

Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas – PIPGCF -
UNESP/UFSCar

BRUNA MAITAN SANTOS

Episódios de depleção de sódio aumentam a ingestão espontânea de açúcar.

Araraquara

2015

Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas –
PIPGCF - UNESP/UFSCar

BRUNA MAITAN SANTOS

Episódios de depleção de sódio aumentam a ingestão espontânea de açúcar.

Dissertação de Mestrado apresentada na Faculdade de Odontologia de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista, como parte das exigências do Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas (PIPGCF) – UNESP/UFSCar, para obtenção do título de mestre em Ciências Fisiológicas, área de concentração Fisiologia.

Orientador: Prof. Dr. Laurival A. De Luca Jr.

Coorientadora: Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de

Andrade

Araraquara

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

S237ep

Santos, Bruna Maitan.
Episódios de depleção de sódio aumentam a ingestão espontânea de açúcar / Bruna Maitan Santos. -- São Carlos : UFSCar, 2015.
63 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2015.

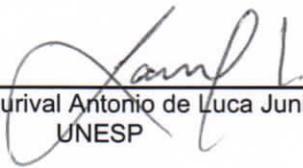
1. Fisiologia. 2. Apetite ao sódio. 3. Sensibilização. 4. Neuroplasticidade. 5. Desidratação. I. Título.

CDD: 612 (20^a)



Folha de Aprovação

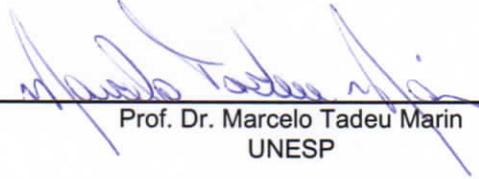
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Bruna Maitan Santos, realizada em 23/04/2015:



Prof. Dr. Laurival Antonio de Luca Junior
UNESP



Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias
USP



Prof. Dr. Marcelo Tadeu Marin
UNESP

DEDICATÓRIA

Dedico todo meu esforço durante meu mestrado aos meus pais que sempre se esforçaram para conseguirem me oferecer um ensino de qualidade. Dedico também este trabalho à Deus, minha irmã e amiga, minha afilhada e minha sobrinha, meus familiares e meus amigos que me apoiaram durante este período.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a SP Barbosa, T Beltz, RC Queiroz e S Fógia pela assistência técnica; SAD Malavolta, C Molina e M Dennis pela assistência administrativa; AV Oliveira e AP Oliveira pelos cuidados aos animais. Agradeço aos meus companheiros de laboratórios e todos os professores e funcionários da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP ou do Programa Interinstitucional de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas que, de alguma forma, me ajudaram durante este período. Agradeço especialmente ao meu orientador Prof. Dr. Laurival Antonio de Luca Jr pela paciência e por todo o conhecimento e oportunidades a mim oferecidas e à minha orientadora Prof. Dr. Carina pelo conhecimento e ajuda oferecidas. Agradeço também a Regina Vendramini e à família do Prof. Laurival pelo carinho, aporte e amizade durante e após minha viagem ao exterior.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ingestão de sacarose de ratos hidratados submetidos a cinco testes de sacarose. O grupo teste teve histórico de depleção de sódio induzida pela combinação da injeção de furosemida com remoção do sódio ambiente por 24 h. O grupo teste também teve experiência de ingerir NaCl 0,3 M nos testes de apetite ao sódio. N = 8/grupo. * P < 0.05.

Figura 2. Ingestão de sacarose de ratos hidratados submetidos a cinco testes de sacarose. Os grupos teste e controle não tiveram experiência com o teste do apetite ao sódio ao final de cada depleção de sódio. N = 8 /grupo.

Figura 3. Ingestão não cumulativa de solução de NaCl 0,3 M de ratos depletados de sódio que tiveram experiência prévia com sacarose 10% (Teste) e ratos os quais não tiveram experiência prévia (Controle). N = 8 /grupo.

Figura 4. Ingestão de sacarose medida em ratos hidratados sem indução no início do teste de sacarose. Para o grupo teste foi realizado um histórico de desidratações intracelulares induzidas por gavagem de 2 ml de solução de NaCl 2 M. N = 8/grupo.

Figura 5. Ingestão de sacarose medida em ratos hidratados sem indução no início do teste de sacarose. Para o grupo teste teve histórico de depleções de sódio induzido por Furo/Cap. O grupo teste também tinha experiência na ingestão rápida de NaCl 0,3 M ocorrida no teste de apetite ao sódio em resposta ao Furo/Cap. Houve interação significativa entre o tratamento e o teste (veja em Resultados e Tabela 3, Apêndice, para mais detalhes). N = 7/grupo.

Figura 6. Ingestão não cumulativa de sacarose 10% medida em animais hidratados. O grupo FC teve histórico de depleções induzidas por Furo/Cap combinadas com veículo de antagonista NMDA (VEH + FC, n = 6) ou o antagonista NMDA MK-801

(MK + FC, n = 5). Um grupo tinha somente histórico de veículo de MK-801 combinado com veículo de Furo/Cap (VEH + VEH, n = 7). N = 7/grupo. *P < 0,05.

Figura 7. Ingestão média diária de NaCl 0,3 M e água dos grupos VEH + VEH (n = 7) e VEH + FC (n = 6), nos blocos Basal e Pós FC. * vs. Basal, respectivo grupo; † vs. VEH + VEH. P < 0,05.

Figura 8. Ingestão média diária de solução de NaCl 0,3 M e água do grupo MK + FC nos blocos Basal e Pós FC. N = 5. * vs, Basal. P < 0,05.

Figura 9. Ingestão média diária de NaCl 0,3 M e água dos grupos VEH + VEH (n = 7), MK + FC (N = 5) e VEH + FC (n = 6) nos blocos Pós FC (antes do acesso à sacarose), Sacarose e Pós Sac. * vs. Pós FC, respectivo grupo. † vs. Pós FC e Sacarose. P < 0,05. N = 5 - 7/grupo.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Efeitos da sensibilização ao sódio similares aos evidenciados para as drogas de abuso.

Tabela 2. Efeitos da ingestão de comidas palatáveis similares aos evidenciados para drogas de abuso.

Tabela 3. Ingestão de NaCl 0,3 M nos primeiros 15 minutos dos testes de apetite ao sódio em função do protocolo de depleção de sódio.

Tabela 4. Ingestão não cumulativa de solução de sacarose 10% em ratos que desconheciam o sabor da sacarose no primeiro teste da sacarose. Os animais tiveram (Teste) ou não (Controle) histórico de episódios de depleção de sódio.

Tabela 5. Análise de bioquímica sanguínea 10 dias após o último tratamento com Furo/Cap ou veículo.

LISTA DE ABREVIATURAS

ALDO: aldosterona;

Amig: amígdala;

Ang II: angiotensina II;

ANOVA: análise de variância;

AP: área postrema;

ARP: atividade de renina plasmática;

AT1: receptor para Ang I do subtipo 1;

AV3V: região ântero-ventral do terceiro ventrículo;

Cap: captopril;

CeA: núcleo central da amígdala;

ECA: enzima conversora de angiotensina;

Furo: furosemida;

Furo/Cap ou FC: protocolo que utiliza injeção de furosemida combinada com injeção de captopril;

GL: graus de liberdade;

GVG: gavagem;

HSD 2: 11 β -hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 2;

Icv: intracerebroventricular;

Ip: intraperitoneal;

LC: locus coeruleus;

LEC: líquido extracelular;

LIC: líquido intracelular;

LTP: potenciação a longo-prazo;

MnPO: núcleo pré-óptico mediano;

NAcc: núcleo accumbens;

NDR: núcleo dorsal da rafe;

NLET: núcleo do leito da estria terminal;

NMDA: N-metil-D-aspartato;

NPBL: núcleo parabraquial lateral;

NPV: núcleo paraventricular;

NSO: núcleo supra-óptico;

NTS: núcleo do trato solitário;

OVLT: órgão vasculoso da lâmina terminal;

PA-RP: protocolo de privação de água com repleção parcial;

S.c.: subcutâneo;

SFO: órgão subfornicial;

SHR: ratos espontaneamente hipertensos;

SK: potássio sérico;

SNa: sódio sérico;

SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona;

VEH: veículo.

RESUMO

Comportamentos motivados podem compartilhar mecanismos de recompensa em comum (sensibilização cruzada). O objetivo do presente estudo foi investigar se o histórico de depleção de sódio, que sensibiliza o apetite de sódio, também sensibiliza a ingestão de açúcar em ratos. O apetite ao sódio foi induzido por dois tratamentos que aumentam a produção de angiotensina II, o diurético furosemida combinado com 24 horas de remoção de sódio ambiental ou furosemida combinada com uma dose baixa do inibidor da enzima conversora da angiotensina (Furo/Cap); e foi inibido através da utilização do antagonista de NMDA (MK-801). Cada tratamento foi repetido três a quatro vezes com um intervalo de 4 ou 7 dias entre as duas repetições. Sete dias após a última repetição, foi realizado o primeiro teste de sacarose em animais inexperientes para sacarose, hidratados e alimentados (espontânea). O teste de sacarose foi repetido uma vez por dia, num total de cinco dias consecutivos. Tanto os animais com histórico de um ou de outro tratamento que produz a depleção de sódio ingeriu mais sacarose 10% no teste da sacarose que os animais controle, que nunca foram depletados ao sódio. O efeito foi mais forte nos primeiros testes (de sacarose), após isto, os grupos ingeriram quantidades semelhantes de sacarose (após o segundo teste de sacarose). Desidratação intracelular repetida (por sonda de NaCl 2 M), ao contrário da depleção de sódio, foi ineficaz em alterar o teste de ingestão de sacarose. A administração sistêmica de MK-801, um antagonista do receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), combinado com Furo/Cap impediu o aumento observado na ingestão de sacarose 10%. Os resultados sugerem que: 1) história de desidratação, especialmente a que envolve a produção de angiotensina II, sensibiliza o consumo de açúcar em animais inexperientes à sacarose 2) a sensibilização do consumo de açúcar depende de eventos plásticos mediados por receptores NMDA.

Palavras-chave: apetite ao sódio, sensibilização, neuroplasticidade e desidratação.

ABSTRACT

Motivated behaviors may share common reward mechanisms and cross-sensitization. The objective of the present study was to find out if history of sodium depletion, which sensitises sodium appetite, also sensitizes sugar intake rat. Sodium appetite was induced by two treatments that raise the production of angiotensin II, diuretic furosemide combined with 24 hours of removal of ambient sodium or furosemide combined with low dose of angiotensin converting enzyme inhibitor captopril (Furo/Cap); and it was blocked by NMDA antagonist (MK-801). Each treatment was repeated three to four times with an interval of 4 or 7 days between two repetitions. About 7 days after the last repetition, sucrose-naïve animals entered a first 2-h sucrose test under hydrated and fed (need-free) condition. The sucrose test was repeated once a day for a total of five consecutive days. Animals with history of either treatment that produced sodium depletion ingested more 10% sucrose in the sucrose test than control animals, which were never sodium depleted. The effect was stronger in the first tests for sucrose, after that groups ingested similar amounts of sucrose after the second sucrose test. Repeated intracellular dehydration (gavage of 2 M NaCl), instead of sodium depletion, was ineffective to alter the later sucrose intake test. Systemic administration of MK-801, an N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist, combined with Furo/Cap prevented the enhancement observed in 10% sucrose intake. The results suggest that 1) history of dehydration, particularly that involving production of angiotensin II, sensitizes sugar consumption in sucrose-naïve animals, 2) sensitization of sugar consumption depends on plastic events mediated by NMDA receptors.

Key words: sodium appetite, sensitization, neuroplasticity and dehydration.

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 10 |
| 1.1. Apetite ao Sódio..... | 11 |
| 1.2. A Sede..... | 12 |
| 1.3. Controle Neuroendócrino do Equilíbrio Hidrossalino..... | 13 |
| 1.4. Sensibilização..... | 15 |
| 1.5. Objetivo..... | 17 |
| 2. MATERIAIS E MÉTODOS..... | 18 |
| 2.1. Drogas utilizadas..... | 19 |
| 2.2. Depleção de sódio e teste de apetite ao sódio..... | 19 |
| 2.3. Teste de (ingestão de) sacarose – pós-depleção de sódio..... | 20 |
| 2.4. Análise bioquímica sanguínea..... | 20 |
| 2.5. Estatística..... | 21 |
| 2.6. Experimento 1 – protocolos..... | 21 |
| 2.6.1. <i>Experimento 1a. Ingestão espontânea de sacarose em ratos com histórico de depleção de sódio.....</i> | 21 |
| 2.6.2. <i>Experimento 1b. Ingestão espontânea de sacarose em ratos com histórico de depleção, com reposição de sódio i.p. (sem teste do apetite ao Na⁺).</i> | 22 |
| 2.6.3. <i>Experimento 1c. Apetite ao sódio em ratos com histórico de testes de sacarose.....</i> | 24 |
| 2.6.4. <i>Experimento 1d. Ingestão de sacarose espontânea em ratos com histórico de desidratações intracelulares.....</i> | 25 |
| 2.6.5. <i>Experimento 1e. Ingestão de sacarose em ratos com histórico de depleção de sódio: produção de rápido apetite ao sódio.....</i> | 26 |
| 2.6.6. <i>Experimento 1f. Análise bioquímica sanguínea em ratos com histórico de rápido apetite ao sódio.....</i> | 27 |
| 2.7. Experimento 2 – protocolos..... | 29 |
| 2.7.1. <i>Experimento 2a. Efeito do bloqueio de receptores NMDA combinado com</i> | |

| | |
|---|-----------|
| <i>Furo/Cap no teste da sacarose</i> | 29 |
| 2.7.2. Experimento 2b. Efeito do bloqueio de receptores NMDA combinado com Furo/Cap no teste da sacarose | 30 |
| 3. RESULTADOS | 32 |
| 3.1. Experimento 1 | 32 |
| 3.1.1. Experimento 1a. Ingestão espontânea de sacarose em ratos com histórico de depleção de sódio | 32 |
| 3.1.2. Experimento 1b. Ingestão espontânea de sacarose em ratos com histórico de depleção, com reposição de sódio i.p. (sem teste do apetite ao Na⁺) | 33 |
| 3.1.3. Experimento 1c. Apetite ao sódio em ratos com histórico de testes de sacarose | 34 |
| 3.1.4. Experimento 1d. Ingestão de sacarose espontânea em ratos com histórico de desidratações intracelulares | 35 |
| 3.1.5. Experimento 1e. Ingestão de sacarose em ratos com histórico de depleção de sódio: produção de rápido apetite ao sódio | 36 |
| 3.1.6. Experimento 1f. Análise bioquímica sanguínea em ratos com histórico de rápido apetite ao sódio | 38 |
| 3.2. Experimento 2 | 38 |
| 3.2.1. Experimento 2a. Efeito do bloqueio de receptores NMDA combinado com Furo/Cap no teste da sacarose | 38 |
| 3.2.2. Experimento 2b. Bloqueio dos receptores NMDA combinado com Furo/Cap: efeito na ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M e água | 39 |
| 4. TABELAS | 43 |
| 5. DISCUSSÃO | 49 |
| 6. CONCLUSÃO | 57 |
| 7. REFERÊNCIAS | 58 |

1. INTRODUÇÃO

A água faz parte de 60% do corpo humano e está em constante processo de perda, através da excreção renal, das glândulas sudoríparas e lacrimais, como também pela ventilação pulmonar; e de ganho, através da ingestão de alimentos e líquido. Um terço desta água corpórea se localiza no líquido extracelular (LEC) e os outros dois terços restantes no líquido intracelular (LIC). Uma das causas desta diferença na quantidade de água entre os meios intra e extracelular está relacionada com a concentração do íon sódio no LEC, o qual não consegue facilmente entrar no LIC devido a semipermeabilidade da membrana celular, fazendo deste íon de grande importância na regulação do gradiente osmótico do LEC (VERBALIS, 2003).

A manutenção dentro de limites estreitos tanto da quantidade de água quanto de outras variáveis do LEC tais como, por exemplo, a concentração de íon sódio, é de extrema importância pois o LEC banha nossas células e proporciona à elas um meio externo estável. Este fenômeno é conhecido como homeostase, conforme definido por Walter Cannon baseado nos estudos de Claude Bernard (CANNON, 1929).

Além do constante processo de perda, desafios tais como hemorragia ou perda intensa de água corpórea por sudorese podem ocorrer e, assim, nosso corpo necessita de meios para detectar estas mudanças e desencadear respostas neuroendócrinas para reestabelecer a homeostase (JOHNSON, 2007b).

Um dos meios para o reestabelecimento da volemia em animais terrestres é a reabsorção renal de água e sódio. Entretanto somente esta resposta não é muitas vezes suficiente para reequilibrar a volemia. Nesses casos acaba sendo necessária a promoção de estados motivados, por exemplo sede e apetite ao sódio, que impulsionarão os animais à busca, aquisição e ingestão de água e sódio, respectivamente. Esses comportamentos são essenciais para a reposição do LEC e, assim, a homeostase (RODRIGUES, 2008).

1.1. Apetite ao Sódio

Visão Geral

O apetite ao sódio tem papel essencial na busca, aquisição e ingestão do íon sódio e na manutenção da homeostase em função de perdas do íon sódio e no volume do LEC. Entretanto, o íon sódio também se caracteriza pelos seus malefícios. Quando ingerido em excesso é um dos principais precursores da hipertensão em humanos (HADDY, 2006), sendo as doenças cardiovasculares, segundo a OMS, a maior causa de mortes no mundo (ORGANIZATION, 2011).

Por outro lado, apesar do relativo acesso facilitado à água e ao sódio, casos de desidratação ainda são recorrentes em humanos. Por exemplo, em casos de vômito, diarreia ou exercício extenuante sem correta reposição iônica (STRICKER e VERBALIS, 1990). Ainda tal como ocorre em pessoas com hiperplasia congênita da adrenal, os quais mesmo após reposição hormonal para controle da desidratação se mantêm com o apetite ao sódio aumentado (KOCHLI, TENENBAUM-RAKOVER e LESHEM, 2005). Além disso, há evidência que a falta de sódio nas fases iniciais da vida pode também aumentar a preferência ao sódio na fase adulta (LESHEM, 2009).

Fica assim evidente a necessidade de pesquisas para a compreensão dos mecanismos que controlam a ingestão de sódio para a busca de tratamentos auxiliares para as doenças relacionadas com o aumento na ingestão de sódio.

História e Estudos

Um dos pioneiros no estudo do apetite ao sódio foi Richter com o modelo de adrenalectomia em ratos (RICHTER, 1936). Ele observou aumento do apetite ao sódio utilizando como parâmetro a ingestão de sódio em animais sem as adrenais, removendo a ação da aldosterona. Um aspecto importante dos estudos de Richter foi mostrar que a adrenalectomia levava a uma hipovolemia letal evitada pela ingestão seletiva de soluções contendo sódio (RICHTER e ECKERT, 1938).

Os estudos seminais liderados por Richter deram origem a vários estudos

pioneiros sobre o controle neural do comportamento tendo como paradigma o modelo homeostático. Entre esses estudos citamos os de Miguel Covian e seu grupo em Ribeirão Preto (COVIAN e ANTUNES-RODRIGUES, 1963) mostrando que a lesão bilateral do hipotálamo lateral inibe a ingestão de sódio hipertônico, sem produzir modificações na ingestão de água.

O apetite ao sódio é um estado motivado comportamental e inato (EPSTEIN e STELLAR, 1955) isto é, não necessita de aprendizado para ocorrer, mas pode ser adaptativo, pela influência do aprendizado, do meio em que está inserido, como também do estado emocional (DENTON *et al.*, 1982; SCHULKIN, 1991).

Outro protocolo usado para produzir depleção de sódio e apetite ao sódio em laboratório foi usado por Sakai e colaboradores (SAKAI *et al.*, 1987). Este protocolo emprega diuréticos como a furosemida que age na alça de Henle inibindo o cotransportador de íons Na^+ K^+ e Cl^- combinado a 24 horas de dieta deficiente em sódio e água a vontade. A exposição repetida a este protocolo é capaz de sensibilizar a ingestão de sódio. Em outras palavras, a depleção repetida de sódio leva a um incremento na ingestão de sódio sem que haja alterações na osmolaridade plasmática do íon Na^+ . Além disso, eles observaram que as concentrações plasmáticas dos hormônios angiotensina II (Ang II) e aldosterona (ALDO) eram aumentadas durante a execução do protocolo, mas eram restabelecidos a níveis basais após a ingestão de água e sódio, sem sofrer incremento com novas depleções de sódio. Outros protocolos também estão descritos na literatura, como o protocolo de FURO/CAP o qual utiliza furosemida e captopril em baixa dose potencializando a ação de Ang II central (THUNHORST e JOHNSON, 1994; PEREIRA, MENANI e DE LUCA, 2010).

1.2. A Sede

Outro estado motivacional importante para nossa sobrevivência, é a sede, podendo ocorrer em resposta a casos de hipovolemia e desidratação extracelular (SAKAI *et al.*, 1987), como também em casos de desidratação intracelular por

estimulação de osmorreceptores devido a hipertonicidade do LEC . A sobrecarga (via intravenosa, subcutânea, intraperitoneal ou gavagem intragástrica) de soluções hiperosmóticas podem ser utilizadas para produzir a desidratação ou sede intracelular. A utilização de soluções hiperosmóticas que não conseguem atravessar a membrana celular, como a sacarose e o NaCl resulta no movimento da água intracelular para o LEC e na estimulação de osmorreceptores devido a hipertonicidade do LEC (FITZSIMONS, 1987).

Um dos meios para induzir a sede intracelular é o de gavagem (GVG) intragástrica de NaCl 2 M, o qual eleva em 4% a osmolaridade do plasma e a concentração de sódio (PEREIRA *et al.*, 2002). Osmorreceptores centrais localizados no órgão subfornical (OSF), órgão vascoloso da lâmina terminal (OLVT) da região pré-óptica-periventricular ântero-ventral ao terceiro ventrículo (AV3V) (JOHNSON e THUNHORST, 1997) quando então ativados, sinalizam para áreas integradoras a informação estimulando a sede. A sede, ao contrário do apetite ao sódio, não sofre incremento com o histórico de desidratações mas, a lesão do núcleo accumbens (NAcc), uma das principais áreas do sistema de recompensa, inibe a ingestão de água (PAL, BHARATHI e THOMBRE, 1992).

1.3. Controle Neuroendócrino do Equilíbrio Hidrossalino (Detecção, Sinalização e Ação Neuroendócrina)

Células especializadas são capazes de sinalizar determinadas alterações e desencadear a ativação de mecanismos de ajuste para estas alterações. No caso da diminuição no volume do LEC, como hemorragia e privação de água, a detecção se faz através de mecanorreceptores, os quais estarão menos estirados, tais como os barorreceptores de alta pressão, localizados na bifurcação do ramo aórtico e no seio carotídeo, e pelos receptores cardiopulmonares de baixa pressão localizados principalmente nas grandes veias pulmonares e nos átrios. Via nervos cranianos IX e X, o menor volume do LEC desencadeará uma menor ativação de áreas encefálicas no tronco encefálico, essencialmente, área postrema (AP) e o núcleo do trato solitário (NTS) (JOHNSON, 2007a). A menor ativação destas áreas desencadeia

uma diminuição na inibição, principalmente serotoninérgica, do núcleo parabraquial lateral (NPBL), facilitando a produção de apetite ao sódio e água (MENANI, DE LUCA e JOHNSON, 1998). Além disso, um aumento na resposta eferente simpática também é produzida através da menor ativação destas áreas do tronco encefálico, facilitando a produção de renina pelas células justaglomerulares do glomérulo renal (RODRIGUES, 2008).

As células da mácula densa renais são também sensíveis a diminuição do perfusato renal e sinalizam para as células justaglomerulares a informação provocando um aumento na produção de renina. A renina na corrente sanguínea facilita a quebra do precursor da angiotensina o angiotensinogênio, transformando-o em angiotensina I (Ang I), um decapeptídeo. A Ang I é então convertida em angiotensina II (Ang II), um octapeptídeo ativo, via enzima conversora de angiotensina (ECA), a qual é produzida principalmente nos pulmões (RODRIGUES, 2008).

A Ang II em níveis elevados, periféricamente, aumenta a reabsorção tubular renal de sódio, tem ação vasoconstritora a nível sistêmico e renal, e age nas células da zona glomerulosa das supra-renais estimulando a secreção de aldosterona. A ALDO é um mineralocorticoide com um papel muito importante na reabsorção do renal de sódio além de uma ação no encéfalo facilitando a formação do apetite ao sódio (GEERLING e LOEWY, 2009).

A ação da Ang II no encéfalo depende de seus receptores, principalmente receptores AT1, localizados em órgãos circunventriculares (OCVs, áreas desprovidas de barreira hematoencefálica), na lâmina terminal e em áreas do sistema dopaminérgico, ou sistema de recompensa (RODRIGUES, 2008). O OVLT, o núcleo pré-óptico mediano (MNPO) e OSF estão localizados no AV3V fazendo parte da lâmina terminal e são essenciais na resposta angiotensinérgica central. Outras áreas também são importantes na ação da Ang II como AP, localizada na região do quarto ventrículo e também desprovida de barreira hematoencefálica, o NAcc, o núcleo leito da estria terminal (NLET), o hipotálamo (JOHNSON e THUNHORST, 1997) e a amígdala (Amig) os quais integram a resposta angiotensinérgica induzindo sede e apetite ao sódio, além de estimular a produção

de vasopressina (AVP), via NSO e PVN, e ALDO central.

A ALDO centralmente age em áreas como o NTS, núcleo ventromedial do hipotálamo e órgão subcomissural, áreas com a presença da enzima HSD2 a qual consegue diminuir os níveis de glicocorticóides, facilitando a ação da aldosterona. Outras áreas também foram apontadas como responsivas à ALDO como Amig, núcleo dorsal da rafe (NDR) e locus coeruleos (LC) (GEERLING e LOEWY, 2009).

1.4. Sensibilização

O aumento da intensidade do comportamento (ex: ingestão de sódio) a um estímulo (ex: desidratação extracelular induzida por depleção de sódio), depois de repetições do mesmo estímulo sempre na mesma intensidade é como pode ser definida a sensibilização comportamental (STEKETEE e KALIVAS, 2011). Conforme proposto por Bernstein (2003), tendo por foco a ingestão de sódio, essa definição é análoga à utilizada para definir sensibilização comportamental utilizando fármacos como estímulo (STEKETEE e KALIVAS, 2011).

Estímulos motivacionais naturais, como os produzidos pelo desequilíbrio de alguns parâmetros homeostáticos, a exemplo o apetite ao sódio, podem intensificar o comportamento gerado em função de uma exposição prévia deste estímulo. Esta mudança comportamental como na resposta neural para estímulos motivacionais naturais são parecidos com os verificados em estudos de sensibilização às drogas de abuso (PIERCE e KALIVAS, 1997).

A neurotransmissão glutamatérgica parece estar envolvida com os mecanismos de sensibilização. Há evidências de que a ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) (canal ionotrópico ativado por glutamato) está envolvida com fenômenos de neuroplasticidade tais como, por exemplo, potenciação a longo-prazo (LTP) para a aquisição de memória e aprendizado (WRIGHT e HARDING, 2004b; JOHNSTON, 2009b). A produção de LTP pela ativação dos receptores NMDA decorre de aumento na expressão de metaloproteinases, facilitando a reestruturação da matriz extracelular (WRIGHT e HARDING, 2004a), aumento no tráfego dos

canais glutamatérgicos AMPA, facilitando a despolarização neuronal (JOHNSTON, 2009a), e aumento na expressão de fator neurotrófico derivado do cérebro ou BDNF (JOHNSTON, 2009a). Drogas de abuso, como a cocaína e anfetamina (CLARK e BERNSTEIN, 2004; ACERBO e JOHNSON, 2011), influenciam no funcionamento dos receptores NMDA em neurônios do sistema dopaminérgico encefálico (GAO e WOLF, 2007). O consumo de sacarose, por sua vez, aumenta os sítios de ligação de receptores AMPA no NAcc em ratos com restrição alimentar (CARR, 2011). Além disso, os receptores NMDA potencialmente participam de mecanismos plásticos comuns à sensibilização da ingestão de sódio e de sacarose.

Esta mudança na estrutura dendrítica e funcional dos neurônios em resposta à uma experiência prévia denominada neuroplasticidade, também ocorre em animais sensibilizados ao apetite ao sódio (ROITMAN *et al.*, 2002). Esses autores encontraram um aumento da ramificação dendrítica neuronal no Nacc em animais com o apetite ao sódio sensibilizado, de forma parecida com aquela encontrada em animais sensibilizados para a anfetamina. Além disso, o MK-801, um inibidor da ativação do receptor NMDA, previne a sensibilização da ingestão de sódio (HURLEY e JOHNSON, 2013).

Sensibilização e o Compartilhamento de Sistemas de Recompensa

O sistema mesocorticolímbico dopaminérgico consiste do VTA e suas projeções dopaminérgicas para áreas como o NAcc, Amig, hipocampo e córtex préfrontal (SWANSON, 1982). Estímulos tais como alimento e as drogas de abuso, aumentam os níveis de dopamina do sistema de recompensa, formando a informação hedônica ou prazerosa. Este primeiro estímulo é capaz de ocasionar mudanças na transmissão sináptica das áreas envolvidas, facilitando dependência para as drogas de abuso, como a sensibilização de seus efeitos comportamentais (PIERCE e KALIVAS, 1997).

Sabe-se que um estímulo prazeroso, pode compartilhar mesmas vias do sistema de recompensa que outro estímulo, como por exemplo entre cocaína e anfetamina, os quais em função de poderem compartilhar mecanismos em comum

de recompensa, o efeito da repetição de uma droga pode sensibilizar o comportamento de outra droga de abuso (PIERCE e KALIVAS, 1997). Esta sensibilização cruzada também pode ser recíproca para a sensibilização na ingestão de sódio e cocaína (ACERBO e JOHNSON, 2011).

O compartilhamento dos sistemas de recompensa, não ocorre somente entre drogas de abuso, mas também com estímulos estressores (CRUZ *et. al.*, 2012) como também com recompensadores naturais, como ingestão de sódio e comidas palatáveis como o açúcar. O histórico de depleções de sódio foi capaz de aumentar a resposta locomotora da anfetamina (ROITMAN *et al.*, 2002). Além disso, há sensibilização cruzada entre a ingestão de sódio e cocaína (ACERBO e JOHNSON, 2011). Animais com período de abstinência de um mês de anfetamina ingeriram mais comida que os animais que receberam salina (MENDEZ *et al.*, 2009). Pacientes em abstinência de opiáceos ganharam peso através do consumo excessivo de alimentos salgados (COCORES e GOLD, 2009). Além disso, animais tratados repetidamente com anfetamina tiveram um aumento na ingestão de sacarose comparado ao grupo tratado com salina (AVENA, N. M. e HOEBEL, B. G., 2003).

A sensibilização na ingestão de sódio e a ingestão de comidas palatáveis de alto valor hedônico, portanto, podem compartilhar mesmos mecanismos de recompensa que algumas drogas de abuso. Algumas evidências como sensibilização cruzada e da síndrome da abstinência estão citadas nas Tabelas 1 (vide Tabelas, pág. 40) e 2 (vide Tabelas, pág. 41), trazendo algumas características destes recompensadores naturais que são similares com as encontradas nas drogas de abuso.

1.5. Objetivo

O objetivo principal do trabalho foi testar se o histórico de depleções de sódio pode aumentar a ingestão espontânea de sacarose em ratos.

Foi complementarmente testado se:

- o efeito na ingestão espontânea de sacarose está relacionado com mudanças na bioquímica sanguínea;
- o efeito na ingestão espontânea de sacarose é específico para desidratações extracelulares;
- a repetição de ingestão de sacarose é capaz de alterar a resposta de ingestão de sódio em animais depletados de sódio;
- o efeito na ingestão espontânea de sacarose é dependente de receptores NMDA.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

Ratos Holtzman (colônia de Araraquara - UNESP) pesando entre 265 a 280 g ou Sprague-Dawley (Harlan Teklad, Indianopolis, IN, EUA) pesando entre 245 a 260 g foram utilizados para os experimentos. Eles foram mantidos no ciclo de 12 h claro/escuro e alojados em gaiolas individuais suspensas em sala com temperatura e umidade controladas. Os animais tiveram acesso livre à água e NaCl 0,3 M, a menos que mencionado de outra maneira, contidos em bebedouros feito de buretas de polipropileno (capacidade para 100 ml com divisões a cada ml) com bicos de aço inoxidável encaixados em rolha antiácida. Todos os bebedouros usados nos experimentos foram sempre acoplados à parte dianteira com os bicos de acesso voltados para o interior de cada gaiola. A ração granulada para roedores (Guabi, Brasil; fórmula NIH-31, EUA) (1 - 2% de sódio) foi oferecida para os animais em um recipiente suspenso encaixado do lado de fora de cada gaiola. Todos os experimentos iniciaram 7 dias depois dos animais terem sido alojados. Eles foram realizados durante o ciclo claro, entre 9 e 12 horas, quando todos os comportamentos, inclusive de ingestão, estão reduzidos. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética de Uso de Animais da FOAr-UNESP (Experimento 1 realizado no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia da FOAr) e da University of Iowa (Experimento 2 realizado no laboratório do professor

Alan Kim Johnson no Departamento de Psicologia da Universidade de Iowa) seguindo as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação animal e do Instituto Nacional Americano de Saúde (NIH) para os Cuidados e Uso de Animais de Laboratório.

2.1. Drogas utilizadas

Furosemida (diurético e natriurético, Sigma-Aldrich St. Louis, MO) dissolvida em veículo de água destilada, ajustada em pH = 9,0 com hidróxido de sódio 0,1 N.

Captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina, Sigma-Aldrich St. Louis, MO) dissolvido em veículo de salina isotônica.

MK-801 (antagonista de receptor de NMDA, Sigma-Aldrich St. Louis, MO) dissolvido em veículo contendo 95% salina e 5% de dimetilsulfóxido.

2.2. Depleção de sódio e teste de apetite ao sódio

Os procedimentos para produção do apetite ao sódio em resposta à depleção de sódio estão detalhados nos Experimento 1 e 2. Resumidamente, foram usados dois procedimentos para se induzir apetite ao sódio, aplicados sempre depois de removidas ração e os bebedouros de polipropileno contendo água, NaCl 0,3 M. Em um deles a depleção de sódio foi induzida através da injeção subcutânea (s.c.) do diurético natriurético furosemida combinada à remoção do sódio ambiente por 24 h para produção tardia de apetite ao sódio. Em outros a depleção de sódio foi induzida através da injeção s.c. da furosemida (Furo) combinada à injeção s.c. de baixa dose do inibidor da enzima conversora de angiotensina II (Cap) para produção rápida do apetite ao sódio. A ingestão de NaCl 0,3 M e de água foi medida através de bebedouros de vidro graduados no teste do apetite ao sódio realizado imediatamente após cada procedimento para induzir depleção de sódio. Foi demonstrada a presença do sal aos animais tocando levemente os lábios deles com o bico dos bebedouros. Os líquidos foram oferecidos aos animais no início de cada teste em bebedouros feitos de bureta de vidro graduada a cada 0,1 ml. Terminado um teste de

apetite ao sódio, água, NaCl 0,3 M e ração foram oferecidos para livre consumo até o próximo teste.

2.3. Teste de (ingestão de) sacarose – pós-depleção de sódio

A sacarose foi oferecida diariamente após o último teste de apetite ao sódio (detalhes nos Experimentos 1a, 1b) para animais hidratados sem acesso prévio a solução de açúcar conforme protocolo de trabalho anterior (DE LUCA *et al.*, 2002). Foram removidas a ração e os bebedouros de polipropileno contendo água e NaCl 0,3 M. Em seguida, sacarose 10% foi oferecida em bebedouros feitos de bureta de vidro graduada a cada 0,1 ml. Foi demonstrada a presença do açúcar aos animais tocando levemente os lábios deles com o bico dos bebedouros. A ingestão de sacarose 10% foi medida por 2 horas (teste de sacarose). A solução de sacarose foi removida ao final do teste e água, NaCl 0,3 M e ração foram oferecidos para livre consumo até o próximo teste.

2.4. Análise bioquímica sanguínea

As amostras foram coletadas em tubos pré-refrigerados na temperatura de 4 °C contendo gel ou EDTA sódico (2 mg/ml de sangue) para obtenção de soro e plasma, respectivamente. Todas as amostras foram centrifugadas por 10 min. As amostras para a determinação da atividade de renina plasmática (ARP) foram armazenadas a -20 °C. Todas as outras amostras foram analisadas imediatamente após centrifugação. As concentrações de sódio (S_{Na}) e potássio sérico (S_K) foram medidas através de potenciômetro usando um eletrodo íon-específico (ISE AVL 9180 Scientific Co., Roswell, Georgia, EUA). A concentração sérica de glicose e triglicérides foi medida pelos métodos da glicose-oxidase e enzimático, respectivamente, em sistemas automatizados (Labtest reagent, LABmax 240-Labtest, Hirose Electronic System Co., Masu-Gun, Tochigi, Japão). Atividade de renina plasmática (ARP) foi determinada por radioimunoensaio com anticorpos para angiotensina I gerada a partir do angiotensinogênio.

2.5. Estatística

ANOVA de uma via foi usada para comparar os grupos nos testes bioquímicos sanguíneos. ANOVA de duas vias com medidas repetidas ou teste T foram usados para comparar os grupos nos testes de ingestão. Para comparar a ingestão diária entre os grupos e entre os dias foram utilizadas ANOVA de duas vias ou uma via com medidas repetidas, ou teste T pareado. O teste post-hoc Student-Newman-Keuls foi utilizado para comparar as médias. A significância requerida foi de probabilidade menor que 0,05. Os dados foram expressos pela média \pm erro padrão da média.

Para análise da ingestão diária no Experimento 2b, os dias foram separados em blocos, Basal (período de dias sem nenhum tipo de tratamento, para todos os animais), Pós FC (período de dias após os quatro tratamentos com Furo/Cap), Sacarose (dias de testes de sacarose) e Pós Sac (dias após o último teste de sacarose). Foram utilizados somente os últimos 5 dias de cada bloco. Os dias entre os tratamentos com FC não foram utilizados na análise.

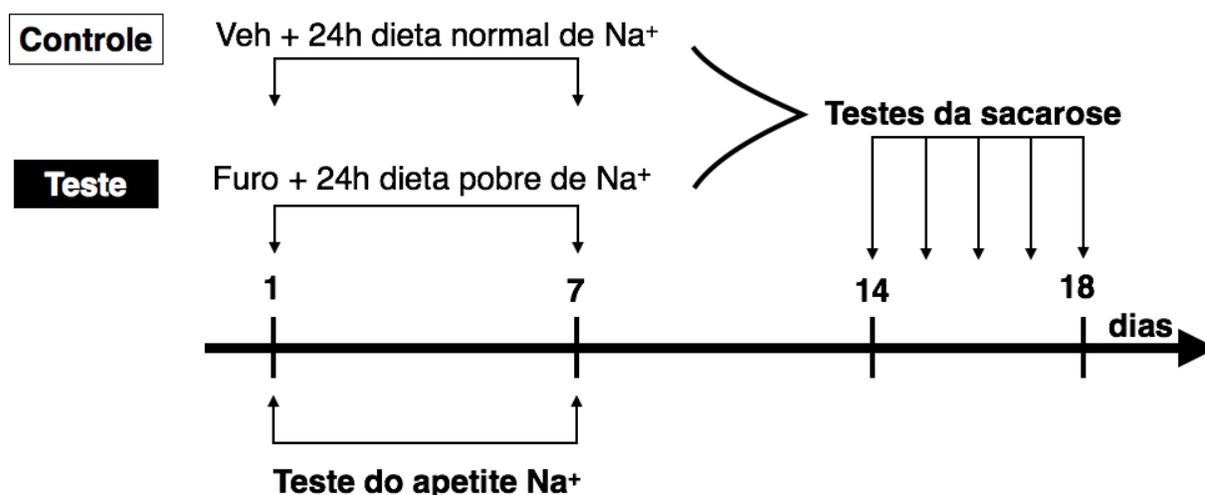
2.6. Experimento 1. Episódios de depleção de sódio e ingestão de sacarose.

2.6.1. Experimento 1a. Ingestão espontânea de sacarose em ratos com histórico de depleção de sódio

O objetivo deste experimento foi testar se a ingestão de sacarose é aumentada pelo histórico de depleções de sódio. A depleção de sódio foi induzida no grupo teste pela combinação da injeção de furosemida com a remoção do sódio ambiente por 24 h (SAKAI *et al.*, 1987). Este procedimento induz entre 1,5 e 2 mEq de perda de sódio além de um consistente apetite ao sódio, o qual se expressa ou “amadurece” mais de 10 h após a injeção de furosemida (ROWLAND e MORIAN, 1999; TEKOL, 2006).

Um grupo de 16 animais foi separado em 2 subgrupos, controle (n = 8) e teste

(n = 8). Ração, NaCl 0,3 M e água foram removidas e as gaiolas dos animais foram lavadas com água. Em seguida, a depleção de sódio foi induzida no grupo teste por uma injeção subcutânea de furosemida (10 mg/ml/animal) seguida pelo acesso a somente água e alimento deficiente de sódio (fubá em pó; 0,001% de sódio e 0,33% de potássio), por 24 h. O grupo controle recebeu injeção subcutânea de veículo e acesso à água, NaCl 0,3 M e ração por 24 h. Ao final das 24 h, o fubá foi removido e NaCl 0,3 M e água oferecidas para todos os animais. A ingestão cumulativa da cada líquido foi medida a 15, 30, 60 e 120 min (teste de apetite ao sódio). A depleção seguinte foi induzida uma semana mais tarde. O segundo teste de apetite ao sódio foi realizado após a segunda depleção de sódio. Uma semana após a segunda depleção de sódio foi oferecida sacarose 10% dando início ao primeiro teste de sacarose. O teste de sacarose foi repetido uma vez ao dia, pelos 4 dias seguintes.

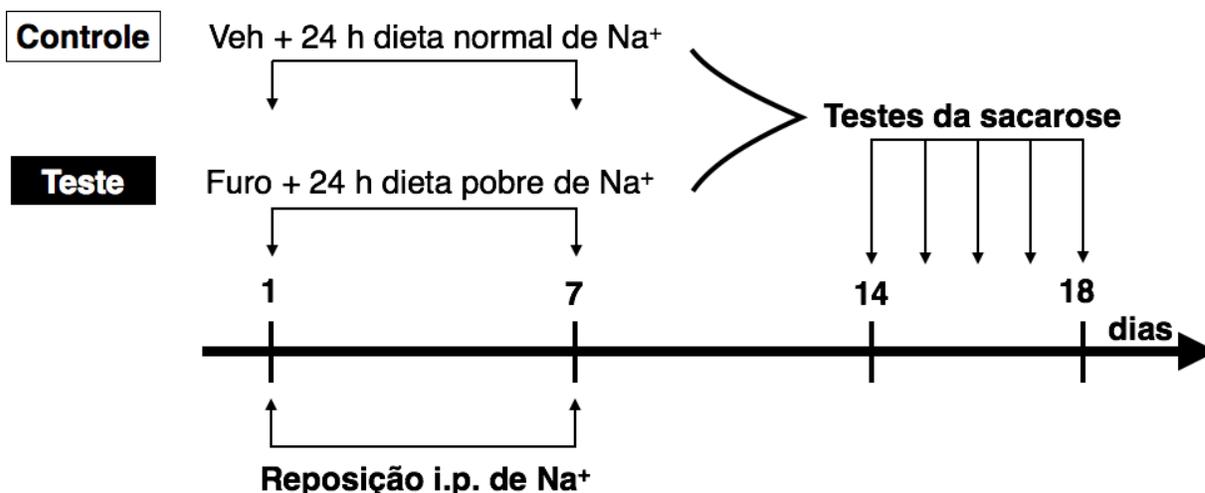


2.6.2. Experimento 1b. Ingestão espontânea de sacarose em ratos com histórico de depleção, com reposição de sódio i.p. (sem teste do apetite ao Na⁺).

Conforme mostrado nos resultados, o histórico de depleções de sódio aumentou a ingestão de sacarose 10% no Experimento 1a. O objetivo do Experimento 1b foi testar se a experiência de ingerir sódio durante o teste de apetite

ao sódio foi necessária para aumentar a ingestão de sacarose. O protocolo usado foi similar ao usado em trabalhos prévios de incremento no apetite ao sódio (SAKAI *et al.*, 1987).

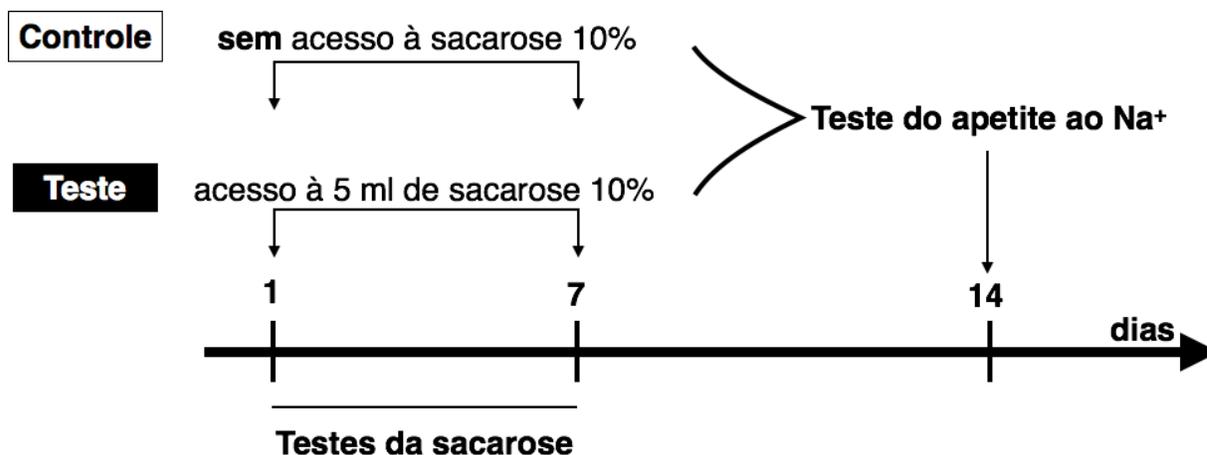
Um grupo de 14 animais foi separado em dois subgrupos, controle (n = 7) e teste (n = 7). Ração, NaCl 0,3 M e água foram removidas e as gaiolas lavadas com água. Em seguida, a depleção de sódio foi induzida no grupo teste pela injeção subcutânea de furosemida com a remoção do sódio ambiente como descrito no Experimento 1a. O grupo controle recebeu uma injeção subcutânea de veículo e acesso à água, NaCl 0,3 M e ração regular por 24 h. Ao final das 24 h, a ração foi removida e cada animal de ambos os grupos recebeu um total de 2,0 mEq de sódio distribuídos uniformemente através de quatro injeções intraperitoneais (0,5 mEq/3,5 ml cada) de NaCl 0,15 M (carga passiva de sódio) as quais igualam o amonte de sódio perdido pelo animal através da depleção. As quatro injeções de NaCl 0,15 M foram realizadas a intervalos de 30 min. Somente água e ração regular foram retornadas imediatamente após a última injeção, ficando disponíveis por 24 h. O NaCl 0,3 M foi retornado ao final das 24 h e mantido disponível até a próxima depleção. A segunda depleção de sódio foi seguida pela carga passiva de sódio realizada uma semana após a primeira depleção. Uma semana após a segunda depleção de sódio, ração, NaCl 0,3 M e água foram removidas para dar início ao primeiro teste de sacarose. O teste de sacarose foi repetido uma vez ao dia, pelos 4 dias seguintes.



2.6.3. Experimento 1c. *Apetite ao sódio em ratos com histórico de testes de sacarose.*

O objetivo deste experimento foi investigar se a experiência prévia ao sabor de sacarose aumenta o apetite ao sódio.

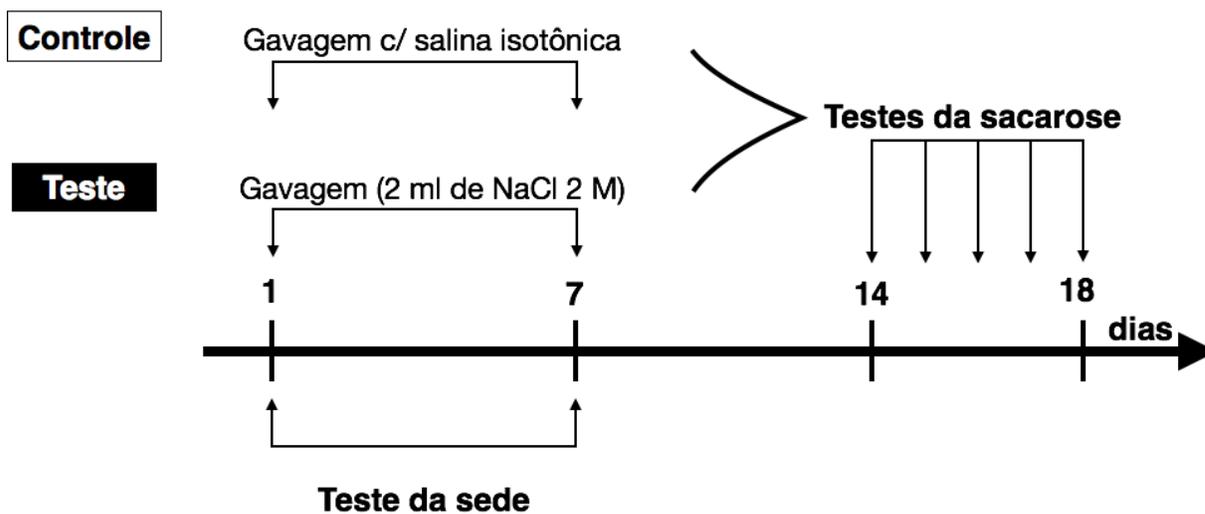
Dezesseis animais foram utilizados e todos tiveram acesso à água, NaCl 0,3 M e ração. Metade do grupo teve livre acesso a uma terceira bureta contendo 5 ml de sacarose 10%. A outra metade teve acesso a uma terceira bureta contendo 5 ml de água. O acesso à terceira bureta foi feito no mesmo horário todos os dias (começo da tarde), horário correspondente àquele em que foram realizados os testes de apetite ao sódio e de sacarose no Experimento 1a. Os animais ingeriram os 5 ml de sacarose 10%, a qual foi renovada por 7 dias consecutivos. No dia seguinte ao último dia de acesso à sacarose, ração, água e NaCl 0,3 M foram removidas e todas as gaiolas foram lavadas. Em seguida, a depleção de sódio foi induzida em ambos os grupos pela combinação da injeção de furosemida e remoção do sódio ambiente por 24 h. O teste de apetite ao sódio começou 24 h após a injeção de furosemida. A ração padrão foi retornada aos animais ao final do teste e, juntamente com água e NaCl 0,3 M, mantida disponível para livre consumo até a segunda e última depleção de sódio induzida uma semana mais tarde. O segundo e último teste de apetite ao sódio ocorreu em seguida a última depleção.



2.6.4. Experimento 1d. Ingestão de sacarose espontânea em ratos com histórico de desidratações intracelulares

O objetivo deste experimento foi saber se o histórico de desidratação intracelular, que induz sede também chamada de intracelular, produz incremento na ingestão espontânea de solução de sacarose no teste de sacarose.

Os animais ($n = 16$) foram removidos de suas gaiolas e treinados para gentilmente receber uma sobrecarga intragástrica (gavagem) resultante de infusão de água destilada (1 ml) através de um tubo de polipropileno (PE-10) conectado a uma seringa. O comprimento do tubo e a sobrecarga de NaCl (2 ml de solução de NaCl 2 M), necessárias para induzir forte hipernatremia, natriurese, redução na ARP e sede foram baseados em trabalho prévio (PEREIRA *et al.*, 2002). O treinamento começou 2 dias após a adaptação e realizado uma vez ao dia, por 5 dias. No sexto dia, após remoção da ração e líquidos da gaiola, metade do grupo recebeu gavagem de NaCl 0,15 M (controle). A água foi oferecida 1 h após a gavagem e a ingestão de água foi registrada por 2 h (teste de sede). Ração padrão e água foram mantidas disponíveis até a próxima desidratação intracelular realizada uma semana mais tarde seguida do teste de sede. Uma semana após o segundo teste de sede, ração regular, NaCl 0,3 M e água foram removidos e bebedouro contendo sacarose 10% foi oferecido dando início ao teste de sacarose. O teste de sacarose foi repetido diariamente, pelos próximos quatro dias.



2.6.5. Experimento 1e. Ingestão de sacarose em ratos com histórico de depleção de sódio: produção de rápido apetite ao sódio

Nesse experimento utilizamos outro protocolo que induz e sensibiliza o apetite ao sódio, o protocolo Furo/Cap. Conforme explicado adiante, o Furo/Cap induz um rápido apetite ao sódio, em questão de duas horas. A repetição de injeções de Furo/Cap também sensibiliza o apetite ao sódio conforme mostrado originalmente em nosso laboratório (PEREIRA *et al.*, 2010).

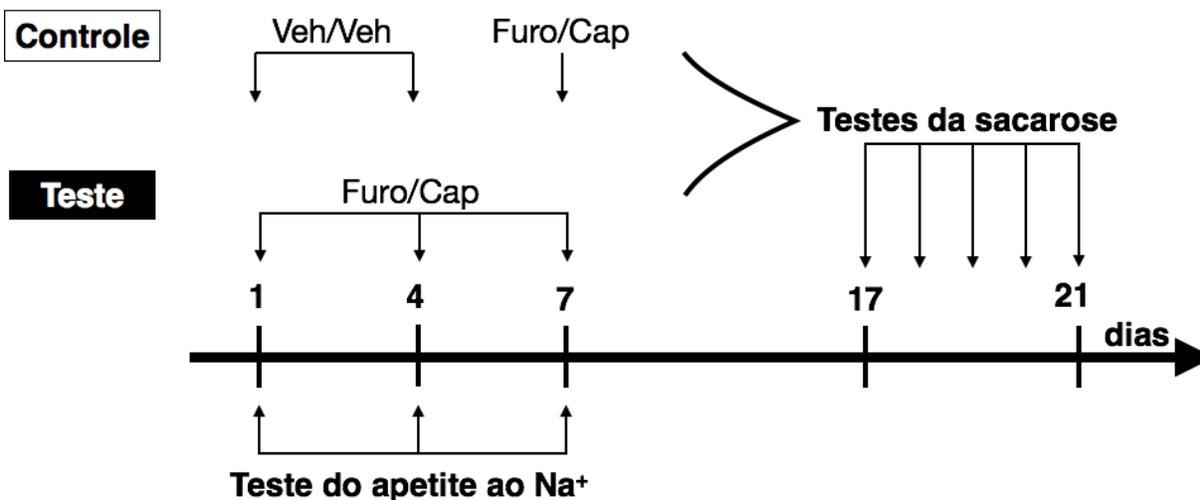
A rapidez na indução do apetite ao sódio pelo Furo/Cap colaborou para investigarmos quatro aspectos importantes relacionados ao efeito do histórico de depleção sobre o teste de sacarose. O primeiro aspecto foi saber se o incremento na ingestão de sacarose pode ser induzido por outro método de depleção de sódio além do método de furosemida combinada com 24 h de dieta pobre em sódio. O Furo/Cap serviu para testar se o incremento na ingestão do açúcar estava de fato associado à sensibilização da ingestão de sódio em geral ou se foi um fenômeno dependente de um protocolo particular (furosemida + 24 h de remoção de sódio ambiente). O uso do protocolo Furo/Cap confirmou o caráter geral do efeito conforme descrito em Resultados. Um segundo aspecto é a intensa produção de ANG II que resulta da injeção de Furo/Cap (ver parágrafo seguinte) ajudando a definir melhor o agente da

depleção de sódio responsável pelos efeitos na ingestão de sacarose. Testamos então se a repetição do Furo/Cap estaria associada a alterações bioquímicas sanguíneas que pudessem explicar o aumento na ingestão de sacarose. Finalmente, confirmado o efeito na ingestão de sacarose, o Furo/Cap passou a ser útil para investigar mecanismos associados a esse efeito na ingestão de sacarose através da utilização do inibidor de canais NMDA, Mk-801. A rápida ação deste protocolo sobre a ingestão de sódio permitiu intervenções farmacológicas agudas visando o entendimento desses mecanismos (PEREIRA *et al.*, 2010; HURLEY e JOHNSON, 2013).

O Furo/Cap envolve a injeção subcutânea do diurético natriurético furosemida, Furo (10 mg/kg/ml), e outra injeção subcutânea de captopril Cap (5 mg/kg/ml) ou Furo/Cap. Este protocolo induz a ingestão de NaCl hipertônico ao redor de uma hora após as injeções, devido a massiva conversão de ANG I em ANG II no encéfalo, ajudado pela fraca hipotensão resultante da falta de ANG II na periferia (THUNHORST e JOHNSON, 1994). O mesmo tratamento também sensibiliza o apetite ao sódio produzido tanto em resposta ao Furo/Cap sozinho como em resposta a privação de água; sensibilização essa dependente, pelo menos em parte, da ação da ANG II em seus receptores AT1 (PEREIRA *et al.*, 2010).

Quatorze animais foram distribuídos em 2 grupos: Teste, o qual recebeu dois tratamentos iniciais de Furo/Cap e um último de Furo/Cap (n = 7); controle, o qual recebeu dois tratamentos iniciais de veículo e o último de Furo/Cap (n = 7). Foi dado um intervalo de dois dias sem tratamento entre dois dias de tratamento e seus respectivos testes de apetite ao sódio. No dia do primeiro teste de apetite ao sódio, a ração e os líquidos foram removidos e o grupo teste recebeu duas injeções subcutâneas, uma de Furo e outra de Cap. O grupo controle recebeu injeções de veículo de Furo e Cap. Após uma hora de injeção de Furo/Cap ou veículo, água e NaCl 0,3 M foram oferecidos e suas ingestões registradas por 2 h (teste de apetite ao sódio). A ração foi retornada aos animais ao final do teste e, juntamente com água e NaCl 0,3 M, mantida disponível para livre consumo até o próximo teste. O mesmo tratamento foi realizado para ambos os grupos no segundo teste realizado 3 dias depois. O teste final foi realizado 3 dias após o segundo, no qual ambos os grupos

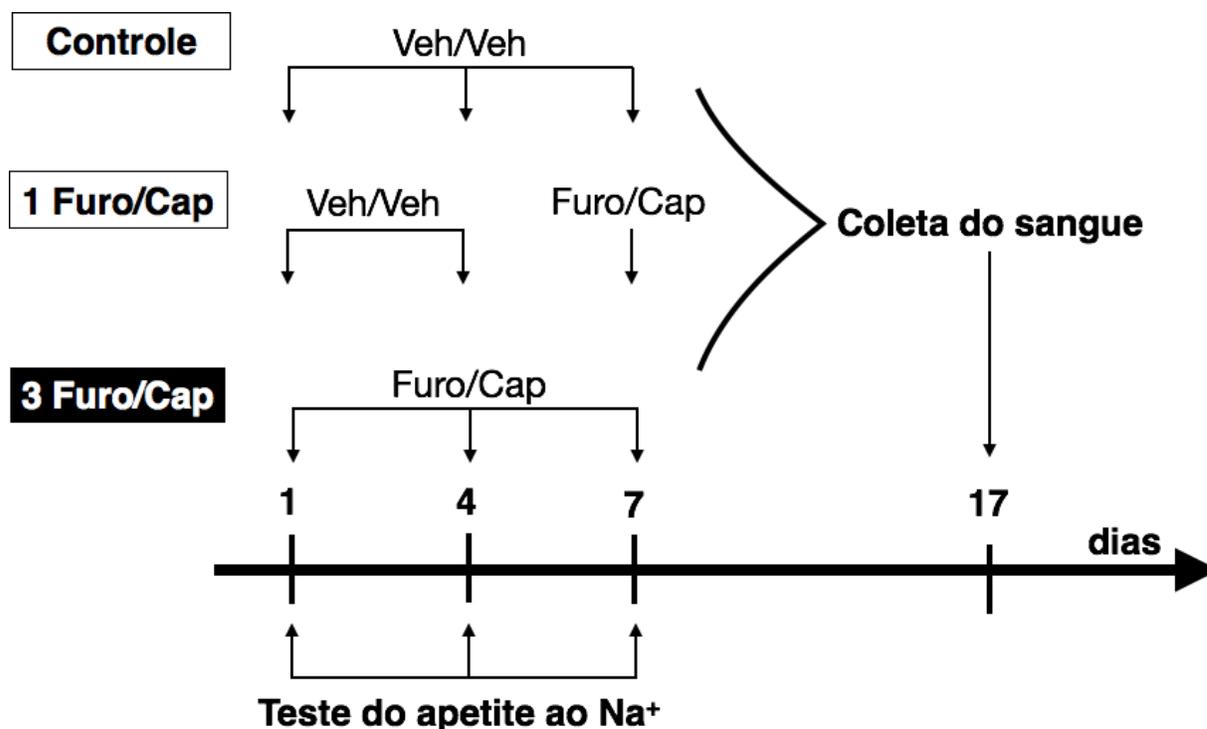
foram tratados com Furo/Cap antes do teste do apetite ao sódio. O primeiro teste de sacarose iniciou-se dez dias após o terceiro teste de apetite ao sódio para reforçar a hipótese de que a sensibilização do animal ao sódio possa influenciar a ingestão de uma substância hedônico como a sacarose. O teste de sacarose foi repetido diariamente por outros 4 dias.



2.6.6. Experimento 1f. Análise bioquímica sanguínea em ratos com histórico de rápido apetite ao sódio

Vinte e três animais foram distribuídos em três grupos: Teste, o qual recebeu 2 tratamentos iniciais de Furo/Cap e um último de Furo/Cap (n = 7); controle-Furo, o qual recebeu dois tratamentos iniciais de veículo e um último de Furo/Cap (n = 8); controle-veículo, o qual recebeu dois tratamentos iniciais de veículo e um último também de veículo (n = 8). Foram dados dois dias de intervalo sem tratamento entre os dois tratamentos e seus respectivos testes de apetite ao sódio. Cada animal recebeu um tratamento seguindo a mesma sequência de tratamentos e dias utilizados no Experimento 2a. Dez dias após o último teste de apetite ao sódio (dia que iniciaria os testes da sacarose), os animais tiveram seu sangue do tronco coletado imediatamente após a decapitação para a determinação da concentração sérica de sódio, potássio, proteínas, glicose e triglicérides e da atividade de renina

plasmática.



2.7. Experimento 2

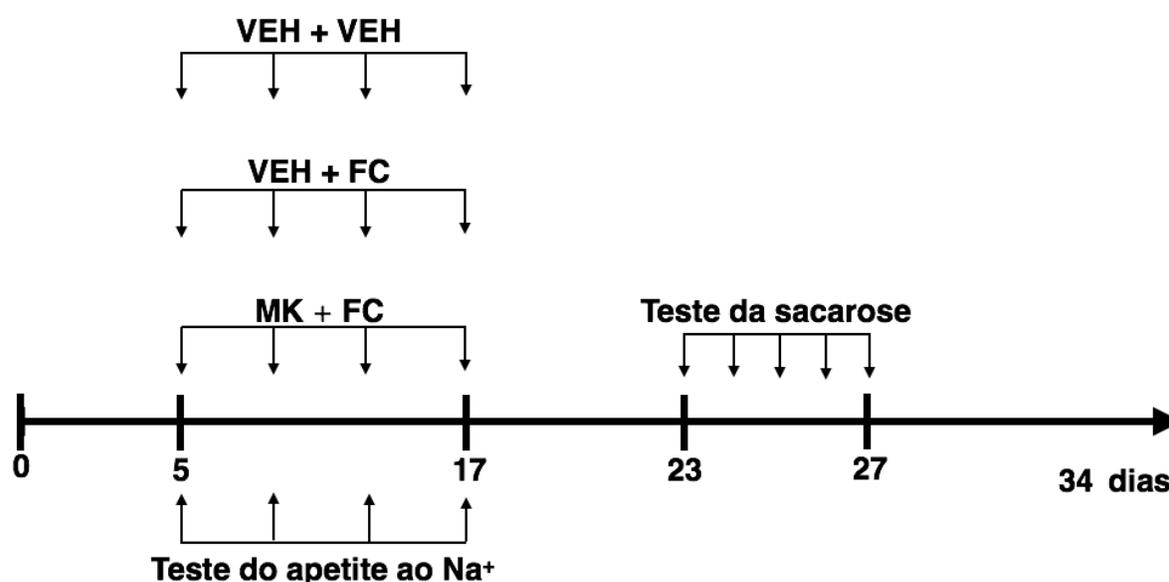
2.7.1. Experimento 2a. Efeito do bloqueio de receptores NMDA combinado com Furo/Cap no teste da sacarose

O objetivo deste experimento foi investigar se os receptores NMDA medeiam os efeitos de repetidas injeções de Furo/Cap na ingestão espontânea de sacarose 10%. Foi utilizado um protocolo baseado em trabalho prévio o qual utiliza MK-801, um antagonista de NMDA, que previne a sensibilização produzida pelo Furo/Cap teste do apetite ao sódio induzido (HURLEY e JOHNSON, 2013). Aproveitamos para também ampliar os dados da literatura (JOHNSON e THUNHORST, 1997) testando o efeito do MK-801 na sensibilização da ingestão diária de sódio.

Ração e líquidos foram removidos. Em seguida MK-801 (0,15 mg/kg), ou

respectivo veículo, foi injetado intraperitonealmente, 20 min após da injeção de Furo/Cap ou veículo. NaCl 0,3 M foi oferecido uma hora após injeção de Furo/Cap ou veículo. Na hora seguinte foi oferecida água. A ração foi retornada uma hora após. Ração e líquidos foram mantidos disponíveis até o próximo teste.

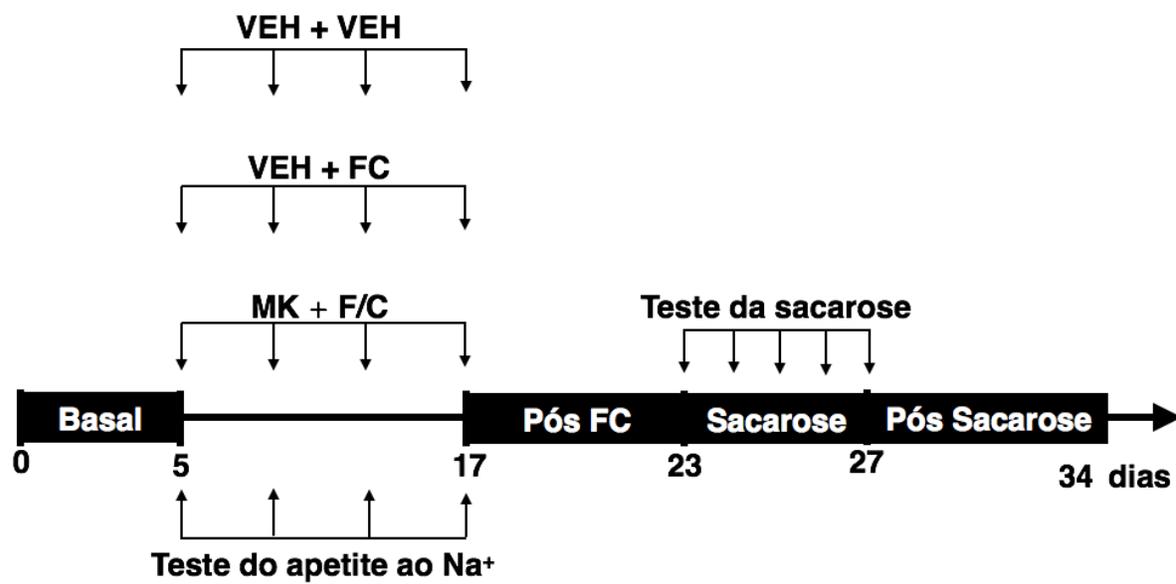
Dezoito animais foram distribuídos em três grupos: MK + FC, o qual recebeu quatro tratamentos de veículo de MK-801 e Furo/Cap ($n = 6$); MK + FC, o qual recebeu quatro tratamentos de MK-801 com Furo/Cap ($n = 5$); VEH + VEH, o qual recebeu quatro tratamentos de veículo de MK-801 e veículo de Furo/Cap ($n = 7$). Foram realizados quatro tratamentos por grupos no total, cada tratamento sendo efetuado com intervalo de dois dias entre eles. Um teste de sacarose foi realizado 5 dias após o último tratamento.



2.7.2. Experimento 2b. Bloqueio dos receptores NMDA combinado com Furo/Cap: efeito na ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M e água.

Os mesmos animais do Experimento 2c foram utilizados para as medidas de ingestão diária. Os animais tiveram acesso diário a um bebedouro de polipropileno contendo água destilada e outro contendo NaCl 0,3 M. A ingestão de cada líquido foi

registrada diariamente.



3. RESULTADOS

3.1. Experimento 1

3.1.1. Experimento 1a. Ingestão espontânea de sacarose em ratos com histórico de depleção de sódio.

Ratos com histórico de depleção de sódio, i.e. grupo teste (n = 8) ingeriram mais NaCl 0,3 M que o grupo controle (n = 8) no 1º e 2º testes de apetite ao sódio (Tabela 3, Apêndice). Além disso, houve um incremento do 1º para o 2º teste do apetite ao sódio na ingestão de NaCl 0,3 M do grupo teste. Houve efeito no tratamento [F (1,28) = 91,1; P < 0,05], e interação entre teste e tratamento [F (1,28) = 4,4; P < 0,05]. Não houve efeito no teste de apetite ao sódio [F (1,1) = 4,1; P = 0,052].

Quando avaliados todos os cinco testes de sacarose nota-se que o grupo teste (n = 8) ingeriu mais sacarose 10% que o grupo controle (n = 8) no 1º e 2º testes de sacarose (Figura 1). Houve efeito no tratamento [F (1,14) = 8,5; P < 0,05] e interação entre tratamento e tempo [F (4,56) = 6,3; P < 0,05]. Não houve efeito no tempo [F (4,56) = 29,7; P < 0,05].

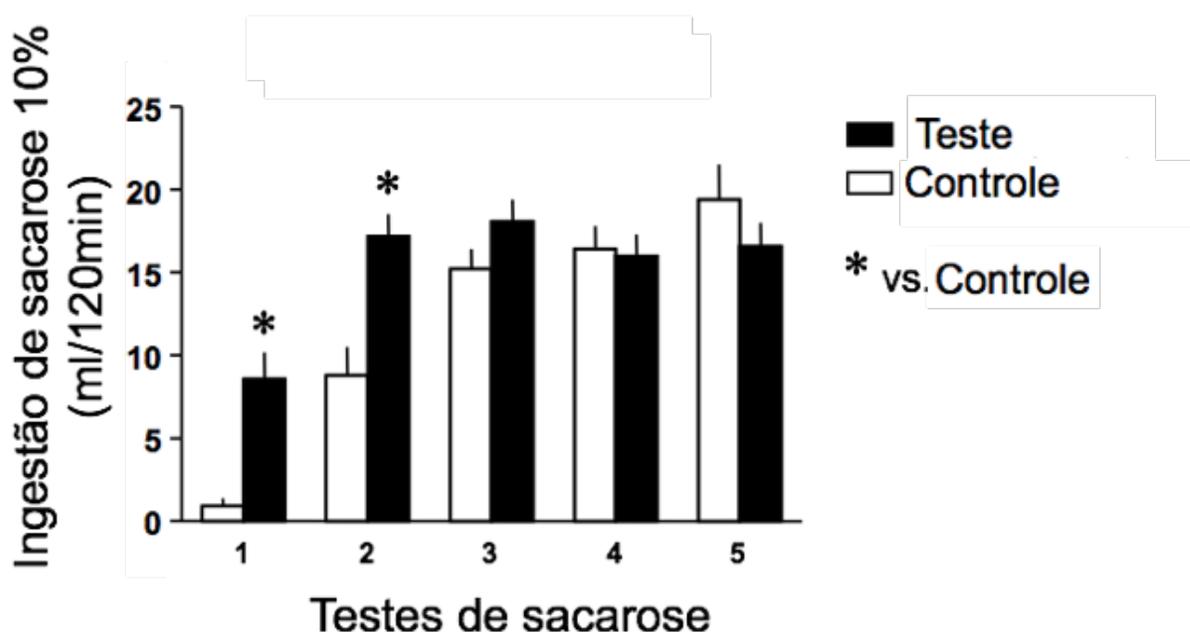


Fig. 1. Ingestão de sacarose de ratos hidratados submetidos a cinco testes de sacarose. O grupo teste teve histórico de depleção de sódio induzida pela combinação da injeção de furosemida com remoção do sódio ambiente por 24 h. O grupo teste também teve experiência de ingerir NaCl 0,3 M nos testes de apetite ao sódio. N = 8/grupo. * P < 0,05 comparado ao controle do mesmo teste de sacarose.

O grupo teste também ingeriu mais sacarose 10% do que o grupo controle aos 15 min do primeiro teste de sacarose quando todos os animais apresentavam inexperiência com o açúcar (Tabela 4, Apêndice). Nesse primeiro teste houve efeito no tratamento [F (1,14) = 7,3; P < 0,05] e tempo [F (4,56) = 9,1; P < 0,05]. Não houve interação entre tratamento e tempo [F (4,56) = 2,4; P = 0,06].

3.1.2. Experimento 1b. Ingestão espontânea de sacarose em ratos com histórico de depleção, com reposição de sódio *i.p.* (sem teste do apetite ao Na⁺).

Quando avaliados todos os cinco testes de sacarose nota-se que os animais teste com histórico de depleção de sódio (n = 7) e seus controles (n = 7), ambos os

quais receberam sódio através de uma carga passiva de sódio, ingeriram quantidades similares de sacarose 10% nos testes de sacarose (Figura 2). Não houve efeito no tratamento [$F(1,12) = 3,1; P = 0,1$] ou interação entre tratamento e tempo [$F(4,48) = 0,7; P = 0,6$]. Houve efeito no tempo [$F(4,48) = 14,8; P < 0,05$].

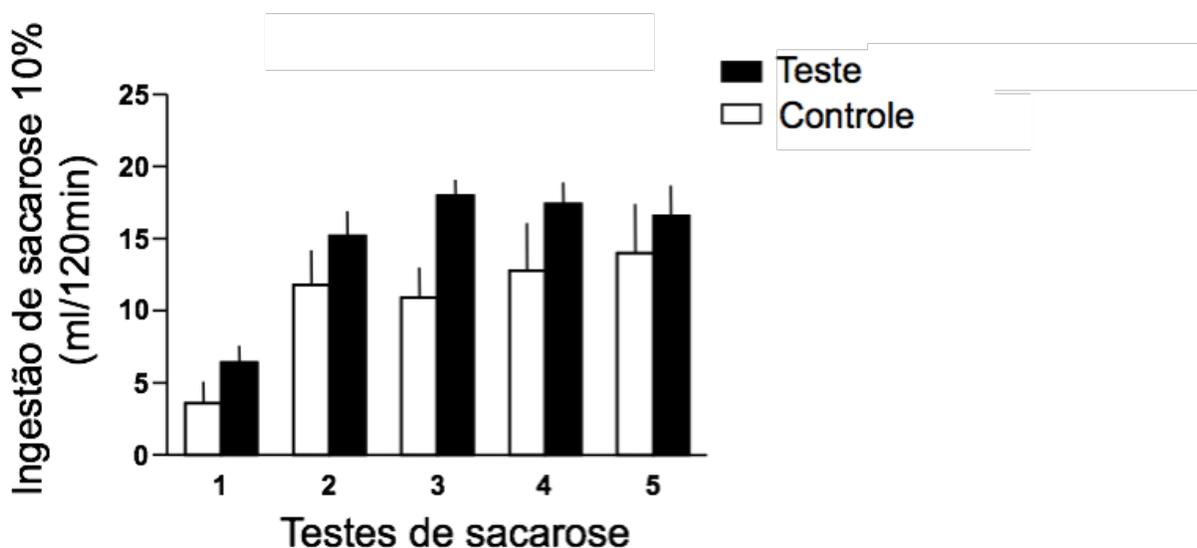


Fig. 2. Ingestão de sacarose de ratos hidratados submetidos a cinco testes de sacarose. Os grupos teste e controle não tiveram experiência com o teste do apetite ao sódio ao final de cada depleção de sódio. $N = 8$ /grupo.

Não houve diferença entre grupo teste e controle quando todos os animais apresentavam inexperiência com o açúcar. Não houve efeito no tratamento [$F(1,12) = 2,0; P = 0,2$] ou interação entre tratamento e tempo [$F(4,48) = 0,8; P = 0,6$] (Tabela 4, Apêndice). Houve efeito para o tempo [$F(4,48) = 8,9; p < 0,001$].

3.1.3. Experimento 1c. *Apetite ao sódio em ratos com histórico de testes de sacarose.*

Animais teste com experiência na ingestão de sacarose ($n = 8$) e controles ($n = 8$) sem experiência ingeriram quantidades similares de NaCl 0,3 M no teste de

apetite ao sódio (Figura 3). Não houve efeito no tratamento [$F(1,14) = 2,2$; $P = 0,16$], e na interação entre tratamento e tempo a [$F(4,56) = 0,5$; $P = 0,75$]. Houve efeito no tempo [$F(4,56) = 25,9$; $P < 0,05$].

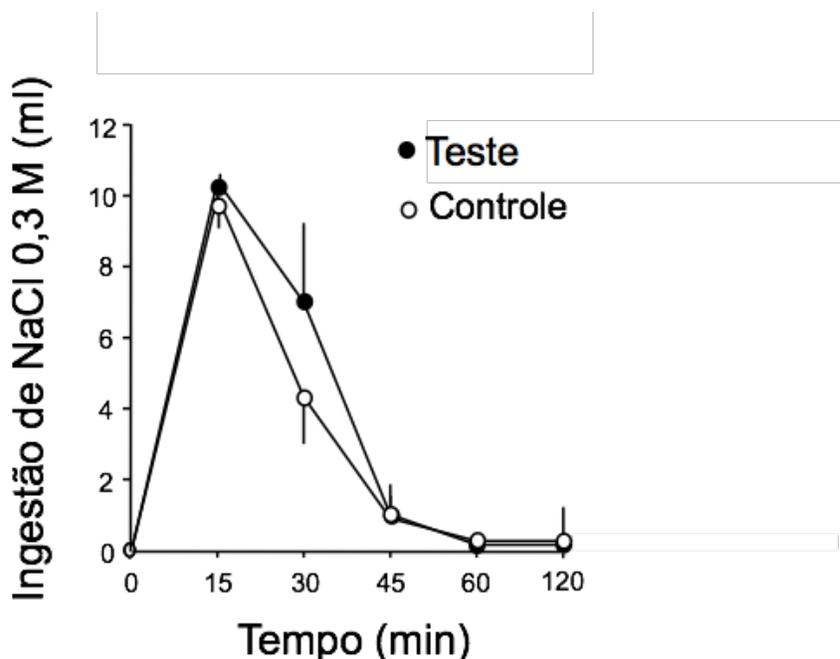


Fig. 3. Ingestão não cumulativa de solução de NaCl 0,3 M de ratos depletados de sódio que tiveram experiência prévia com sacarose 10% (Teste) e ratos os quais não tiveram experiência prévia (Controle). $N = 8$ /grupo.

3.1.4. Experimento 1d. Ingestão de sacarose espontânea em ratos com histórico de desidratações intracelulares.

Ratos com histórico de desidratações intracelulares, i.e. grupo teste ($n = 8$), ingeriram mais água que o grupo controle ($n = 8$) no 1º teste de sede (controle = $1,6 \pm 0,7$ ml vs. teste = $7,9 \pm 1$ ml) e no 2º testes de sede (controle = $1,6 \pm 0,7$ ml vs. teste = $7,9 \pm 1$ ml). Além disso, não houve um incremento na ingestão de água do 1º para o 2º teste de sede do grupo teste. Não houve efeito entre os testes de sede [$F(1,1) = 2,7$; $P = 0,1$]. Houve efeito no tratamento [$F(1,28) = 49,6$; $P < 0,05$] mas não houve interação entre tratamento e testes de sede [$F(1,28) = 0,16$; $P < 0,05$].

Não houve diferença na ingestão de sacarose 10% entre testes com histórico de desidratações intracelulares ($n = 8$) e controles ($n = 8$) nos testes de sacarose (Figura 4). Não houve efeito no tratamento [$F(1,12) = 3,1, P = 0,103$] ou interação entre tratamento e tempo [$F(3,48) = 0,7, P = 0,3$]. Houve efeito no tempo [$F(3,48) = 14,8, P < 0,05$].

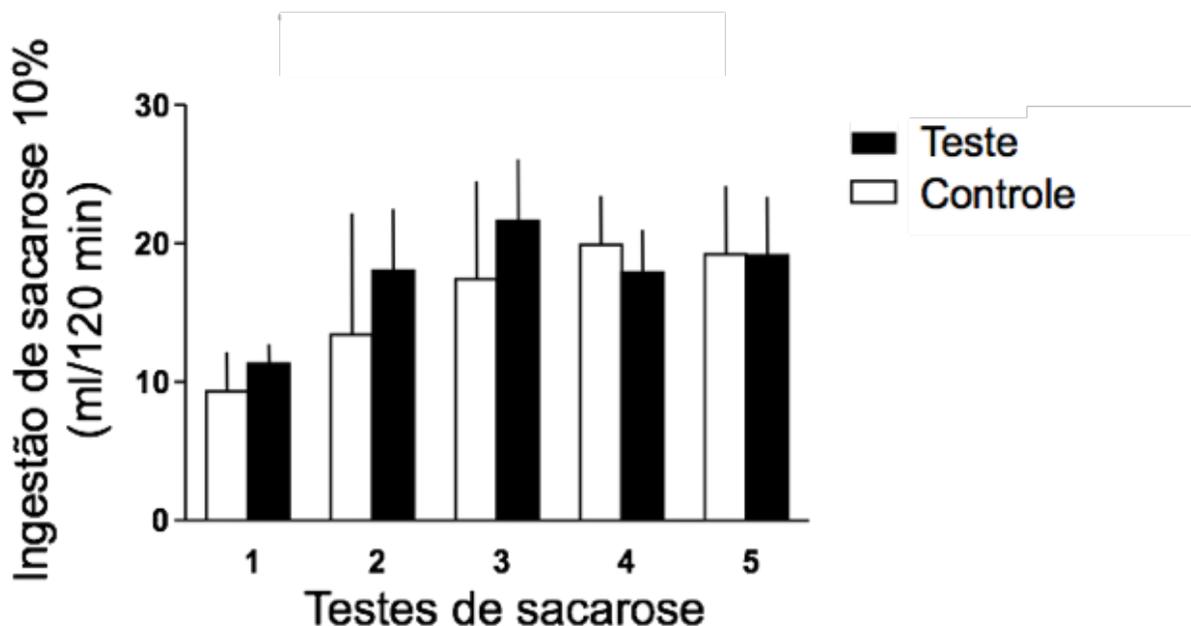


Fig. 4. Ingestão de sacarose medida em ratos hidratados sem indução no início do teste de sacarose. Para o grupo teste foi realizado um histórico de desidratações intracelulares induzidas por gavagem de 2 ml de solução de NaCl 2 M. $N = 8$ /grupo.

Interação entre tratamento e tempo [$F(4,70) = 3,0; P < 0,05$] apareceu no primeiro teste de sacarose quando os animais desconheciam a sacarose (Tabela 4, vide Apêndice). Não houve efeito no tratamento [$F(1,70) = 1,3; P = 0,27$] e houve efeito no tempo [$F(4,70) = 79,0; P < 0,05$].

3.1.5. Experimento 1e. Ingestão de sacarose em ratos com histórico de depleção de sódio: produção de rápido apetite ao sódio.

Ratos com histórico de Furo/Cap, grupo teste (n = 7) ingeriram mais NaCl 0,3 M que o grupo controle (n = 7) no 1º e 2º testes de apetite ao sódio (Tabela 3, Apêndice). Além disso, houve um incremento do 1º para o 2º teste do apetite ao sódio no grupo teste. Houve efeito do tratamento [F (1,12) = 10,2; P < 0,05], entre testes de apetite ao sódio [F (2,24) = 3,8; P < 0,05] e interação entre tratamento e testes de apetite ao sódio [F (2,24) = 3,7; P < 0,05].

O grupo teste com histórico de Furo/Cap (n = 7) ingeriu mais sacarose 10% do que o grupo controle (n = 7) nos testes de sacarose (Figura 5). Houve interação entre tratamento e tempo [F (4,48) = 2,8; P < 0,05]. Não houve efeito do tratamento [F (1,12) = 1,9; P = 0,2]. Houve efeito no tempo [F (4,48) = 4,9; P < 0,05].

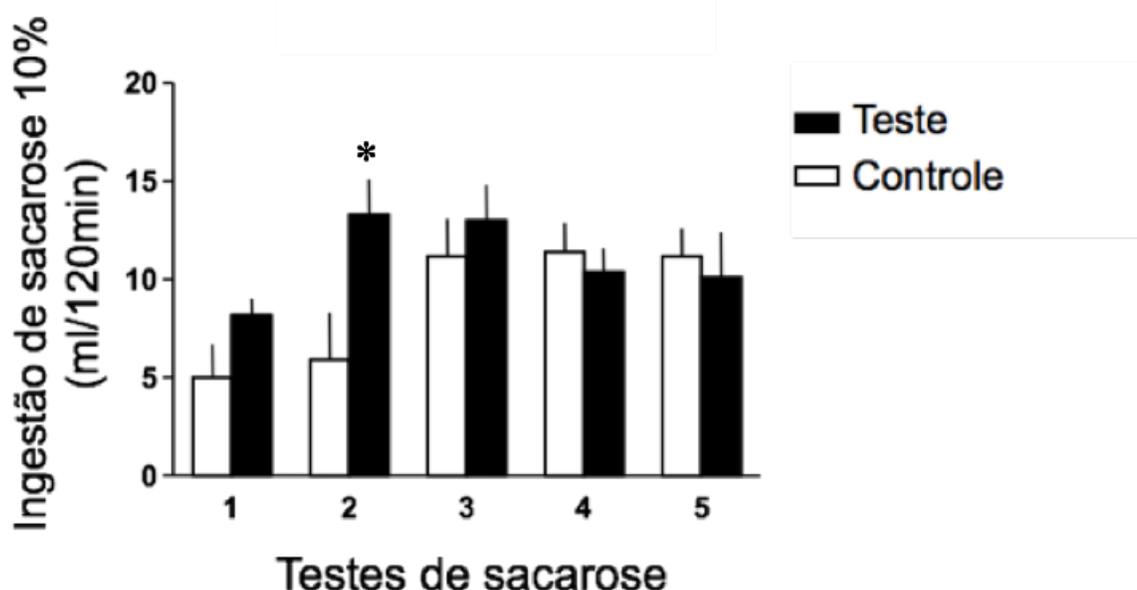


Fig. 5. Ingestão de sacarose medida em ratos hidratados sem indução no início do teste de sacarose. Para o grupo teste teve histórico de depleções de sódio induzido por Furo/Cap. O grupo teste também tinha experiência na ingestão rápida de NaCl 0,3 M ocorrida no teste de apetite ao sódio em resposta ao Furo/Cap. * P < 0,05 comparado ao grupo controle. N = 7/grupo.

Animais testes ingeriram mais solução de sacarose 10 % que os controles nos 15 min iniciais do primeiro teste da sacarose quando os animais ainda desconheciam a sacarose (Tabela 4, Apêndice). Houve efeito significativo no tratamento [F (1,12) = 16,5; P < 0,05], tempo [F (4,48) = 23,7; P < 0,05] e interação entre tratamento e tempo [F (4,48) = 7,4; P < 0,05].

3.1.6. Experimento 1f. Análise bioquímica sanguínea em ratos com histórico de rápido apetite ao sódio.

O histórico de três ou somente um Furo/Cap não teve efeito significativo na bioquímica sanguínea em relação aos animais controle tratados com apenas veículo (Tabela 5, Apêndice). Não houve diferença na concentração sérica de sódio [F (2,20) = 0,9, P = 0,43], potássio [F (2,20) = 0,7, P = 0,51], proteínas totais [F (2,20) = 2,2, P = 0,14], glicose [F (2,20) = 2,0, P = 0,17] e triglicérides [F (2,20) = 1,5, P = 0,25] entre os grupos. Também não houve diferença na atividade de renina plasmática ou ARP [F (2,20) = 0,1, P = 0,93].

3.2. Experimento 2

3.2.1. Experimento 2a. Efeito do bloqueio de receptores NMDA combinado com Furo/Cap no teste da sacarose.

Ratos do grupo MK + FC (n = 5) e do grupo VEH + FC (n = 6) ingeriram mais NaCl 0,3 M que o grupo controle VEH + VEH (n = 7) no 1º, 2º, e 4º testes de apetite ao sódio (Tabela 3, Apêndice). O grupo VEH + FC apresentou ingestão diferente de NaCl 0,3 M comparada ao grupo MK + FC no 1º, 3º e 4º testes de apetite ao sódio. No 3º teste de apetite ao sódio, somente o grupo VEH + FC ingeriu significativamente mais NaCl 0,3 M que o grupo VEH + VEH. Houve efeito no tratamento [F (2,3) = 75,7; P < 0,05], teste [F (3,60) = 8,6; P < 0,05] e interação entre tratamento e tempo

[F (6,60) = 4,7; P < 0,05].

O histórico de veículo com Furo/Cap (VEH + FC, n = 6) aumentou a ingestão de sacarose 10% nos 15 min iniciais do teste de sacarose comparado ao histórico de MK-801 e Furo/Cap (MK + FC, n = 5) ou somente veículo (VEH + VEH, n = 7), em quando os ratos estavam sem experiência prévia com sacarose (Figura 6). Não houve diferença entre MK + FC e VEH + VEH. Houve efeito no tratamento [F (2,15) = 5,9, P < 0,05] e tempo [F (3,45) = 19,4, P < 0,05]. Não houve interação entre tratamento e tempo [F (6,45) = 1,4, P = 0,3].

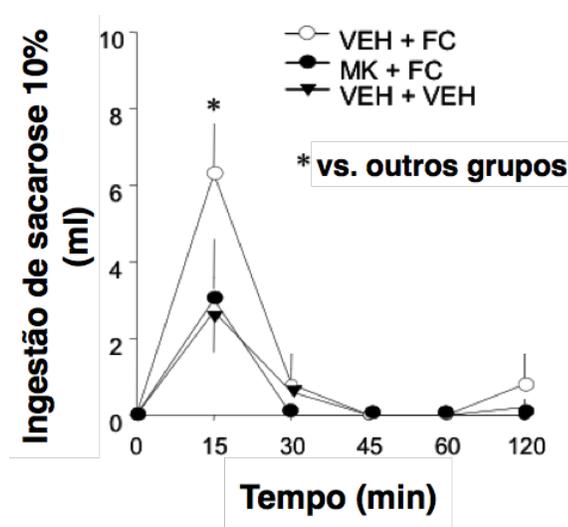


Fig. 6. Ingestão não cumulativa de sacarose 10% medida em animais hidratados. O grupo FC teve histórico de depleções induzidas por Furo/Cap combinadas com veículo de antagonista NMDA (VEH + FC, n = 6) ou o antagonista NMDA MK-801 (MK + FC, n = 5). Um grupo tinha somente histórico de veículo de MK-801 combinado com veículo de Furo/Cap (VEH + VEH, n = 7). N = 7/grupo. *P < 0,05 comparado ao controle do mesmo teste de sacarose.

3.2.2. Experimento 2b. Bloqueio dos receptores NMDA combinado com Furo/Cap: efeito na ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M e água.

Análise dos blocos Basal e Pós FC: sensibilização na ingestão diária de sódio e

sódio.

A ingestão de NaCl 0,3 M do grupo VEH + FC (n = 6) no bloco Pós FC aumentou comparado a sua ingestão no bloco Basal. VEH + FC também ingeriu mais NaCl 0,3 M do que o grupo VEH + VEH (n = 5) no bloco Pós FC (Figura 7, esquerda). Houve diferença significativa entre tratamentos [F (1, 11) = 5,96; P < 0,05] e blocos [F (1,11) = 16,6; P < 0,05]. Não houve interação entre tratamento e bloco [F (1,11) = 2,2; P = 0,2].

A ingestão de água do grupo VEH + FC (n = 6) e do grupo VEH + VEH (n = 7) não foi alterada (Figura 7, direita). Não houve diferença significativa entre tratamento [F (1, 11) = 0,1; P = 0,7], blocos [F (1,10) = 0,225; P = 0,6] ou interação entre tratamento e bloco [F (1,10) = 0,007; P = 0,9].

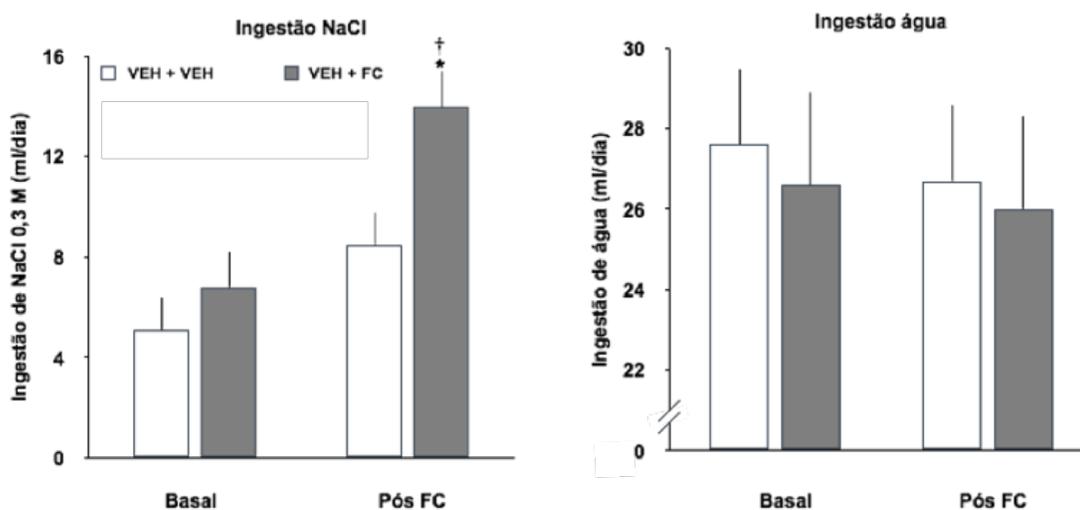


Fig. 7. Ingestão média diária de NaCl 0,3 M e água dos grupos VEH + VEH (n = 7) e VEH + FC (n = 6), nos blocos Basal e Pós FC. * vs. Basal, respectivo grupo; † vs. VEH + VEH. P < 0,05.

A ingestão diária de NaCl 0,3 M do grupo MK + FC (n = 5) no bloco Pós FC (17,1 ± 1,5 ml) aumentou comparado ao bloco Basal (4,9 ± 1,6 ml). t = -7,693 com 4

GL, $P < 0,05$ (Figura 8, esquerda). A ingestão diária de água do grupo MK + FC ($n = 5$) no bloco de dias Pós FC ($25,3 \pm 1$ ml) diminuiu comparado ao bloco Basal ($22,3 \pm 1,1$ ml). $t = 2,8$ com 4 GL, $P < 0,05$ (Figura 8, direita).

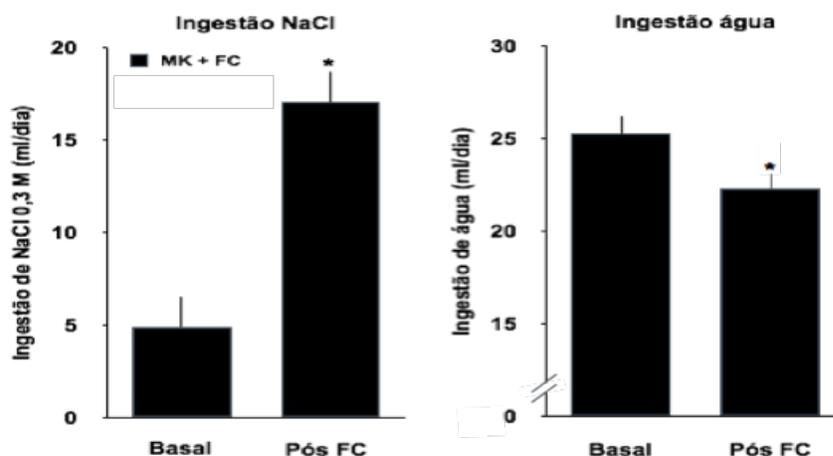


Fig. 8. Ingestão média diária de solução de NaCl 0,3 M e água do grupo MK + FC nos blocos Basal e Pós FC. $N = 5$. * vs. Basal. $P < 0,05$.

Análise dos blocos Pós FC, Sacarose e Pós Sac: efeito da ingestão de sacarose na ingestão diária de sódio e água.

O grupo VEH + VEH não alterou sua ingestão tanto de NaCl 0,3 M quanto de água durante todo o período, i.e. os blocos de dias Pós FC (antes do acesso à sacarose), Sacarose e Pós Sac (Figura 9). Não houve diferença estatística entre os blocos tanto para a solução de NaCl 0,3 M [$F(6,2) = 0,8$; $P = 0,48$] quanto para a água [$F(6,2) = 1,3$; $P = 0,3$].

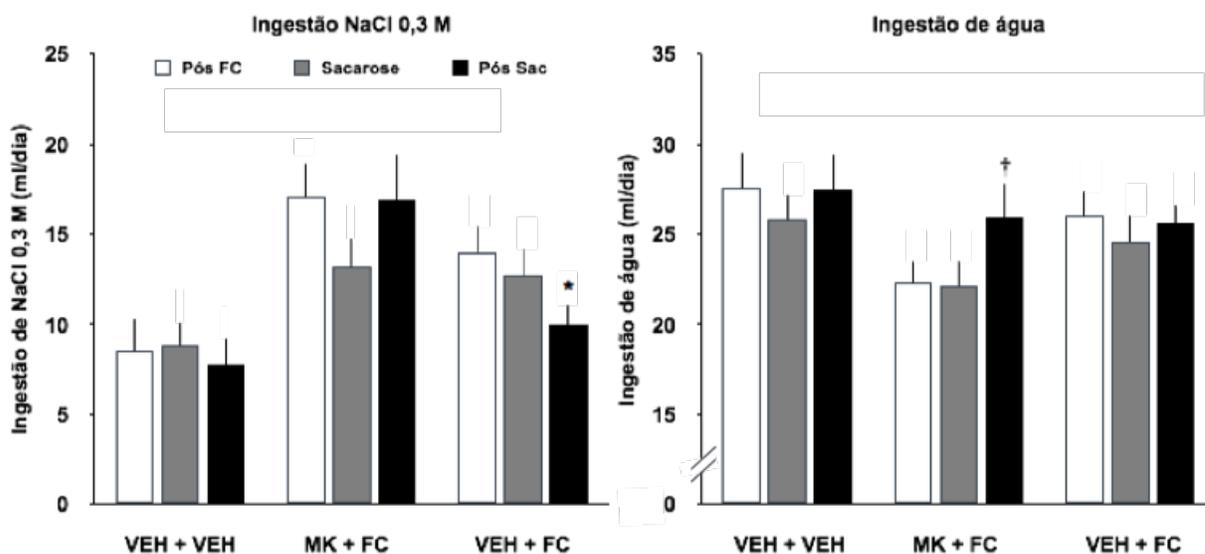


Fig. 9. Ingestão média diária de NaCl 0,3 M e água dos grupos VEH + VEH (n = 7), MK + FC (N = 5) e VEH + FC (n = 6) nos blocos Pós FC (antes do acesso à sacarose), Sacarose e Pós Sac. * vs. Pós FC, respectivo grupo. † vs. Pós FC e Sacarose. P < 0,05. N = 5 - 7/grupo.

O grupo MK + FC (n = 5) não alterou sua ingestão de NaCl 0,3 M durante o período analisado (Figura 9, esquerda). Não houve diferença entre os blocos para a solução de NaCl 0,3 M [F (4,2) = 1,76; P = 0,23]. Houve um aumento na ingestão de água no último bloco do período, i.e. Pós FC, comparado aos outros períodos analisados. Houve diferença significativa entre os blocos [F (4,2) = 10,5; P < 0,05].

A ingestão de NaCl 0,3 M do grupo VEH + FC (n = 6) diminuiu no bloco Pós Sac comparado com os blocos Pós FC e Sacarose (Figura 9, esquerda). Houve diferença significativa entre os blocos [F (5,2) = 6,6; P < 0,05]. Não ocorreu alteração na ingestão de água do grupo entre os blocos [F (5, 2) = 0,3; P = 0,70].

TABELAS

Tabela 1. Efeitos da sensibilização ao sódio similares aos evidenciados para as drogas de abuso.

| Efeito das drogas de abuso | | Sódio | Referências |
|--|---------------|---|----------------------------------|
| Sensibilização cruzada com drogas de abuso | Cocaína | Sensibilização cruzada recíproca (aumento da resposta locomotora em ratos). | (ACERBO e JOHNSON, 2011) |
| | Anfetamina | Aumento na locomoção em ratos. A sensibilização ao sódio aumentou a ramificação dendrítica no NAcc de forma parecida com a encontrada em animais sensibilizados a anfetamina. | (ROITMAN <i>et al.</i> , 2002) |
| Síndrome da abstinência | | Alimentos perdem o sabor em uma alimentação sem sódio. | (TEKOL, 2006) |
| Dose e duração de uso. | (TEKOL, 2006) | 11,7 mg/ 24 h de sódio - índios Yanomami. Maioria das outras populações ingerem 1000 vezes mais. A ingestão excessiva normalmente se mantém por toda a vida do indivíduo. | (TEKOL, 2006) |
| Desejo pela droga e dificuldade em diminuir seu consumo. | | Pacientes hipertensos tiveram dificuldades em seguir os conselhos na ingestão moderada de sal. | (EVERS <i>et al.</i> , 1987) |
| | | Os conselhos de uma dieta saudável para pacientes hipertensos não alterou a ingestão de sal, somente a quantidade calórica ingerida diariamente. | (KORHONE N <i>et al.</i> , 2003) |

Tabela 2. Efeitos da ingestão de comidas palatáveis similares aos evidenciados para drogas de abuso.

| Efeitos das drogas de abuso | Alimentos palatáveis | Referências |
|--|---|--|
| Aumento de dopamina no Sistema Límbico. | Aumento na liberação de dopamina no sistema límbico. | (RADA <i>et al.</i> , 1999); (HAJNAL, SMITH e NORGREN, 2004) |
| | Aumento nos níveis de dopamina no sistema límbico em animais que recebiam comida como recompensa. | (HERNANDEZ e HOEBEL, 1988) |
| Síndrome da abstinência | Quando privados por 24h de alimento: sinais de ansiedade e comportamento depressivo. | (AVENA, RADA e HOEBEL, 2006) |
| Sensibilização cruzada (binge intermitente diário de açúcar) | Aumenta ingestão de álcool. | (AVENA, N. M. e HOEBEL, B. G., 2003); (AVENA <i>et al.</i> , 2004) |
| | Aumenta os efeitos locomotores da anfetamina. | |

Tabela 3. Ingestão de NaCl 0,3 M nos testes de apetite ao sódio em função do protocolo de depleção de sódio.

| Protocolo | Grupo | Teste de apetite ao Na ⁺ (ml/15 min iniciais) | | | |
|--------------------------|-----------|--|------------------------|------------|-----------|
| | | 1º | 2º | 3º | 4º |
| Depleção Na ⁺ | Teste | 8,0 ± 1,8* | 13,6 ± 0,9*† | - | - |
| | Controle | 0,5 ± 0,2 | 0,0 ± 0,0 | - | - |
| Furo/Cap | Teste | 2,4 ± 0,8 | 5,0 ± 1,1*† | 4,5 ± 0,8† | - |
| | Controle | 0,3 ± 0,2 | 1,0 ± 0,6 | 2,9 ± 0,8 | - |
| | MK + FC | 7,2 ± 1,6 | 3,3 ± 0,8 | 1,9 ± 0,5 | 3,7 ± 0,7 |
| MK + FC | VEH + FC | 5,0 ± 0,6 | 6,7 ± 0,9 ^α | 4,3 ± 0,6 | 6,7 ± 1,0 |
| | VEH + VEH | 0,0 ± 0,0 | 0,1 ± 0,0 | 0,1 ± 0,1 | 0,1 ± 0,1 |

* vs. Controle, respectivo teste de apetite ao Na⁺; † vs. 1º teste de apetite ao Na⁺, respectivo grupo; ^α vs. VEH + FC, respectivo teste de apetite ao Na⁺. P < 0,05. N = 5 - 8 animais/grupo.

Tabela 4. Ingestão não cumulativa de solução de sacarose 10% em ratos que desconheciam o sabor da sacarose no primeiro teste da sacarose. Os animais tiveram (Teste) ou não (Controle) histórico de episódios de depleção de sódio.

| Histórico | Grupo | Tempo (min) | | | | |
|--|----------|-------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| | | 15 | 30 | 45 | 60 | 120 |
| Depleção Na ⁺ | Controle | 1,9 ± 1,0 | 0,8 ± 0,5 | 0,1 ± 0,1 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| | Teste | 5,9 ± 1,6* | 1,1 ± 0,9 | 1,3 ± 0,8 | 0,3 ± 0,3 | 0,0 ± 0,0 |
| Furo/Cap | Controle | 2,5 ± 1,5 | 0,6 ± 0,4 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 1,2 ± 0,8 |
| | Teste | 7,3 ± 0,7* | 0,8 ± 0,3 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| Depleção Na ⁺ s/ sabor Na ⁺ | Controle | 3,5 ± 1,5 | 0,2 ± 0,2 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| | Teste | 3,4 ± 1,1 | 1,0 ± 0,3 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 1,9 ± 0,9 |
| 2 M NaCl (gavagem) | Controle | 6,9 ± 1,4 | 2,3 ± 1,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 |
| | Teste | 9,8 ± 0,6 | 1,4 ± 0,4 | 0,0 ± 0,0 | 0,0 ± 0,0 | 0,1 ± 0,1 |

* P < 0,05 vs. respectivo Controle. N = 7- 8/grupo.

Tabela 5. Análise de bioquímica sanguínea 10 dias após o último tratamento com Furo/Cap (FC) ou veículo.

| Histórico | [Na ⁺] mmol/l | [K ⁺] mmol/l | PTS g% | ARP ngml/h | Glicose mg/dl | TGL mg/dl |
|-----------|------------------------------|-----------------------------|-----------|---------------|------------------|--------------|
| Veículo | 139,7 ± 0,7 | 7,4 ± 0,4 | 7,1 ± 0,1 | 2,8 ± 0,3 | 141,7 ± 4,4 | 100,3 ± 7,2 |
| 1 FC | 139,3 ± 0,7 | 8,0 ± 0,2 | 7,4 ± 0,1 | 2,9 ± 0,5 | 133,5 ± 4,5 | 113,6 ± 8,8 |
| 3 FC | 138,5 ± 0,5 | 7,8 ± 0,4 | 7,4 ± 0,1 | 2,7 ± 0,3 | 131,6 ± 2,1 | 119,1 ± 6,9 |

[Na⁺] e [K⁺], concentração de sódio e potássio sérico, respectivamente; PTS, proteína total sérica; ARP, atividade de renina plasmática; TGL, triglicérides. N = 7 – 8 animais/grupo.

5. DISCUSSÃO

Foi examinado o efeito do histórico de depleções de sódio ou desidratações extracelulares na ingestão espontânea de sacarose 10% em ratos adultos. Episódios repetidos de depleções de sódio produziram um aumento na ingestão de sacarose 10% em animais sem experiência com ingestão desse açúcar.

Os dois protocolos utilizados para induzir depleção de sódio, furosemida + 24 h de remoção de sódio ambiente (apetite ao sódio “maduro”) e Furo/Cap (apetite ao sódio “rápido”), foram capazes de induzir aumento na ingestão de sacarose 10% quando os animais entraram pela primeira ou segunda vez no teste de sacarose. O efeito no aumento da ingestão de sacarose desapareceu quando o sódio perdido foi repostado através de uma carga passiva ministrada intraperitonealmente ao invés de repostado através de ingestão de sódio. O histórico de desidratações intracelulares induzidas por gavagem de solução de NaCl hipertônico não foi eficaz para aumentar a ingestão de sacarose em animais inexperientes com sacarose.

A depleção induzida por Furo/Cap induziu esperado aumento na ingestão diária de NaCl 0,3 M que não foi alterada pela combinação do Furo/Cap com o MK-801, antagonista de receptor glutamatérgico NMDA. Entretanto, o MK-801 combinado ao Furo/Cap impediu o aumento na ingestão de sacarose 10% em animais inexperientes ao açúcar. Os dias de teste de sacarose interferiram com a ingestão diária de sódio, diminuindo a mesma apenas no grupo com histórico de Furo/Cap, sem MK-801. O tratamento repetido com Furo/Cap não produziu mudanças significativas na concentração sérica de glicose, triglicérides, sódio, potássio, e proteínas totais. Também não houve alteração na atividade de renina plasmática.

Os resultados indicam três importantes aspectos até então desconhecidos sobre alterações plásticas do comportamento associadas a histórico de desidratação. O primeiro aspecto foi o incremento na ingestão de sacarose 10% e sua dependência de receptores NMDA. O segundo aspecto decorreu dos resultados do primeiro, ou seja, o incremento induzido na ingestão diária de NaCl 0,3 M foi afetado

pelos testes de sacarose. O terceiro aspecto foi a ineficácia do MK-801 em impedir a sensibilização da ingestão diária de NaCl 0,3 M.

De acordo com os resultados podemos sugerir pelo menos cinco características para incremento na ingestão de sacarose 10%: dependência de experiência com ingestão de sódio; não reciprocidade, isto é, experiência com sacarose 10% não provocou incremento na ingestão de sódio; seletividade para o histórico de desidratações extracelulares; independência de alterações bioquímicas sanguíneas. Além disso, a produção de incremento na ingestão de sacarose 10% em resposta a depleções de sódio parece depender da ativação de receptores NMDA.

Os resultados sugerem que a experiência de ingerir sódio no teste do apetite ao sódio influencia o incremento na ingestão de sacarose 10%. Ainda parece ser controverso o papel da experiência com ingestão de sódio para se produzir sensibilização no apetite ao sódio e por extensão talvez o seja para o incremento observado na ingestão de sacarose. Por um lado observamos que a experiência com a ingestão de sódio parece ter sido um fator decisivo para o incremento na ingestão espontânea de sacarose 10%. Esse resultado contrasta com a ausência de efeito na sensibilização do apetite ao sódio quando os animais passaram por um protocolo semelhante ao executado nesta dissertação para evitar a ingestão de sódio no teste do apetite ao sódio (SAKAI *et al.*, 1987). Entretanto, outros autores tem sugerido que não se pode ainda descartar o papel do sabor do sódio na sensibilização do apetite ao sódio (DIETZ, CURTIS e CONTRERAS, 2006). Foi observado que a quantidade de lambidas produzidas pelo animal depletado de sódio no período inicial (10 s) de ingestão de solução de NaCl sozinha ou combinada com sacarose foi maior comparada ao grupo controle, mas, em condições normovolêmicas a quantidade de lambidas do grupo teste se manteve igual a do grupo controle. Apesar deste mesmo padrão de lambidas ter sido mantido após a repetição das depleções, os autores acham que a experiência recompensadora do sabor não pode ser descartada. De qualquer modo, a ingestão da sacarose foi dependente do acesso ao sabor do sódio conforme observado no Experimento 1b.

A informação sensorial do sabor do sódio e do açúcar está representada de modo complexo e interativo no tronco encefálico, ao ponto que campos sensoriais

primários sensíveis ao açúcar pode estar mais ativos quando o sódio é aplicado na cavidade oral de ratos com apetite ao sódio (MCCAUGHEY e SCOTT, 2000). Não conhecemos evidência de que experiência com um sabor possa aumentar efeito de outro e portanto fica em aberto decifrar como a ingestão de NaCl 0,3 M possa afetar a ingestão posterior de sacarose 10% em ratos com experiência de depleção de sódio.

Outro ponto com relação ao incremento na ingestão de sacarose 10% produzido pelo histórico de depleções de sódio é que esta sensibilização não foi recíproca. Como observado nos trabalhos de (ACERBO e JOHNSON, 2011; CLARK e BERNSTEIN, 2004), a depleção de sódio pode sensibilizar a atividade locomotora induzida pela cocaína e anfetamina, e vice-versa, cocaína e anfetamina foram capazes de sensibilizar o apetite ao sódio. Entretanto, o histórico de acesso limitado diário de sacarose por 5 dias não foi capaz de alterar a intensidade do apetite ao sódio.

Não podemos por enquanto descartar a possibilidade de que a ausência de efeito recíproco esteja relacionada ao protocolo que usamos. Diferentemente do presente trabalho em que a sacarose foi oferecida a animais alimentados e hidratados, alguns trabalhos (AVENA, N. M. e HOEBEL, B. G., 2003); (AVENA *et al.*, 2004)) tem mostrado sensibilização cruzada entre a sacarose e o álcool, e entre a sacarose e a anfetamina. O protocolo que eles usaram funcionou apenas quando a sacarose foi ingerida em resposta a um protocolo de “binge” (ingestão rápida de grande quantidade de alimento durante um período ou intervalo breve de acesso) produzido através do regime intermitente de privação parcial de alimento alternada com acesso limitado ao açúcar.

O histórico de desidratação intracelular não foi capaz de aumentar a ingestão espontânea de sacarose 10%. Tal histórico também não produziu incremento na ingestão de água. Por outro lado, os dois protocolos que produzem desidratação extracelular (furosemida + 24 de remoção de sódio ambiente e Furo/Cap) foram capazes de produzir o incremento na ingestão de sacarose. Assim parece que o efeito do histórico de desidratação é seletivo para desidratação extracelular. Talvez porque esses protocolos produzam surtos de aumento da ANG II, responsável pela

sensibilização da ingestão de sódio (SAKAI et al., 1987; PEREIRA et al., 2010).

Outro item avaliado sobre o incremento na ingestão de sacarose 10% foi verificar se o histórico de depleção de sódio estaria associado a mudanças bioquímicas sanguíneas. Foi observado que não ocorreu diminuição na concentração sérica do íon sódio e potássio. Assim o efeito natriurético da depleção de sódio não resultou em animal hiponatrêmico ou hipocalêmico. A quantidade de proteínas totais no sangue também se manteve igual ao grupo controle, sugerindo ausência de alterações no volume sanguíneo. A quantidade de proteínas totais no sangue também se manteve igual ao grupo controle. A atividade de renina plasmática também não foi alterada, fortalecendo a possibilidade que não tenha ocorrido aumento na quantidade de Ang II circulante. Esses dados iônicos, volêmicos e hormonais estão de acordo com o que SAKAI *et al.* (1989, p. 186) observaram com relação do protocolo de furosemida + remoção de sódio ambiente.

Foi também analisada a concentração de glicose e triglicérides, fatores que poderiam alterar a ingestão de sacarose dado que ambos afetam a secreção de hormônios, por exemplo insulina e glicocorticoides, que controlam tanto o metabolismo glicídico como a ingestão alimentar (UCHOA *et al.*, 2012; GEISELMAN e NAVIN, 1982). Os resultados sugerem, ao menos de modo preliminar, que alterações no metabolismo energético não foram responsáveis pelo incremento na ingestão de sacarose 10%.

Nosso estudo também trabalhou com a hipótese de que a ativação de receptores glutamatérgicos NMDA em resposta a depleção de sódio possa ser responsável pelo incremento inicial na ingestão de sacarose. Tem sido mostrado ativação glutamatérgica envolvida com neuroplasticidade e recompensa (JOHNSTON, 2009a). Um exemplo deste envolvimento é o efeito inibidor que o MK-801, antagonista de receptor NMDA, exerce sobre a sensibilização do reflexo nociceptivo de retirada (CLARKE E HARRIS, 2004). Em trabalho recente (HURLEY e JOHNSON, 2013) o MK-801 inibiu a sensibilização do apetite ao sódio produzida pelo histórico de Furo/Cap. Aceitando esta evidência e de que a sensibilização da

ingestão de sódio pode compartilhar mecanismos de recompensa com outros estímulos (ACERBO e JOHNSON, 2011; CLARK e BERNSTEIN, 2004) como a cocaína e anfetamina, há a possibilidade de que receptores NMDA estejam envolvidos com o incremento na ingestão de sacarose 10% produzida pelo histórico de Furo/Cap.

É possível que, além do glutamato, outros hormônios e neurotransmissores, importantes para o incremento na ingestão de sódio, estejam também envolvidos neste incremento na ingestão de sacarose. Por exemplo, a depleção de sódio com pré tratamento de antagonista de Ang II e Aldo, hormônios envolvidos com o controle do balanço hidroelétrólítico, inibe o aumento da ingestão de sódio. Isso demonstra que a ação tanto da angiotensina como da aldosterona é de grande importância para o incremento na ingestão de sódio, no caso, tanto espontânea quanto induzida (SAKAI *et al.*, 1987; PEREIRA *et al.*, 2010). Além disso, injeções repetidas de vasopressina icv foram capazes de aumentar a ingestão espontânea de NaCl sem produzir desbalanço no equilíbrio hidroelétrólítico, mostrando que a ação vasopressinérgica também está envolvida no incremento na ingestão de sódio (MCBRIDE e FLYNN, 2007). Além do glutamato, outro neurotransmissor potencialmente envolvido com sensibilização da ingestão de sódio e talvez da ingestão de açúcar é a dopamina. Antagonismo de receptor de dopamina raclopride injetado por infusão gástrica inibiu o apetite ao sódio (ROITMAN *et al.*, 1997). Além disso, a indução da ingestão de sacarose em binge é capaz de aumentar os níveis de dopamina no NAcc no período inicial de aquisição da sacarose (RADA, AVENA e HOEBEL, 2005).

O segundo aspecto importante desta Dissertação foi a descoberta de que os testes de sacarose interferem com o incremento produzido na ingestão diária de NaCl 0,3 M. A redução que os testes de sacarose produziram apenas na ingestão de sódio dos animais com histórico de Furo/Cap sugere uma interação inesperada que vai no sentido contrário a fenômenos de sensibilização. O efeito na diminuição na ingestão de sódio foi evitado pela combinação do MK-801 com o Furo/Cap e se

manteve mesmo após a retirada da sacarose.

O efeito do teste de sacarose sobre a ingestão diária de sódio se assemelha a um efeito conhecido como contraste antecipatório. O contraste antecipatório é produzido após o período de treinamento de ingestão de duas soluções de sabor doce, uma solução menos saborosa seguida da apresentação de outra solução mais saborosa, sem ter relação com a diferença calórica entre as soluções (FLAHERTY e ROWAN, 1985 e 1986). Nestes trabalhos foram utilizadas baixas concentrações de sacarina ou sacarose, seguidas pelo acesso a soluções de alta concentração de sacarina ou sacarose. O aumento na ingestão dos estímulos mais “fortes” (mais concentrado, e portanto mais saboroso) se deve a uma predição futura de seu acesso o que conseqüentemente diminuiu a ingestão do estímulo mais fraco. No caso, a ingestão de sacarose, um estímulo “forte”, pode ter produzido o mesmo efeito de predição futura nos animais sensibilizados ao apetite ao sódio. Apesar da semelhança de efeitos no que se refere à ingestão de um estímulo reduzindo a ingestão de outro, devemos considerar que o contraste antecipatório requer que o pareamento entre os sabores seja feito dentro de um intervalo máximo de 15 minutos. O intervalo entre o teste de ingestão de sacarose, realizado no período da manhã, e a ingestão de NaCl 0,3 M deve ter sido supostamente de várias horas considerando que a maior parte da ingestão de sódio é normalmente feita pelo rato durante o período noturno. Além disso, existem dúvidas de quanto o contraste antecipatório resulta de diferenças no valor hedônico ou de recompensa, calórico ou mesmo de sabor entre as soluções (MOSS, CLARKE e KEHOE, 2002).

Talvez seja interessante especular como a recompensa da ingestão da sacarose poderia ter influenciado na recompensa da ingestão de sódio diária. O efeito recompensador de um estímulo pode ser dividido em duas variáveis o “querer”, ou o “gostar”. O “querer” é a recompensa produzida pelas pistas preditivas. Pistas como o sabor, o cheiro e a própria imagem do alvo podem desencadear o “querer” do animal. O “gostar” é o processo comportamental e psicológico que produz uma resposta subjetiva do prazer produzido pelo adquirido (BERRIDGE, 2009). Sabe-se que o efeito recompensador do NaCl envolve mais o “querer” que o “gostar” (CLARK e BERNSTEIN, 2006). Assim, em estado normovolêmico, ratos com histórico de

depleção de sódio estão “querendo” mais o sódio, sem o aumento do fator “gostar”. Como demonstrado por ele, não houve alteração nas respostas comportamentais reativas ao sabor salgado em animais com histórico de depleção (“gostar”), mas o aumento no ponto onde os animais param de responder para o recebimento da recompensa (“querer”). Levando isto em consideração, o estudo do quanto a sacarose em animais com histórico de depleções de sódio é “querida” ou “gostosa” quanto de sódio, após o período de apresentação de sacarose, pode sugerir se o fator recompensador da sacarose pode interferir no fator recompensador do sódio. Não podemos esquecer também que o MK impediu esta diminuição na ingestão de sódio espontânea diária. Sabendo-se de seu papel neuroplástico, podemos supor que o MK também é capaz de “fortalecer” a ingestão espontânea diária de sódio de tal forma que a ingestão de sacarose não possa inibi-la.

O terceiro aspecto que gostaríamos de salientar foi a ineficácia do MK-801 em impedir a sensibilização da ingestão diária de NaCl 0,3 M. Um dos efeitos do histórico de depleções de sódio é a sensibilização na ingestão diária espontânea de sódio (PEREIRA *et al.*, 2010). Conforme já mencionado, o MK-801 é capaz de diminuir a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio (HURLEY *et al.*, 2014). Entretanto, o tratamento de MK-801 combinado ao histórico de depleções com Furo/Cap não produziu efeito algum na sensibilização da ingestão espontânea diária de NaCl 0,3 M.

Outros trabalhos sugerem uma diferença na sensibilização do apetite ao sódio induzida pela depleção de sódio e a ingestão diária de sódio. Em ratos Holtzman, o histórico de privação de água aumentou os dois tipos de ingestão de sódio (DE LUCA JR. *et al.*, 2010). Ratos SHR (ratos espontaneamente hipertensos) tiveram um “fraco” incremento no teste do apetite ao sódio induzido por PA-RP comparado com outras linhagens mas não produziram sensibilização na ingestão diária espontânea de sódio, o que foi contrário ao visto para os animais na linhagem Wistar-Kyoto que tiveram incremento no dois tipos de ingestão de sódio (PEREIRA *et al.*, 2014).

Uma questão que fica em aberto é sobre o incremento na ingestão de açúcar ocorrer principalmente quando o animal está se conhecendo o sabor da sacarose. O incremento na ingestão de sacarose persistiu no segundo episódio do teste de

sacarose apenas quando os animais com histórico de depleções de sódio com uso de furosemida combinada com 24 h de dieta pobre em sódio já conheciam a substância. Entretanto, a ingestão alcançou uma assintota a partir do segundo episódio de teste da sacarose em todos os grupos estudados e assim se manteve até o quinto e último episódio de teste da sacarose. O incremento na ingestão de sacarose em relações aos controles desapareceu no terceiro episódio de teste da sacarose. Esta ingestão reduzida de sacarose que aumenta conforme o animal ganha experiência com o açúcar é conhecido na literatura e pode ter duas explicações não mutuamente exclusivas. Uma é que a ingestão da sacarose pode acontecer desta forma inicial em função da neofobia ao sabor da sacarose. A neofobia se trata de um mecanismo de defesa do animal que limita a ingestão da substância nova até que ele reconheça essa substância como algo inofensivo através dos efeitos gastrointestinais produzidos após seu consumo (LIN *et. al.*, 2012). Outra possibilidade é um efeito recompensador pós-ingestivo resultante provavelmente do conteúdo calórico da sacarose (DE ARAUJO *et. al.*, 2008). Nossos resultados sugerem a possibilidade curiosa de que experiência de sensibilização da ingestão de NaCl, possa diminuir a neophobia inicial na ingestão da sacarose.

O padrão de ingestão de sacarose onde o efeito do histórico de depleções de sódio na ingestão de sacarose se esvaece gradualmente após uma primeira experiência é inconsistente com o visto em respostas comportamentais sensibilizadas por drogas de abuso. A sensibilização do comportamento locomotor, por exemplo, da anfetamina perdura no mínimo um ano (STEKETEE e KALIVAS, 2011). Entretanto, animais com histórico de anfetamina ingeriram maiores quantidades de sacarose somente 3 dias dos 5 dias os quais a sacarose foi oferecida comparado ao grupo que recebeu somente salina (AVENA, N. A. e HOEBEL, B. G., 2003), mostrando que o aumento na ingestão de sacarose em função de uma sensibilização cruzada não é tão forte quanto evidenciada para drogas de abuso. Trabalhos de AVENA *et al.*, mostram que a indução da ingestão de sacarose em binge é capaz de aumentar os níveis de dopamina no NAcc no período inicial de aquisição da sacarose, como também adiar o aumento dos níveis de acetilcolina (Ach) envolvida com o processo de saciedade na área (RADA *et al.*,

2005). Mesmo com o aumento inicial de dopamina no Nacc e o adiamento no aumento na concentração de Ach produzidos pelo “binge” (vide definição acima), a ingestão total de sacarose diária destes animais não aumentou comparado com os animais com acesso livre à sacarose. Assim, há a possibilidade de que o efeito de sensibilização, quando envolvendo sacarose não seja duradouro após sua aquisição, ou que haja mecanismos que impeçam a ingestão aumentada desta substância em ratos.

6. CONCLUSÃO

Finalizando, os resultados apresentados são consistentes com a hipótese de compartilhamento de sistemas de recompensa relacionados a ingestão de sódio e de açúcar. É possível que os sistemas motivacionais que produzem a ingestão de um ou outro interajam através de sensibilização cruzada da depleção de sódio com o efeito recompensador da sacarose quando o animal está conhecendo o sabor da sacarose.

7. REFERÊNCIAS

ACERBO, M. J.; JOHNSON, A. K. Behavioral cross-sensitization between DOCA-induced sodium appetite and cocaine-induced locomotor behavior. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 98, n. 3, p. 440-448, 2011.

AVENA, N. A.; HOEBEL, B. G. Amphetamine-sensitized rats show sugar-induced hyperactivity (cross-sensitization) and sugar hyperphagia. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 74, n. 3, p. 635-639, 2003.

AVENA, N. M. et al. Sugar-dependent rats show enhanced intake of unsweetened ethanol. **Alcohol**, v. 34, n. 2-3, p. 203-209, 2004.

AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G. Amphetamine-sensitized rats show sugar-induced hyperactivity (cross-sensitization) and sugar hyperphagia. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 74, n. 3, p. 635-9, 2003.

AVENA, N. M.; RADA, P.; HOEBEL, B. G. Sugar bingeing in rats. **Currency Protocol Neuroscience**, v. Chapter 9, p. Unid. 9-23C, 2006.

BERRIDGE, K. C. 'Liking' and 'wanting' food rewards: brain substrates and roles in eating disorders. **Physiology & Behavior**, v. 97, n. 5, p. 537-550, 2009.

CANNON, W. B. Organization for physiological homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 9, n. 3, p. 399-431, 1929.

CARR, K. D. Food scarcity, neuroadaptations, and the pathogenic potential of dieting in an unnatural ecology: binge eating and drug abuse. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 1, p. 162-167, 2011.

CLARK, J. J.; BERNSTEIN, I. L. Reciprocal cross-sensitization between amphetamine and salt appetite. **Pharmacology Biochemistry Behavior**, v. 78, n. 4, p. 691-698, 2004.

CLARK J.J., BERNSTEIN I.L. Sensitization of salt appetite is associated with increased "wanting" but not "liking" of a salt reward in the sodium-deplete rat. **Behavior Neuroscience**, v.120, n. 1, p. 206-210, 2006.

CLARKE, R.W. e HARRIS J. The organization of motor responses to noxious stimuli. **Brain Research Brain Research Review**, v. 46, n. 2, p. 163-172.

COCORES, J. A.; GOLD, M. S. The salted food addiction hypothesis may explain overeating and the obesity epidemic. **Medical Hypotheses**, v. 73, n. 6, p. 892-899, 2009.

COVIAN, M. R.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Specific alterations in sodium chloride Intake after Hypothalamic Lesions in Rat. **American Journal of Physiology**, v. 205, n. 5, p. 922-8, 1963.

CRUZ, F.C. et. al. Stress-induced cross-sensitization to amphetamine is related to changes in the dopaminergic system. **Journal Neural Transmission**, v. 119, n. 4, p. 415-424.

DE ARAÚJO, I.E. et. al. Food reward in the absence of taste receptor signaling. **Neuron**, v. 57, p. 930-941, 2008.

DE LUCA JR, L. A. et al. Interaction between brain L-type calcium channels and alpha(2)-adrenoceptors in the inhibition of sodium appetite. **Brain Research**, v. 931, n. 1, p. 1-4, 2002.

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

DENTON, D. A. et al. Salt and water homeostasis. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 9, n. 5, p. 518-518, 1982.

DIETZ, D. M.; CURTIS, K. S.; CONTRERAS, R. J. Taste, salience, and increased NaCl ingestion after repeated sodium depletions. **Chemical Senses**, v. 31, n. 1, p. 33-41, 2006.

EPSTEIN, A. N.; STELLAR, E. The control of salt preference in the adrenalectomized rat. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 48, n. 3, p. 167-172, 1955.

EVERS, S. E. et al. Lack of impact of salt restriction advice on hypertensive patients. **Preventive Medicine**, v. 16, n. 2, p. 213-220, 1987.

FITZSIMONS, J. T. Some methods for investigating thirst and sodium appetite. In: TOATES, F. M. R., N.E. (Ed.). **Feeding and Drinking**: Elsevier Science Publishers B.V., v.1, cap. 12, p. 393-427, 1987.

FLAERTY C.F., ROWAN G.A. Anticipatory contrast: Within-subjects analysis. **Animal Learning & Behavior**. v. 13, p. 2-5, 1985.

FLAHERTY C.F., ROWAN G.A. Successive, simultaneous, and anticipatory contrast in the consumption of saccharin solutions. **Journal of Experimental Psychology Animal Behavior Processes**. v. 12, n. 4, p. 381-393, 1986.

GAO, C.; WOLF, M.E. Dopamine alters AMPA receptor synaptic expression and

subunit composition in dopamine neurons of the ventral tegmental area cultured with prefrontal cortex neurons. **The Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 52, p. 14275–14285, 2007.

GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Aldosterone in the brain. **American Journal of Physiology-Renal Physiology**, v. 297, n. 3, p. 559-576, 2009.

GEISELMAN, P.J. e NOVIN, D. The role of carbohydrates in appetite, hunger and obesity . **Appetite: Journal for Intake Research**. v. 3, p. 203-223, 1982.

HADDY, F. J. Role of dietary salt in hypertension. **Life Science**, v. 79, n. 17, p. 1585-1592, 2006.

HAJNAL, A.; SMITH, G. P.; NORGREN, R. Oral sucrose stimulation increases accumbens dopamine in the rat. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 286, n. 1, p. 31-37, 2004.

HERNANDEZ, L.; HOEBEL, B. G. Food reward and cocaine increase extracellular dopamine in the nucleus accumbens as measured by microdialysis. **Life Science**, v. 42, n. 18, p. 1705-1712, 1988.

HURLEY, S. W.; JOHNSON, A. K. Dissociation of thirst and sodium appetite in the Furo/Cap model of extracellular dehydration and a role for N-methyl-D-aspartate receptors in the sensitization of sodium appetite. **Behavioral Neuroscience**, v. 127, n. 6, p. 890-898, 2013.

HURLEY, S. W. et al. Sensitization of sodium appetite: evidence for sustained molecular changes in the lamina terminalis. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 307, n. 12, p.1405-1412, 2014.

JOHNSON, A. K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Medicine and Science in Sports and Exercise**, v. 39, n. 8, p. 1388-1400, 2007.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: Visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, n. 3, p. 292-353,1997.

JOHNSTON, M. V. Plasticity in the developing brain: implications for rehabilitation. **Developmental Disabilities Research Reviews**, v. 15, n. 2, p. 94-101, 2009.

KATSUURA, Y.; TAHA, S. A. Mu opioid receptor antagonism in the nucleus accumbens shell blocks consumption of a preferred sucrose solution in an anticipatory contrast paradigm. **Neuroscience**, v. 261, p. 144-152, 2014.

KOCHLI, A.; TENENBAUM-RAKOVER, Y.; LESHEM, M. Increased salt appetite in patients with congenital adrenal hyperplasia 21-hydroxylase deficiency. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 288, n. 6, p. 1673-1681, 2005.

KORHONEN, M. et al. The effect of intensified diet counseling on the diet of hypertensive subjects in primary health care: A 2-year open randomized controlled trial of lifestyle intervention against hypertension in eastern Finland. **Preventive Medicine**, v. 36, n. 1, p. 8-16, 2003.

LESHEM, M. The excess salt appetite of humans is not due to sodium loss in adulthood. **Physiology Behavior**, v. 98, n. 3, p. 331-337, 2009.

LESHEM, M. et al. Enhancement revisited: the effects of multiple depletions on sodium intake in rats vary with strain, substrain, and gender. **Physiology & Behavior**, v. 82, n. 2-3, p. 571-580, 2004.

LIN, J. et. al. Taste neophobia and palatability: the pleasure of drinking. **Physiology & Behavior** v. 106, n. 4, p. 515-519, 2012.

MCBRIDE, S. M.; FLYNN, F. W. Centrally administered vasopressin cross-sensitizes rats to amphetamine and drinking hypertonic NaCl. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 3, p.1452-1458, 2007.

MCCAUGHEY, S.A.; SCOTT, T.R. Rapid induction of sodium appetite modifies taste-evoked activity in the rat nucleus of the solitary tract. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**. v. 279; n. 3; p. 1121-1131, 2000.

MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology**, v. 274, n. 2, p. 555-560, 1998.

MENDEZ, I. A. et al. Long-lasting sensitization of reward-directed behavior by amphetamine. **Behavior Brain Research**, v. 201, n. 1, p. 74-79, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WORLD HEALTH STATISTICS 2011. France, 2011. Disponível em: <http://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2011/en/>. Acesso em: 15 fev 2015.

MOSS, N.D., CLARKE, J.C., KEHOE, E.J. Paradoxical effects of hedonic disparities in negative anticipatory contrast. **Physiology & Behavior**. v. 75, n. 4, p. 435-42, 2002.

PAL, G. K.; BHARATHI, B.; THOMBRE, D. P. Modulation of daily water-intake by dopamine in caudate and accumbens nuclei in rats. **Physiology & Behavior**, v. 51, n. 4, p. 851-856, 1992.

PEREIRA, D. T. B.; MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A. FURO/CAP: A protocol for sodium intake sensitization. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 4, p. 472-481, 2010.

PEREIRA, D. T. B. et al. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. **Physiology & Behavior**, v. 76, n. 4-5, p. 501-505, 2002.

PEREIRA, D.T.B. et. al. Water deprivation-induced sensitization of sodium appetite in different rat strains and changes in hypothalamic transcripts. **American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology** (submetido).

PIERCE, R. C.; KALIVAS, P. W. A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. **Brain Research Review**, v. 25, n. 2, p. 192-216, 1997.

RADA, P.V.; AVENA, N. M.; HOEBEL, B. G. Daily bingeing on sugar repeatedly releases dopamine in the accumbens shell. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 737-744, 2005.

RADA, P. V. et al. Galanin or cholecystokinin injected in the hypothalamus affect dopamine and acetylcholine release in the accumbens: a system to start and stop ingestive behavior. **Brain Research**, v. 848, n. 1-2, p. 39-40, 1999.

RICHTER, C. P. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. **American Journal of Physiology**, v. 115, n. 1, p. 155-161, 1936.

RICHTER, C. P.; ECKERT, J. F. Mineral metabolism of adrenalectomized rats studied by the appetite method. **Endocrinology**, v. 22, n. 2, p. 214-224, 1938.

ROBERTS, E. M. et al. Abnormal fluid homeostasis in apelin receptor knockout mice. **Journal of Endocrinology**, v. 202, n. 3, p. 453-462, 2009.

RODRIGUES, J. E. et. al. **Fisiologia**. 3rd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

ROITMAN, M. F. et al. Induction of a salt appetite alters dendritic morphology in nucleus accumbens and sensitizes rats to amphetamine. **Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. 225-225, 2002.

ROITMAN, M. F. et al. Dopamine and sodium appetite: Antagonists suppress sham drinking of NaCl solutions in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 111, n. 3, p. 606-611, 1997.

ROWLAND, N. E.; MORIAN, K. R. Roles of aldosterone and angiotensin in maturation of sodium appetite in furosemide-treated rats. **American Journal of Physiology**, v. 276, n. 5, p.1453-1460,1999.

SAKAI, R. R. et al. Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 101, n. 5, p. 724-731,1987.

SAKAI, R. R. et al. Prior Episodes of Sodium Depletion Increase the Need-Free Sodium Intake of the Rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 1, p. 186-192, 1989.

SCHULKIN, J. The allure of salt. **Psychobiology**, v. 19, n. 2, p. 116-121,1991.

STEKETEE, J. D.; KALIVAS, P. W. Drug wanting: behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. **Pharmacology Review**, v. 63, n. 2, p. 348-365, 2011.

STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Control of appetite and satiety: insights from biologic and behavioral studies. **Nutricional Review**, v. 48, n. 2, p. 49-56,1990.

SWANSON, L. W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: a combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. **Brain Research Bull**, v. 9, n. 1-6, p. 321-353,1982.

TEKOL, Y. Salt addiction: A different kind of drug addiction. **Medical Hypotheses**, v. 67, n. 5, p. 1233-1234, 2006.

THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood-pressure, and salt appetite in rats. **American Journal of Physiology**, v. 266, n. 2, p. 458-465, 1994.

UCHOA, E.T. et. al. Glucocorticoids are required for meal-induced changes in the expression of hypothalamic neuropeptides. **Neuropeptides**, v. 46, n. 3, p. 119–124, 2010.

VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. **Best Practice Research Clinical Endocrinology Metabolism**, v. 17, n. 4, p. 471-503, 2003.

WRIGHT, J. W.; HARDING, J. W. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. **Progress in Neurobiology**, v. 72, n. 4, p. 263-293, 2004.