orofaciais dos animais depletados de sódio, pois o mesmo foi alterado. Além disso, sugerem uma ação encefálica da ANG II tornando o sódio hipertônico mais palatável durante a fase consumatória do apetite ao sódio.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, A. M.; MCKINLEY, M. J.; MENDELSON, F. A. O. Comparative neuroanatomy of angiotensin receptor localization in the mammalian hypothalamus. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.**, 15, p. 137-145, 1988 1988.

ANDRADE-FRANZÉ, G. M.; GASPARINI, S.; DE LUCA, L. A.; DE PAULA, P. M. *et al.* Lateral parabrachial nucleus and opioid mechanisms of the central nucleus of the amygdala in the control of sodium intake. **Behav Brain Res**, 316, p. 11-17, 01 2017.

BERRIDGE, K. C. Motivation concepts in behavioral neuroscience. **Physiol Behav**, 81, n. 2, p. 179-209, Apr 2004.

BERRIDGE, K. C. Evolving Concepts of Emotion and Motivation. **Front Psychol**, 9, p. 1647, 2018.

BERRIDGE, K. C.; FLYNN, F. W.; SCHULKIN, J.; GRILL, H. J. Sodium depletion enhances salt palatability in rats. **Behav Neurosci**, 98, n. 4, p. 652-660, Aug 1984.

BRESLIN, P. A.; KAPLAN, J. M.; SPECTOR, A. C.; ZAMBITO, C. M. *et al.* Lick rate analysis of sodium taste-state combinations. **Am J Physiol**, 264, n. 2 Pt 2, p. R312-318, Feb 1993.

BRESLIN, P. A.; SPECTOR, A. C.; GRILL, H. J. Chorda tympani section decreases the cation specificity of depletion-induced sodium appetite in rats. **Am J Physiol**, 264, n. 2 Pt 2, p. R319-323, Feb 1993.

CANTERAS, N. S.; MOTA-ORTIZ, S. R.; MOTTA, S. C. What ethologically based models have taught us about the neural systems underlying fear and anxiety. **Braz J Med Biol Res**, 45, n. 4, p. 321-327, Apr 2012.

CARSTENS, E.; KUENZLER, N.; HANDWERKER, H. O. Activation of neurons in rat trigeminal subnucleus caudalis by different irritant chemicals applied to oral or ocular mucosa. **J Neurophysiol**, 80, n. 2, p. 465-492, Aug 1998.

DAVID, R. B.; MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A. Central angiotensin II induces sodium bicarbonate intake in the rat. **Appetite**, 51, n. 1, p. 82-89, Jul 2008.

DE LUCA, L. A.; BARBOSA, S. P.; SUGAWARA, A. M.; MENANI, J. V. Effects of intracerebroventricular injections of losartan or PD123319 on arterial pressure and heart rate of sodium replete and sodium deplete rats. **Regul Pept**, 66, n. 1-2, p. 31-35, Oct 1996.

DE LUCA, L. A.; MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration. *In*, 2014.

DE LUCA, L. A.; PEREIRA-DERDERIAN, D. T.; VENDRAMINI, R. C.; DAVID, R. B. *et al.* Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiol Behav**, 100, n. 5, p. 535-544, Jul 2010.

- DUBNER, R.; BENNETT, G. J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. **Annu Rev Neurosci**, 6, p. 381-418, 1983.
- EPSTEIN, A. N. Neurohormonal control of salt intake in the rat. **Brain Res Bull**, 27, n. 3-4, p. 315-320, 1991 Sep-Oct 1991.
- EVERED, M. D.; ROBINSON, M. M.; RICHARDSON, M. A. Captopril given intracerebroventricularly, subcutaneously or by gavage inhibits angiotensin-converting enzyme activity in the rat brain. **Eur J Pharmacol**, 68, n. 4, p. 443-449, Dec 1980.
- FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, 78, n. 3, p. 583-686, Jul 1998.
- FLYNN, F. W.; CULVER, B.; NEWTON, S. V. Salt intake by normotensive and spontaneously hypertensive rats: two-bottle and lick rate analyses. **Physiol Behav**, 78, n. 4-5, p. 689-696, Apr 2003.
- FORTIN, S. M.; ROITMAN, M. F. Challenges to Body Fluid Homeostasis Differentially Recruit Phasic Dopamine Signaling in a Taste-Selective Manner. **J Neurosci**, 38, n. 31, p. 6841-6853, 08 2018.
- GALAVERNA, O.; DE LUCA, L. A.; SCHULKIN, J.; YAO, S. Z. *et al.* Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res Bull**, 28, n. 1, p. 89-98, Jan 1992.
- GALAVERNA, O. G.; SEELEY, R. J.; BERRIDGE, K. C.; GRILL, H. J. *et al.* Lesions of the central nucleus of the amygdala. I: Effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. **Behav Brain Res**, 59, n. 1-2, p. 11-17, Dec 31 1993.
- GARCIA, J. M.; CURTIS, K. S.; CONTRERAS, R. J. Behavioral and electrophysiological taste responses change after brief or prolonged dietary sodium deprivation. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 295, n. 6, p. R1754-1761, Dec 2008.
- GASPARINI, S.; MELO, M. R.; NASCIMENTO, P. A.; ANDRADE-FRANZÉ, G. M. F. *et al.* Interaction of central angiotensin II and aldosterone on sodium intake and blood pressure. **Brain Res**, 1720, p. 146299, Oct 2019.
- GRILL, H. J.; NORNGREN, R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. **Brain Res**, 143, n. 2, p. 263-279, Mar 24 1978.
- HURLEY, S. W.; JOHNSON, A. K. The biopsychology of salt hunger and sodium deficiency. **Pflugers Arch**, 467, n. 3, p. 445-456, Mar 2015.
- JOHNSON, A. K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Med Sci Sports Exerc**, 39, n. 8, p. 1388-1400, Aug 2007.
- KAWAMURA Y, OKAMOTO J, FUNAKOSHI M. A role of oral afferents in aversion to taste solutions. **Physiol. Behav.** 3:537–542, 1968.

LEWIS, S. J.; ALLEN, A. M.; VERBERNE, A. J. M.; FIGDOR, R. *et al.* Angiotensin II receptor binding in the rat nucleus solitarius is reduced after unilateral nodose ganglionectomy or vagotomy. **Eur.J.Pharmacol.**, 125, p. 305-307, 1986 1986.

MCKINLEY, M. J.; ALLEN, A. M.; CLEVERS, J.; PAXINOS, G. *et al.* Angiotensin receptor binding in the human hypothalamus: autoradiographic localization. **Brain Res.**, 420, n. 2, p. 375-379, 1987 1987.

MECAWI, A. S.; MACCHIONE, A. F.; NUÑEZ, P.; PERILLAN, C. *et al.* Developmental programming of thirst and sodium appetite. **Neurosci Biobehav Rev**, 51, p. 1-14, Apr 2015.

PEREIRA, D. T.; DAVID, R. B.; VENDRAMINI, R. C.; MENANI, J. V. *et al.* Potassium intake during cell dehydration. **Physiol Behav**, 85, n. 2, p. 99-106, Jun 2005.

PEREIRA, D. T.; MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A. FURO/CAP: a protocol for sodium intake sensitization. **Physiol Behav**, 99, n. 4, p. 472-481, Mar 2010.

PEREIRA-DERDERIAN, D. T.; VENDRAMINI, R. C.; MENANI, J. V.; CHIAVEGATTO, S. *et al.* Water deprivation-partial rehydration induces sensitization of sodium appetite and alteration of hypothalamic transcripts. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 310, n. 1, p. R15-23, Jan 2016.

PORCARI, C. Y.; ARAUJO, I. G.; URZEDO-RODRIGUES, L.; DE LUCA, L. A. *et al.* Whole body sodium depletion modifies AT1 mRNA expression and serotonin content in the dorsal raphe nucleus. **J Neuroendocrinol**, 31, n. 4, p. e12703, Apr 2019.

RONCARI, C. F.; DAVID, R. B.; DE PAULA, P. M.; COLOMBARI, D. S. *et al.* Importance of central AT<sub>1</sub> receptors for sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**, 196, p. 147-152, Nov 2011.

RONCARI, C. F.; DAVID, R. B.; DE PAULA, P. M.; COLOMBARI, D. S. A. *et al.* The lateral parabrachial nucleus and central angiotensinergic mechanisms in the control of sodium intake induced by different stimuli. **Behav Brain Res**, 333, p. 17-26, Aug 30 2017.

ROWLAND, N. E.; FREGLY, M. J. Repletion of acute sodium deficit in rats drinking either low or high concentrations of sodium chloride solution. **Am J Physiol**, 262, n. 3 Pt 2, p. R419-425, Mar 1992.

SAKAI, R. R.; FINE, W. B.; EPSTEIN, A. N.; FRANKMANN, S. P. Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. **Behav Neurosci**, 101, n. 5, p. 724-731, Oct 1987.

SATO, M. A.; YADA, M. M.; DE LUCA, L. A. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. **Physiol Behav**, 60, n. 4, p. 1099-1104, Oct 1996.

SCHIFFRIN, E. L.; GENEST, J. Mechanism of captopril-induced drinking. **Am J Physiol**, 242, n. 1, p. R136-140, Jan 1982.

SHIGEMURA, N.; IWATA, S.; YASUMATSU, K.; OHKURI, T. *et al.* Angiotensin II modulates salty and sweet taste sensitivities. **J Neurosci**, 33, n. 15, p. 6267-6277, Apr 2013.

SIMON, S. A.; DE ARAUJO, I. E.; GUTIERREZ, R.; NICOLELIS, M. A. The neural mechanisms of gustation: a distributed processing code. **Nat Rev Neurosci**, 7, n. 11, p. 890-901, Nov 2006.

SPECTOR, A. C. Behavioral analyses of taste function and ingestion in rodent models. **Physiol Behav**, 152, n. Pt B, p. 516-526, Dec 2015.

SPECTOR, A. C.; TRAVERS, S. P. The representation of taste quality in the mammalian nervous system. **Behav Cogn Neurosci Rev**, 4, n. 3, p. 143-191, Sep 2005.

STRICKER, E. M.; GANNON, K. S.; SMITH, J. C. Thirst and salt appetite induced by hypovolemia in rats: analysis of drinking behavior. **Physiol Behav**, 51, n. 1, p. 27-37, Jan 1992.

STRICKER, E. M.; HOFFMANN, M. L. Control of thirst and salt appetite in rats: early inhibition of water and NaCl ingestion. **Appetite**, 46, n. 2, p. 234-237, Mar 2006.

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

THUNHORST, R. L.; MORRIS, M.; JOHNSON, A. K. Endocrine changes associated with a rapidly developing sodium appetite in rats. **Am J Physiol**, 267, n. 5 Pt 2, p. R1168-1173, Nov 1994.

TORDOFF, M. G.; MCCAUGHEY, S. A. Influence of oral and gastric NaCl preloads on NaCl intake and gastric emptying of sodium-deficient rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, 281, n. 4, p. R1152-1160, Oct 2001.

VERHAREN, J. P. H.; ROELOFS, T. J. M.; MENTING-HENRY, S.; LUIJENDIJK, M. C. M. *et al.* Limbic control over the homeostatic need for sodium. **Sci Rep**, 9, n. 1, p. 1050, 01 2019.

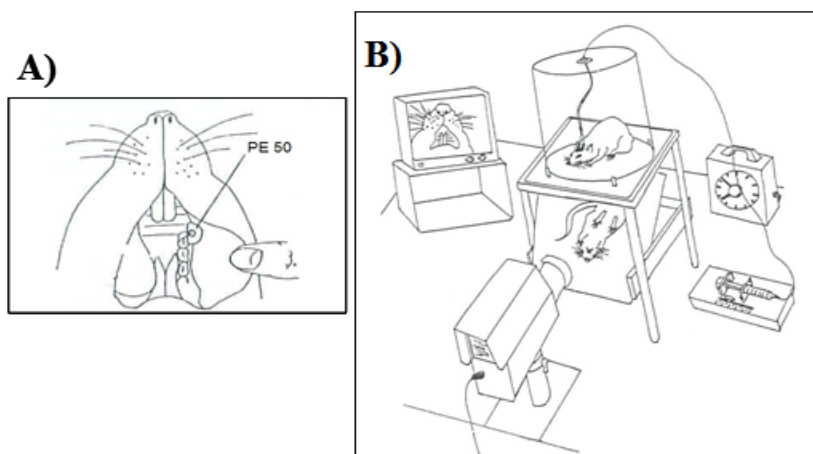
ZHANG, D. M.; STELLAR, E.; EPSTEIN, A. N. Together intracranial angiotensin and systemic mineralocorticoid produce avidity for salt in the rat. **Physiol Behav**, 32, n. 4, p. 677-681, Apr 1984.

ZHANG, H.; FAN, Y.; XIA, F.; GENG, C. *et al.* Prenatal water deprivation alters brain angiotensin system and dipsogenic changes in the offspring. **Brain Res**, 1382, p. 128-136, Mar 2011.



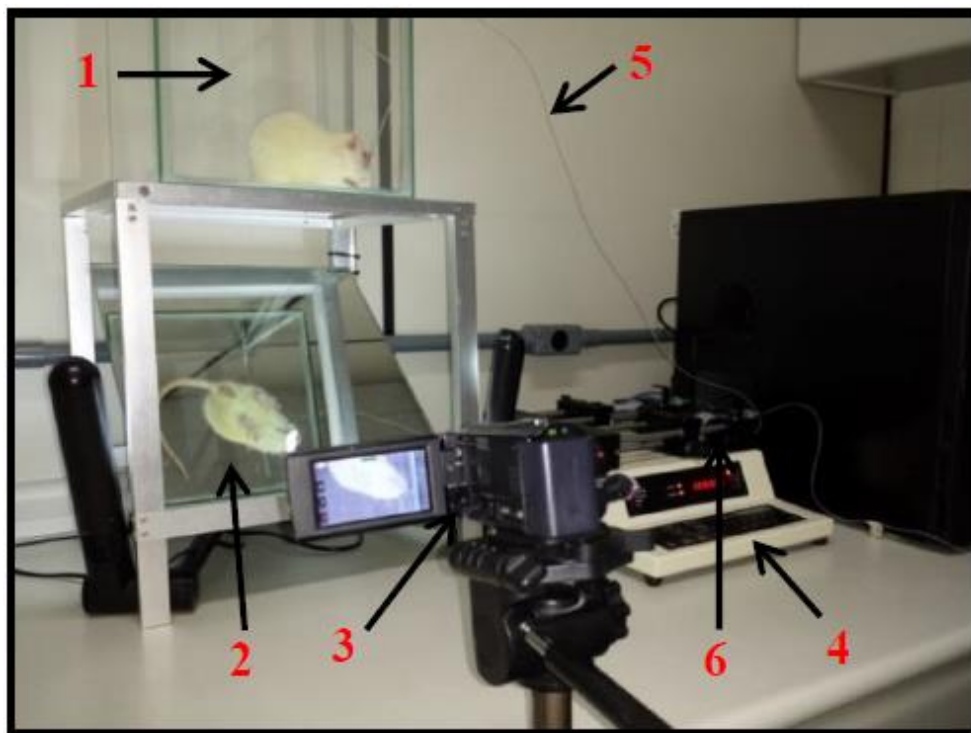
## 8. APÊNDICE

8.1 A) Esquema da localização do local de implante da cânula intra-oral e B) esquema do aparato experimental para o estudo da palatabilidade (reatividade ao sabor) a soluções infundidas diretamente na cavidade oral (Grill e Berridge, 1985).



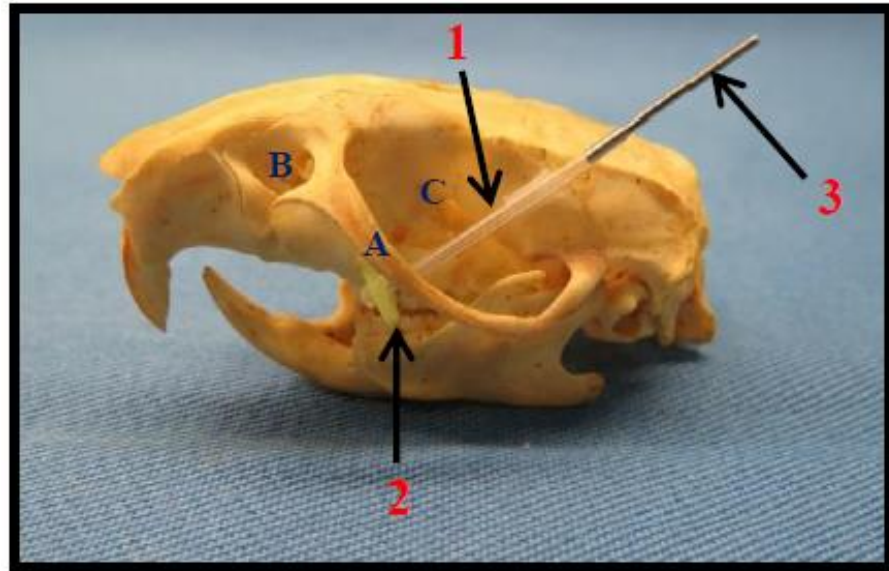
Fonte: GRILL, H. J.; BERRIDGE, K. C. Taste reactivity as a measure of the neural control of palatability. In: JM, S. e AN, E. (Ed.). **Progress in Psychobiology and Physiological Psychology**. Orlando: Academic Press, 1985. p.1-61.

**8.2. Aparato experimental para o estudo da palatabilidade (TRG) usado em nosso laboratório: 1. Gaiola-filmagem, 2. Espelho, 3. Filmadora, 4. Bomba de infusão, 5. Polietileno PE-50, 6. Seringa hipodérmica 10 ml.**



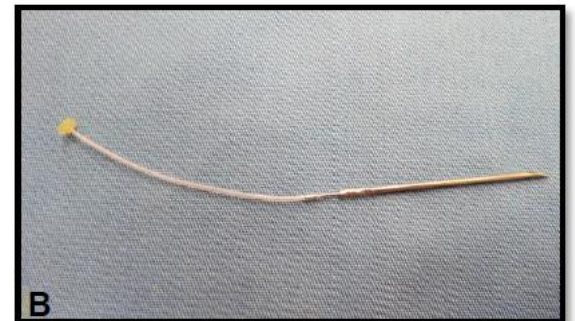
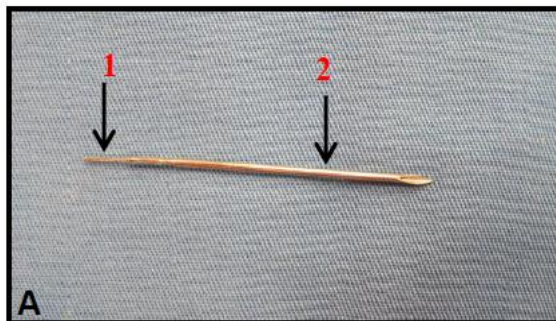
Fonte: Dados não publicados, FERNANDES, 2017

**8.3. Imagem representativa da posição de implante de cânula intraoral em relação ao crânio do animal: 1. Cateter de polietileno, 2. “stop” de silicone, 3. Conexão de aço inoxidável (23G). A. Arco zigomático, B. Órbita, C. Osso temporal.**



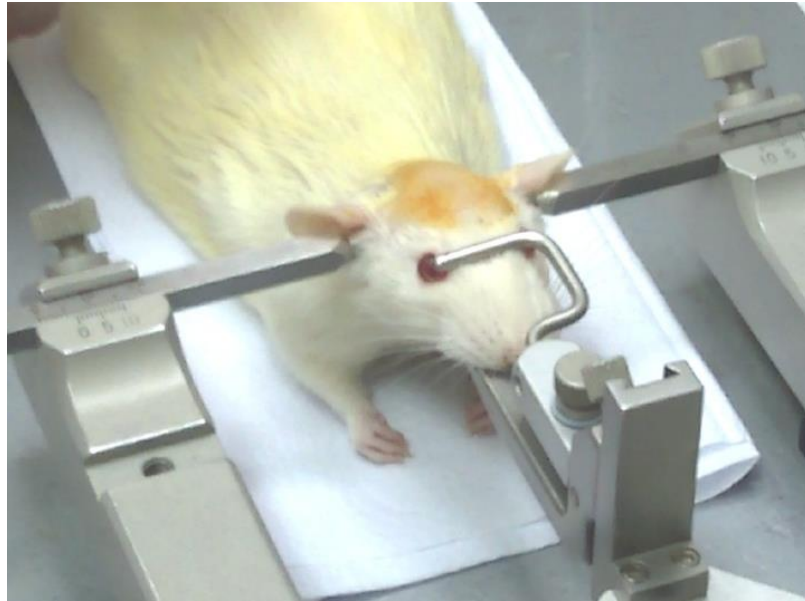
Fonte: Dados não publicados, FERNANDES, 2017

**8.4. A. Sistema de agulhas para implante de cânula intraoral: 1. Agulha 23G, 2. Agulha 18G. B. Sistema de agulhas acoplado ao polietileno PE-50 e “stop” de silicone.**

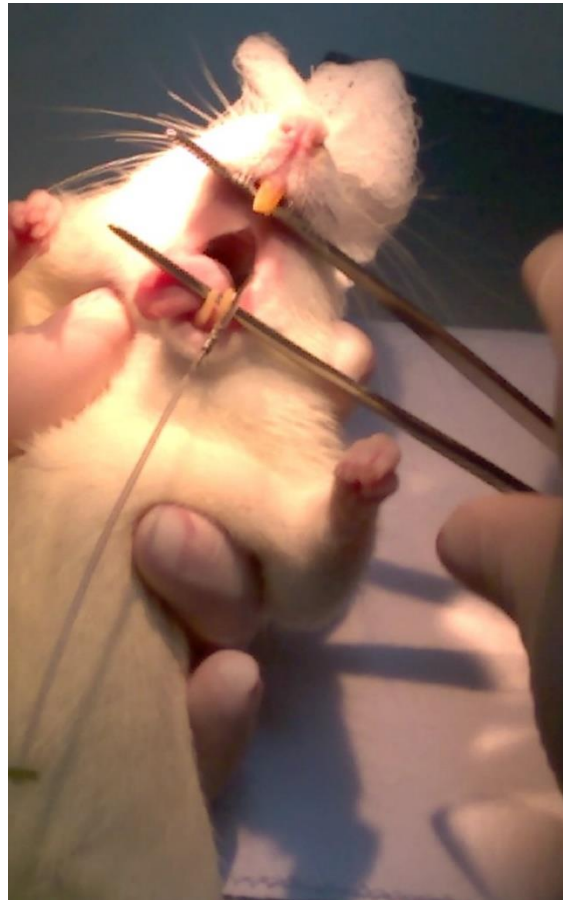


Fonte: Dados não publicados, FERNANDES, 2017

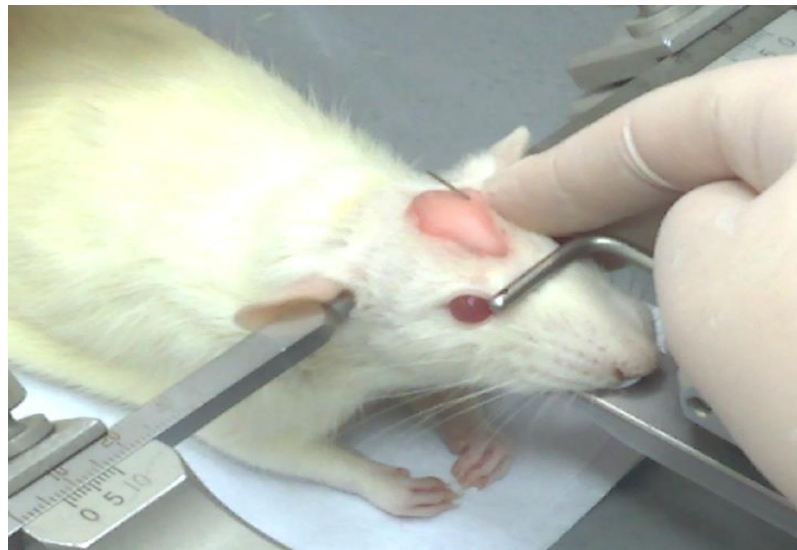
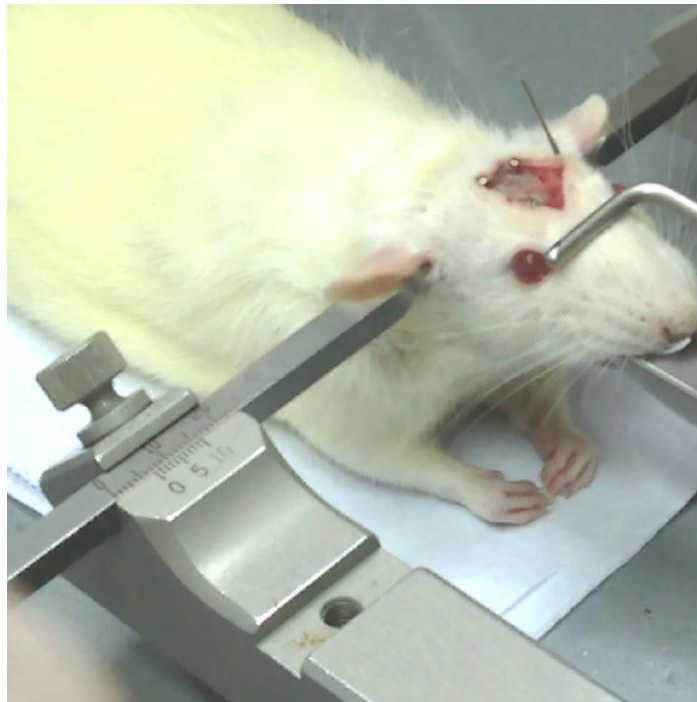
**8.5. Sequência de imagens mostrando o implante de cânula intraoral.**







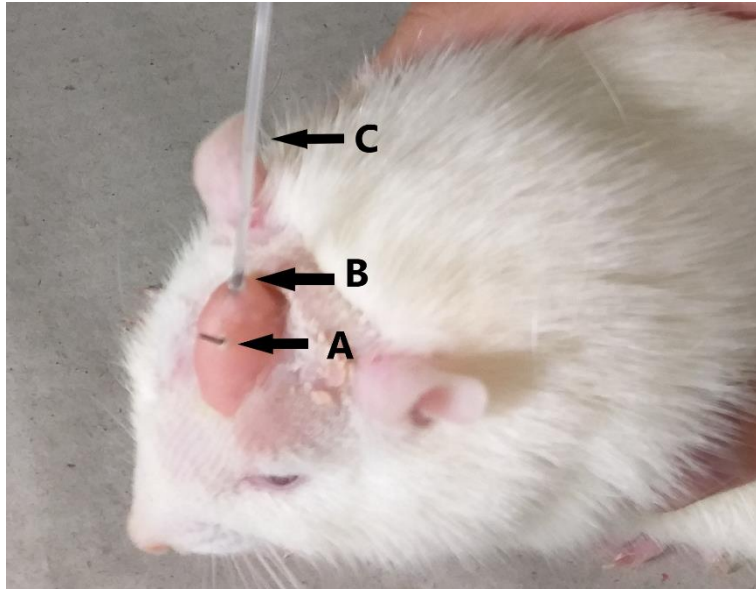




Fonte: Arquivo pessoal



**8.6. A. Implante no VL, B. Cânula intraoral, acoplada ao polietileno P-50 (C).**



Fonte: Arquivo pessoal