

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**ALTERAÇÕES DE LONGO PRAZO NA INGESTÃO DE
SÓDIO: ASPECTOS NEUROENDÓCRINOS, GENÔMICOS E
COMPARATIVOS**

DANIELA DE TOLEDO BORBA PEREIRA



CONVÊNIO UFSCar/UNESP



2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**ALTERAÇÕES DE LONGO PRAZO NA INGESTÃO DE
SÓDIO: ASPECTOS NEUROENDÓCRINOS, GENÔMICOS E
COMPARATIVOS**

Daniela de Toledo Borba Pereira

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

CONVÊNIO UFSCar/UNESP

2008

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

P436al

Pereira, Daniela de Toledo Borba.

Alterações de longo prazo na ingestão de sódio :
aspectos neuroendócrinos, genômicos e comparativos /
Daniela de Toledo Borba Pereira. -- São Carlos : UFSCar,
2008.

211 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos,
2008.

1. Angiotensina. 2. Ingestão de sódio. 3. Sensibilização.
4. Privação hídrica. 5. Hipotálamo. 6. Expressão gênica. I.
Título.

CDD: 612.8 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de Daniela de Toledo Borba Pereira

Prof. Dr. Laurival Antonio De Luca Junior.....

Prof. Dr. José Antunes Rodrigues.....

Prof. Dr. Luis Carlos Reis.....

Profª. Drª. Cleopatra da Silva Planeta.....

Prof. Dr. Gerhardus Hermanus Maria Schoorlemmer.....



Orientador:

Prof. Dr. Laurival A. De Luca Jr.

Co-orientadora:

Profa. Dra. Silvana Chiavegatto

Dedico este trabalho aos meus pais,
Jaime Borba Pereira e Idelí Maria de Toledo Pereira

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Laurival A. De Luca Jr., amigo e orientador desde o início de minha iniciação científica em 1998 e doutoramento direto em 2004, pela dedicação, apoio, incentivo e oportunidade de desenvolver este e outros trabalhos, e os que ainda estão por vir...

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF), convênio UFSCar – UNESP, pelo auxílio na realização desta tese.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, #03/11268-2, doutorado direto) pela bolsa concedida.

A Prof. Dra. Regina C. Vendramini, por me ajudar sempre, por me acordar e tolerar, inúmeras vezes, o meu mau humor pela manhã, pela amizade, companheirismo e dedicação dentro e fora do laboratório durante todos estes anos.

Ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani, por me ajudar durante todos estes anos.

A Prof. Dr. Silvana Chiavegatto, co-orientadora, pela oportunidade de desenvolver parte deste trabalho no Laboratório de Genética e Cardiologia Molecular do Instituto do Coração – USP.

Ao Prof. Dr. José Eduardo Krieger, pela palavra certa, no momento certo.

A Profa. Dra. Cleópatra da Silva Planeta, Profa. Dra. Carina A. Andrade e Profa. Dra. Juliana I. F. De Gobbi, pelas críticas e sugestões em minha qualificação.

Ao Prof. Dr. José Antunes-Rodrigues, Prof. Dr. Gerhardus H. Schoorlemmer, Prof. Dr. Luís Carlos Reis e Profa. Dra. Cleópatra da Silva Planeta, pelas críticas e sugestões em minha defesa.

A Juliana Constancio, Thais L. Borella, Richard B. D, Angelo M. Lana, Guilherme Ambar, José Pereira Jr. e Mariliza Velho, amigos dentro e fora do laboratório, por me auxiliarem inúmeras vezes, por me apoiarem tanto nos momentos amenos como nos mais tumultuados, pelo prazer da amizade e carinho durante anos.

Aos colegas Alexandre Vieira, Carina A. Andrade, Lisandra B. Oliveira, Priscila N. Nozaki, Flávio V. Moura, Juliana I. F. De Gobbi, Thiago S. Moreira, Lisandra O. Margatho, Alexandre M. Sugawara, Leonardo M. Cardoso, João C. Callera e Allysson Coelho, por me ajudarem no laboratório.

Ao Silas P. Barbosa, Ana Vítor de Oliveira, Reginaldo C. Queiróz e Silvia Fógliã, pelo apoio técnico.

A Silvana A. D. Malavolta, Silvana Campos, Maria de Lourdes Junqueira e Isabel Cristina Lameirinhas, pelo apoio de secretaria.

Aos animais, pela contribuição científica neste trabalho.

A Maria M. I. Moreira e Thamires Moreira da Silva, pela dedicação e amizade.

Aos meus familiares, pelo carinho.

A minha avó Leonor Ferrara de Toledo e à memória do meu avô Dorival Bueno de Toledo, pela dedicação, carinho e apoio sempre.

Ao meu irmão Rafael de Toledo Borba Pereira, pela amizade e apoio sempre.

A Milly, pelo carinho, companheirismo e distração.

Ao meu amado Gregory A. Derderian, pela dedicação e ajuda com a edição das fotomicrografias e correção das inúmeras versões em inglês deste trabalho, e pelo incentivo, apoio, carinho e amor num dos momentos mais tumultuado e difícil de minha vida.

Aos meus pais Jaime Borba Pereira e Idelf Maria de Toledo Pereira, pela amizade, dedicação, carinho e apoio sempre, pelo respeito com as minhas decisões, e por terem se abdicado da minha companhia, mesmo quando estávamos no mesmo lugar, para que eu pudesse batalhar pelos meus objetivos a curto e longo prazo.

A Deus, por ter me guiado... sempre.

RESUMO

A ingestão de sódio pode ocorrer de forma espontânea ou induzida, a qual é incrementada por repetidos episódios de tratamentos que levam à desidratação extracelular ou aumento dos níveis de hormônios natriorexigênicos. O incremento se deve provavelmente a uma adaptação a repetidos episódios de perda de sódio mediado por alterações de longo prazo dos efeitos hormonais sob os circuitos que controlam o apetite ao sódio. O objetivo da presente tese foi investigar três aspectos das alterações de longo prazo na ingestão de sódio associada a angiotensina (ANG) II: 1) neuroendócrino: efeito de repetidos episódios de FURO/CAP na ingestão induzida e espontânea de sódio, 2) genômico: associar alterações de RNAm do sistema renina-angiotensina (SRA) hipotalâmico com o incremento da ingestão de sódio induzido por repetidos episódios de privação hídrica seguida de rehidratação parcial com água (PHRP), e 3) comparativo: apetite ao sódio em ratos da linhagem SHR, submetidos a um episódio de PHRP. Ambos os protocolos, PHRP e FURO/CAP são metodologias válidas para incrementar a ingestão de sódio, que não está relacionada a alterações sistêmicas, sugerindo que os mecanismos do incremento são devidos à plasticidade neural e dependência ao sal. Repetido bloqueio de receptores de ANG II tipo-1 (Agtr1) pelo losartan inibiu ou aboliu o incremento da ingestão espontânea de sódio produzido pelo histórico de FURO/CAP. Este resultado sugere que a ANG II encefálica pode exercer função na sensibilização da ingestão espontânea de sódio e talvez isto não ocorra no hipotálamo, pois esta sensibilização não está associada a nenhuma alteração hipotalâmica de RNAm relacionados ao SRA no protocolo PHRP. No entanto, animais hidratados submetidos a um prévio episódio de PHRP apresentaram

aumento de 76% do RNAm que codifica receptor de ANG II tipo-1a (Agtr1a) no hipotálamo. O incremento da ingestão induzida de sódio está relacionado com aumento de 43%, 60%, 36% e 159% do RNAm hipotalâmico que codifica angiotensinogênio, aminopeptidase N, proteína associada ao receptor Agtr1, e receptor de ANG semelhante ao tipo-1 ou receptor de apelina, respectivamente. Por conseguinte, o incremento do apetite ao sódio induzido pela PHRP está associado com alterações na expressão gênica hipotalâmica relacionada ao SRA. Portanto, ANG II e apelina no hipotálamo podem exercer papel nas alterações de longo prazo da ingestão induzida de sódio. Além disso, aumento da atividade celular no órgão subfornical, pré-locus coeruleus e núcleo do trato solitário caudal está associado com o exacerbado apetite ao sódio exibido pelos animais da linhagem SHR, e este resultado sugere que o aumento da atividade celular nestas áreas está relacionado com o ávido apetite ao sódio demonstrado pelos animais da linhagem SHR em resposta a privação hídrica. Estes resultados sugerem que ativação repetida de receptores encefálicos de ANG II, talvez em áreas diferentes, é capaz de incrementar ambas as formas de ingestão de sódio e reforça a ANG II encefálica como um peptídeo que medeia efeitos de longo prazo no comportamento.

ABSTRACT

Sodium intake occurs either as a need-free or a need-induced behavior, which is enhanced by repeated episodes of treatments leading to extracellular dehydration or increased levels in natriorexigenic hormones. This enhancement is likely an adaptation to repeated episodic sodium loss mediated by the long-term effects of hormones on brain circuits subserving sodium appetite. The objective of the present thesis was to investigate three aspects of long-term alterations in sodium intake associated to angiotensin (ANG) II: 1) neuroendocrine: the effect of repeated episodes of FURO/CAP on need-induced and need-free sodium intake, 2) genomic: associate hypothalamic renin-angiotensin system mRNA alterations with sodium intake enhancement induced by repeated episodes of water deprivation followed by partial rehydration with water (WDPR), and 3) comparative: sodium appetite in SHR submitted to a single WDPR. Both protocols, WDPR and FURO/CAP, were effective methodologies to enhance sodium intake, not related to systemic changes, suggesting that its mechanisms are due to neural plasticity and salt addiction. Repeated blockade of Agtr1 receptors by losartan inhibited or abolished the enhancement in the need-free sodium intake produced by a history of FURO/CAP. This result suggests that encephalic ANG II may play a role in the sensitization of spontaneous sodium intake, and perhaps it does not occur in the hypothalamus because it was not correlated to any hypothalamic RAS mRNA alteration in the WDPR protocol. However, hydrated animals with a history of WDPR increased the hypothalamic mRNA encoding of ANG II receptor type-1a (Agtr1a) by 76%. The enhancement in the need-induced sodium intake in the WDPR was related to increased hypothalamic mRNA encoding of angiotensinogen, aminopeptidase N,

Agtr1-associated protein, and ANG receptor like-1 or apelin receptor by 43%, 60%, 36%, and 159% respectively. Thus, the enhancement in the sodium appetite in WDPR was associated with alterations in the hypothalamic gene expression related to RAS. Thus, hypothalamic ANG II and apelin may play a role in the long-term changes of need-induced sodium intake. Moreover, the increased cellular activity that occurred in the subfornical organ, pre-locus coeruleus, and caudal nucleus of the solitary tract is associated with a stronger sodium appetite shown by SHR. These results suggest that increased cellular activity in these areas is correlated with the avid sodium appetite shown by SHR in response to water deprivation. The results suggest that repeated activation of encephalic ANG II receptors, perhaps in different areas, is able to enhance both forms of sodium intake and reinforce encephalic ANG II as a peptide that mediates long-term effects on behavior.

LISTA DE ABREVIATURAS

Actb = β -actina

Agt = angiotensinogênio

Agtrap = proteína associada ao receptor de angiotensina II tipo-1

Agtr1 = receptor de angiotensina semelhante ao tipo-1

Agtr1 = receptor de angiotensina II tipo-1

Agtr1a = receptor de angiotensina II tipo-1a

Agtr1b = receptor de angiotensina II tipo-1b

Agtr2 = receptor de angiotensina II tipo-2

Agtr4 = receptor de angiotensina II tipo-4

ANG = angiotensina

ANOVA = análise de variância

Anpep = aminopeptidase N

AP = área postrema

APJ = receptor de apelina

Apln = apelina

apNTS = núcleo do trato solitário adjacente à área postrema

ARP = atividade de renina plasmática

BLAST = "Basic Local Alignment Search Tool"

CAP = captopril

CNPq = Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

cNTS = núcleo do trato solitário caudal

COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação Ambiental

DNA = ácido desoxiribonucléico

DNAc = fita complementar do ácido desoxiribonucléico

Eca1 = enzima conversora de angiotensina isoforma-1

Eca2 = enzima conversora de angiotensina isoforma-2

FAPESP = Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

FC = frequência cardíaca

FOAr = Faculdade de Odontologia de Araraquara

Fos-ir = imunorreatividade à proteína Fos

FURO = furosemida

g = grama

Gapdh = gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

h = hora

HCl = ácido clorídrico

HTZ = Holtzman

icv = intracerebroventricular

InCor = Instituto do Coração

iNTS = núcleo do trato solitário intermediário

ip = intraperitoneal

kg = kilograma

LOS = losartan

M = molar

mg = miligrama

min = minuto

ml = mililitro

MnPO = núcleo pré-óptico mediano

mOsmol = miliosmol

NAC = amostra sem primers (sense e anti-sense)

NCeA = núcleo central da amígdala

NaCl = cloreto de sódio

ng = nanograma

NPBL = núcleo parabraquial lateral

NPBM = núcleo parabraquial medial

NPV = núcleo paraventricular

NSO = núcleo supra-óptico

NSQ = núcleo supraquiasmático

NTC = amostra sem a fita complementar do ácido desoxiribonucléico

OD = densidade óptica

OSF = órgão subfornical

OVLТ = órgão vasculoso da lamina terminal

PAM = pressão arterial média

PBS = tampão fosfato salina

PFA = paraformoldeído

PH = privação hídrica

PHRP = privação hídrica-rehidratação parcial

pré-LC = pré-locus coeruleus

qRT-PCR = reação em cadeia da polimerase em tempo real

Ren = renina

RNA = ácido ribonucléico

RNA_m = ácido ribonucléico mensageiro

RNA_r = ácido ribonucléico ribossomal

RP = período de rehidratação parcial

rpm = rotações por minuto

RT-PCR = reação em cadeia da polimerase

s = segundo

sc = subcutânea

SHR = Rato Espontaneamente Hipertenso

S[K⁺] = concentração sérica de potássio

S[Na⁺] = concentração sérica de sódio

SOsmol = osmolalidade sérica

SRA = sistema renina-angiotensina

S[tP] = concentração sérica de proteína total

UFSCar = Universidade de São Carlos

UKV = quantidade total de potássio urinário

UNaV = quantidade total de sódio urinário

UNESP = Universidade do Estado de São Paulo

UOsmol = osmolalidade urinária

USP = Universidade de São Paulo

UV = volume urinário

VEH = veículo

v/v = volume/volume

WKY = Wistar-Kyoto

μEq = microequivalente

μg = micrograma

μl = microlitro

% = por cento

= número

°C = grau Celsius

SUMÁRIO

1 Introdução	22
2 Artigo #1 – FURO/CAP : um protocolo para o incremento da ingestão de sódio	37
2.1 Resumo	38
2.2 Introdução	40
2.3 Materiais e métodos	43
2.3.1 Animais.....	43
2.3.2 Drogas e soluções.....	44
2.3.3 Teste de ingestão induzida: apetite ao sódio e sede induzido pelo FURO/CAP	45
2.3.4 Privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP) e teste do apetite ao sódio	46
2.3.5 Excreção Urinária	47
2.3.6 Análise estatística	47
2.3.7 Experimento 1. Efeito da repetição do FURO/CAP na ingestão induzida e espontânea de NaCl 0,3 M.....	48
2.3.8 Experimento 2. Efeito da repetição do FURO/CAP na ingestão de NaCl 0,3 M e excreção urinária: combinação com antagonista de receptor de ANG II.....	48
2.3.8.1 Experimento 2a. Efeito do losartan no incremento da ingestão induzida de NaCl 0,3 M por repetição do FURO/CAP: experimento de validação do papel da ANG II.	50
2.3.8.2 Experimento 2b. Efeito do FURO/CAP, combinado ou não com losartan, na excreção urinária	50

2.3.8.3 Experimento 2c. Efeito do losartan no incremento da ingestão espontânea de NaCl 0,3 M induzido pela repetição do FURO/CAP.	51
2.3.8.4 Experimento 2d. Efeito do FURO/CAP na ingestão induzida e espontânea de NaCl 0,3 M em animais com histórico de veículo ou losartan combinado ao FURO/CAP.....	51
2.3.9 Experimento 3. FURO/CAP e sensibilização do apetite ao sódio induzido por privação hídrica.....	52
2.4 Resultados	53
2.4.1 Experimento 1. Efeito da repetição do FURO/CAP na ingestão induzida e espontânea de NaCl 0,3 M.....	53
2.4.2 Experimento 2. Efeito da repetição do FURO/CAP na ingestão de NaCl 0,3 M e excreção urinária: combinação com antagonista de receptor de ANG II.....	57
2.4.2.1 Experimento 2a. Efeito do losartan no incremento da ingestão induzida de NaCl 0,3 M por repetição do FURO/CAP: experimento de validação do papel da ANG II	57
2.4.2.2 Experimento 2b. Efeito do FURO/CAP, combinado ou não com losartan, na excreção urinária.....	59
2.4.2.3 Experimento 2c. Efeito do losartan no incremento da ingestão espontânea de NaCl 0,3 M induzido pela repetição do FURO/CAP	61
2.4.2.4 Experimento 2d. Efeito do FURO/CAP na ingestão induzida e espontânea de NaCl 0,3 M em animais com histórico de veículo ou losartan combinado ao FURO/CAP.....	63
2.4.3 Experimento 3. FURO/CAP e sensibilização do apetite ao sódio induzido por privação hídrica	68
2.5 Discussão.....	70

2.6 Agradecimentos	77
2.7 Referências	78
3 Artigo #2 – Correlação entre incremento da ingestão de sódio e alteração de transcritos do sistema renina-angiotensina hipotalâmico em ratos	87
3.1 Agradecimentos	88
3.2 Resumo	89
3.3 Introdução	91
3.4 Procedimentos Experimentais	96
3.4.1 Animais.....	96
3.4.2 Solução	96
3.4.3 Protocolo PHRP e teste de apetite ao sódio	97
3.4.4 Parâmetros sanguíneos	97
3.4.5 Parâmetros urinários	98
3.4.6 Dissecção do hipotálamo	98
3.4.7 Histologia.....	98
3.4.8 Análise da expressão gênica hipotalâmica: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qRT-PCR).....	99
3.4.9 Análise estatística	103
3.4.10 Experimento 1. Identificação de alterações na expressão gênica hipotalâmica induzidas por múltiplos episódios de PHRP em animais sob hidratação.	104
3.4.10.1 Experimento 1a. Análise da ingestão de sódio, parâmetros sanguíneos e expressão gênica hipotalâmica em animais hidratados (-H) submetidos a prévios episódios de PHRP.	104
3.4.10.2 Experimento 1b. Análise de parâmetros urinários e ingestão de alimento antes, durante e depois de um episódio de PHRP.....	105

3.4.11 Experimento 2. Identificação de alterações na expressão gênica hipotalâmica induzidas por múltiplos episódios de PHRP em animais após rehidratação (-R).....	106
3.5 Resultados	107
3.5.1 Análise histológica.....	107
3.5.2 Experimento 1. Identificação de alterações na expressão gênica hipotalâmica induzidas por múltiplos episódios de PHRP e correlação com o incremento da ingestão espontânea de sódio.....	111
3.5.2.1 Experimento 1a. Repetição do protocolo PHRP: incremento da ingestão de sódio e alteração gênica no hipotálamo de ratos hidratados.	111
3.5.2.1.1 Ingestão espontânea de solução de NaCl 0,3 M e água	111
3.5.2.1.2 Teste de sede e de apetite ao sódio.....	113
3.5.2.1.3 Parâmetros sanguíneos em animais sob hidratação.....	116
3.5.2.1.4 Expressão gênica do SRA hipotalâmico em animais sob hidratação.....	117
3.5.2.2 Experimento 1b. Repetição do protocolo PHRP: parâmetros urinários e ingestão de alimento.	119
3.5.3 Experimento 2. Identificação de alterações na expressão gênica hipotalâmica induzidas por múltiplos episódios de PHRP e correlação com incremento do apetite ao sódio.....	121
3.5.3.1 Ingestão espontânea de solução de NaCl 0,3 M e água	121
3.5.3.2 Teste de sede e apetite ao sódio	121
3.5.3.3 Parâmetros sanguíneos em animais após rehidratação.....	122
3.5.3.4 Expressão gênica do SRA hipotalâmico em animais após rehidratação.....	123

3.6 Discussão.....	124
3.7 Referências	129
4 Artigo #3 – Appetite ao sódio induzido por privação hídrica e imunorreatividade diferenciada ao c-Fos encefálico em ratos espontaneamente hipertensos.....	148
4.1 Agradecimentos	149
4.2 Resumo	150
4.3 Introdução	152
4.4 Procedimentos experimentais	155
4.4.1 Animais.....	155
4.4.2 Solução	156
4.4.3 Histologia e imunohistoquímica	156
4.4.4 Protocolo PHRP e teste de appetite ao sódio	158
4.4.5 Parâmetros sanguíneos e urinários.....	159
4.4.6 Parâmetros cardiovasculares	160
4.4.7 Análise estatística	161
4.4.8 Experimento 1. Expressão de c-Fos em ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR submetidos ao protocolo PHRP.	161
4.4.9 Experimento 2. Appetite ao sódio induzido por privação hídrica em SHR	161
4.4.9.1 Experimento 2a. Comparação entre as linhagens HTZ, WKY e SHR	161
4.4.9.2 Experimento 2b. Comparação entre as linhagens HTZ e SHR.	162
4.5 Resultados	163
4.5.1 Experimento 1. Protocolo PHRP: análise da expressão de c-Fos nas linhagens HTZ, WKY e SHR.....	163
4.5.2 Experimento 2. Appetite ao sódio induzido por privação hídrica em SHR	

.....	185
4.5.2.1 Experimento 2a. Comparações entre as linhagens HTZ, WKY e SHR	185
.....	185
4.5.2.1.1 Desempenho das linhagens durante o teste de sede e apetite ao sódio	185
.....	185
4.5.2.1.2 Determinação dos parâmetros sanguíneos.....	188
4.5.2.1.3 Respostas cardiovasculares e excreção urinária induzidas pela desidratação.....	190
4.5.2.2 Experimento 2b. Comparação entre as linhagens HTZ e SHR.	193
4.6 Discussão.....	196
4.7 Referências	204

1. Introdução

A ingestão de sódio pode ocorrer de duas maneiras: espontânea ou induzida. A ingestão espontânea refere-se ao consumo de sal de um animal hidratado em excesso à necessidade diária de sódio, e a ingestão induzida, também chamada de apetite ao sódio, refere-se ao consumo de sal desencadeado pela diminuição de volume do compartimento extracelular (Antunes-Rodrigues e Covian, 1963; Denton, 1984; Schulkin, 1991; Epstein, 1991). Tratamentos que levam à desidratação extracelular, tais como diálise intraperitoneal, furosemida associada à dieta deficiente de sódio (protocolo da furosemida), furosemida associada ao captopril (protocolo FURO/CAP) e privação hídrica, induzem apetite ao sódio mediado por hormônios natriorexigênicos: angiotensina (ANG) II e aldosterona (Falk, 1965; Jalowiec, 1974; Sakai et al., 1986; Fitts et al., 1989; Stricker et al., 1992; Thunhorst et al., 1994, 1999; Thunhorst e Johnson, 1994; Sato et al., 1996). No entanto, uma única injeção intracerebroventricular (icv) de ANG II exógena não induz ingestão de NaCl hipertônico (Fitzsimons, 1998), mas repetidas injeções ou infusão contínua deste peptídeo induzem ingestão de solução hipertônica de NaCl em ratos (Bryant et al., 1980; Moellenhoff et al., 2001). Além disso, este peptídeo é capaz de induzir sinaptogênese e ativar fatores de transcrição no encéfalo (Lebrun et al., 1995; Wright et al., 2002a, 2002b, 2004).

Uma única ou repetidas depleções de sódio incrementam tanto a ingestão induzida de sódio quanto a espontânea (Falk, 1966; Frankmann et al., 1986; Sakai et al., 1987, 1989; Pereira et al., 2002), ou seja, alterações periféricas e/ou centrais induzidas pela depleção de sódio faz com que os animais passem a ingerir uma maior quantidade de sal comparada a uma quantidade previamente ingerida. A

propriedade de incremento da ingestão de sódio não depende de pistas aprendidas pelo comportamento de ingestão de sódio, pois se manifesta mesmo se a reposição de sódio ocorrer sem estimulação oral após as depleções prévias (Falk, 1966; Falk e Lipton, 1967; Sakai et al., 1987) e também não está relacionada com alterações sistêmicas permanentes (Frankmann et al., 1986; Sakai et al., 1987, 1989), devendo-se provavelmente a uma adaptação à perda de sódio garantindo a presença desse íon num momento crítico: o próximo episódio de depleção de sódio.

O incremento da ingestão espontânea de sódio induzido pelo protocolo da furosemida não é afetado por lesão da região ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V) (De Luca Jr. et al., 1992), mas é abolido pela lesão do órgão subfornical (OSF) (Ruhf et al., 2001). Além disso, pode ter um caráter permanente, pois está presente até quatro meses após uma primeira depleção (Frankmann et al., 1986; Sakai et al., 1989). O incremento do apetite ao sódio induzido pelo protocolo da furosemida está associado ao sinergismo ANG II e aldosterona (Sakai et al., 1987, 1989), aumento da atividade celular em regiões encefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidro-eletrolítico (OSF, núcleo basolateral da amígdala e núcleo accumbens) (Na et al., 2007) e remodelamento de sinapse e força sináptica em neurônios do núcleo accumbens, região encefálica envolvida com recompensa e comportamento motivado (Roitman et al., 2002). Por conseguinte, pode-se dizer que a propriedade de incremento constitui uma alteração de longo prazo da ingestão de sódio, a qual provavelmente se deva à plasticidade neural que levaria a dependência ao sal (Tekol, 2006).

Quatro métodos de produção de desidratação extracelular têm sido utilizados para demonstrar o incremento da ingestão de sódio: diálise intraperitoneal, diálise hiperoncótica, protocolo da furosemida e privação hídrica-rehidratação parcial

(PHRP) (Falk, 1966; Frankmann et al., 1986; Sakai et al., 1987, 1989; Pereira et al., 2002). No entanto, existe outro método de produção de desidratação extracelular: o protocolo FURO/CAP, no qual a propriedade de incremento ainda não foi testada. O FURO/CAP consiste na administração simultânea do diurético e natriurético furosemida e baixa dose do inibidor da enzima conversora de ANG captopril e resulta, num curto intervalo de tempo, em sede e apetite ao sódio, ambos dependentes do aumento de ANG II encefálica (Fitts et al., 1989; Thunhorst et al., 1994, 1999; Thunhorst e Johnson, 1994).

A privação hídrica pode causar danos à saúde (Kleiner, 1999; Verbalis, 2003) e é a forma mais natural de se induzir depleção de sódio. A ocorrência de períodos de privação de água é comum tanto em animais quanto em humanos e induzem aumento da preferência por solução de sódio nestas espécies (Denton, 1984; Weisinger et al., 1985; Takamata et al., 1994; Sato et al., 1996; De Luca Jr. et al., 2002; Leshem et al., 2008). O protocolo PHRP, desenvolvido em nosso laboratório por Sato et al. (1996), também induz apetite ao sódio na presença de elevada atividade de renina plasmática (ARP) (De Luca Jr. et al., 2002) e sua metodologia consiste em eliminar a sede, induzida pela privação de água, antes dos animais terem acesso a ambos os líquidos, NaCl hipertônico e água, para ingestão (De Luca Jr. et al., 2007). Além disso, é sabido que repetidos episódios de PHRP incrementam a ingestão espontânea de sódio em ratos normotensos (Pereira et al., 2002); porém, não se sabe quais alterações, periféricas e/ou centrais, estão envolvidas com o incremento da ingestão de sódio induzido pela privação hídrica. Considerando-se que o incremento na ingestão de sódio constitui uma alteração comportamental de longo prazo, é possível que ela seja resultante de alterações no transcriptoma induzida pela privação hídrica. No entanto, nada se sabe a respeito

das alterações na expressão gênica hipotalâmica, região do sistema límbico envolvida no controle do apetite ao sódio e equilíbrio hidro-eletrolítico (Covian e Antunes-Rodrigues, 1963).

Rato espontaneamente hipertenso (SHR), linhagem desenvolvida por Okamoto e Aoki (1963), é uma linhagem de rato susceptível a ocorrência espontânea de hipertensão e um modelo animal para o estudo da hipertensão primária em humanos (Folkow, 1990). O SHR apresenta elevada atividade do sistema renina-angiotensina (SRA) encefálico (Di Nicolantonio, 1982) e o ávido consumo espontâneo de soluções salgadas por esta linhagem (Catalanotto et al., 1972; McConnell e Henkin, 1973a, 1973b; Fregly, 1975; Mogenson e Morris, 1980; Bertino e Beauchamp, 1988) é um comportamento que depende mais da hiperatividade do SRA encefálico do que de alterações no balanço hidro-eletrolítico (Di Nicolantonio, 2004). No entanto, não se sabe como esta linhagem se comporta após um episódio de privação hídrica.

Em suma, o objetivo da presente tese foi investigar o papel da ANG II encefálica associada a alterações de longo prazo na ingestão de sódio em ratos, enfatizando, embora não de modo exclusivo, o protocolo de privação hídrica. Para tanto, três aspectos foram investigados: 1) neuroendócrino: repetidos aumentos de ANG II encefálica, ou seja, repetidas ativações de receptores angiotensinérgicos, seriam capazes de incrementar o apetite ao sódio induzido pela repetição do protocolo FURO/CAP, bem como a ingestão espontânea de sódio?, 2) genômico: haveria relação entre alterações na expressão gênica do SRA hipotalâmico e incremento da ingestão de sódio induzido por repetição do protocolo PHRP? e 3) comparativo: como o SHR, linhagem que possui hiperatividade do SRA encefálico, se comporta após um episódio de PHRP?

As respostas a essas questões estão distribuídas por três artigos que estão sendo preparados para serem submetidos à revisão editorial em periódicos especializados, e que fazem parte do corpo desta tese (Pereira et al., 2008a, 2008b, 2008c). No primeiro artigo sugerimos: o protocolo FURO/CAP como um método válido para produzir incremento e, portanto, alterações de longo prazo na ingestão de sódio e alterações aparentemente vinculadas à ação da ANG II, que inclusive influenciam o apetite ao sódio induzido por privação hídrica (Pereira et al., 2008a). Em seguida mostramos que há correlações entre alterações de longo prazo no transcriptoma de componentes do SRA presentes no hipotálamo e episódios repetidos de privação hídrica (Pereira et al., 2008b). Finalmente, encontramos atividade celular encefálica diferenciada, medida pela expressão do gene c-Fos, associada a um apetite ao sódio intenso nos SHR (Pereira et al., 2008c).

Com relação às alterações de longo prazo na ingestão de sódio e seus aspectos neuroendócrinos, repetidos episódios de FURO/CAP incrementaram a ingestão espontânea e induzida de sódio (Pereira et al., 2008a). O mesmo ocorreu para repetidos episódios de PHRP (Pereira et al., 2008b). Quanto à sensibilização, dois episódios prévios de FURO/CAP sensibilizaram o apetite ao sódio induzido pela PHRP (Pereira et al., 2008a). Alterações sistêmicas que poderiam explicar o incremento da ingestão de sódio não foram induzidas pelo FURO/CAP nem pela PHRP (Pereira et al., 2008a, 2008b). Dois episódios prévios de FURO/CAP combinados com losartan em baixa dose (10 e 20 mg/kg) inibiram o incremento da ingestão espontânea de sódio e combinados com losartan na maior dose (40 mg/kg) aboliram este incremento (Pereira et al., 2008a). O mesmo tratamento combinado suprimiu tanto a ingestão induzida de sódio quanto a de água (Pereira et al., 2008a). Animais previamente tratados com losartan em baixa dose (10 mg/kg) reduziram a

ingestão de água induzida pelo FURO/CAP num terceiro episódio (Pereira et al., 2008a). Além disso, animais previamente tratados com losartan nas maiores doses (20 e 40 mg/kg) incrementaram a ingestão espontânea de sódio após o terceiro episódio de FURO/CAP (Pereira et al., 2008a).

Com relação às alterações de longo prazo na ingestão de sódio e seus aspectos genômicos, o incremento da ingestão espontânea de sódio induzido pela repetição do protocolo PHRP não está relacionado com alterações gênicas do SRA hipotalâmico (Pereira et al., 2008b). Animais hidratados submetidos a um prévio episódio de PHRP apresentaram aumento de 76% do RNAm que codifica receptor de ANG II tipo-1a (Agtr1a) no hipotálamo (Pereira et al., 2008b). O incremento do apetite ao sódio induzido pela repetição do protocolo PHRP está relacionado com aumento de 43%, 60%, 36% e 159% do RNAm hipotalâmico que codifica angiotensinogênio, aminopeptidase N, proteína associada ao receptor Agtr1, e receptor de ANG semelhante ao tipo-1 ou receptor de apelina, respectivamente (Pereira et al., 2008b).

Com relação ao apetite ao sódio induzido pela PHRP e aspectos comparativos entre linhagens, mostrou-se que o SHR ingeriu mais NaCl 0,3 M durante o teste do apetite ao sódio do que ratos das linhagens Wistar-Kyoto e Holtzman (Pereira et al., 2008c). No protocolo PHRP, o SHR apresentou respostas semelhantes às dos normotensos em termos de concentração sérica de sódio, osmolalidade sérica, atividade de renina plasmática, ingestão de ração, balanço de sódio, excreção urinária e registros cardiovasculares (Pereira et al., 2008c). No entanto, imediatamente antes do teste de apetite ao sódio, ou seja, após um episódio de PHRP, o SHR apresentou maior expressão de c-Fos no OSF, pré-locus coeruleus (pré-LC) e núcleo do trato solitário caudal (cNTS) (Pereira et al., 2008c).

Ativação repetida de receptores encefálicos de ANG II é capaz de incrementar ambas as formas de ingestão de sódio, ou seja, a ANG II encefálica exerce papel na propriedade de incremento da ingestão de sódio. Ambos os protocolos, PHRP e FURO/CAP são válidos para se estudar sensibilização da ingestão de sódio, a qual não está relacionada com nenhuma alteração sistêmica, sugerindo que seus mecanismos são devidos a plasticidade neural. Bloqueio repetido do Agtr1 pelo losartan inibiu o incremento da ingestão diária de sódio. Este resultado sugere que a ANG II encefálica tem função na sensibilização da ingestão espontânea de sódio, e talvez isto não ocorra no hipotálamo, pois esta sensibilização não está associada a nenhuma alteração hipotalâmica de RNAm relacionados ao SRA. Bloqueio repetido do Agtr1 pelo losartan não alterou o incremento do apetite ao sódio induzido pelo FURO/CAP, o qual também não está associado a alteração do RNAm hipotalâmico que codifica o receptor Agtr1a em animais sob rehidratação submetidos a repetidos episódios de PHRP. Além disso, o incremento do apetite ao sódio está associado com alterações na expressão gênica hipotalâmica relacionada ao SRA e tanto a ANG II quanto a apelinina no hipotálamo exercem papel nas alterações de longo prazo da ingestão induzida de sódio. No entanto, o aumento da atividade celular no OSF, pré-LC e cNTS está associado com maior apetite ao sódio mostrado pelo SHR. Por conseguinte, a ANG II encefálica atua modulando as alterações de longo prazo da ingestão de sódio.

Esperamos assim que os três artigos contribuam para enfatizar os efeitos de longo prazo da ANG II através de um protocolo experimental válido, de uma correlação de fundo genômico referente a uma região importante do encéfalo, e de uma linhagem de rato com atividade celular no encéfalo diferenciada associada a um ávido apetite ao sódio.

Referências

Antunes-Rodrigues J, Covian MR (1963) Hypothalamic control of sodium chloride and water intake. *Acta Physiol Lat Am* 13:94-100.

Bertino M, Beauchamp GK (1988) The spontaneously hypertensive rat's preference for salted foods. *Physiol Behav* 44(3):285-289.

Bryant RW, Epstein AN, Fitzsimons JT, Fluharty SJ (1980) Arousal of a specific and persistent sodium appetite in the rat with continuous intracerebroventricular infusion of angiotensin II. *J Physiol* 301:365-382.

Catalanotto F, Schechter PJ, Henkin RI (1972) Preference for NaCl in the spontaneously hypertensive rat. *Life Sciences* 11(Part I):557-564.

Covian MR, Antunes-Rodrigues J (1963) Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. *Am J Physiol* 205:922-926.

De Luca LA Jr, Galaverna O, Schulkin J, Yao SZ, Epstein AN (1992) The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. *Brain Res Bull* 28:73-87.

De Luca LA Jr, Xu Z, Schoorlemmer GH, Thunhorst RL, Beltz TG, Menani JV, Johnson AK (2002) Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. *Am J Physiol* 282:R552-R559.

De Luca LA Jr, Vendramini RC, Pereira DTB, Colombari DSA, David RB, de Paula PM, Menani JV (2007) Water deprivation and the double-depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. *Braz J Med Biol Res* 40:707-712.

Denton D (1984) In: *The hunger for salt: an anthropological, physiological and medical analysis*. New York: Springer-Verlag.

Di Nicolantonio R, Hutchinson JS, Mendelsohn FA (1982) Exaggerated salt appetite of spontaneously hypertensive rats is decreased by central angiotensin-converting enzyme blockade. *Nature* 298:846-848.

Di Nicolantonio R, Kren V, Zidek V, Pravenec M (2004) Salt preference of congenic strains derived from the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Behav* 80:617-622.

Epstein AN (1991) Neurohormonal control of salt intake in the rat. *Brain Res Bull* 27:315-320.

Falk JL (1965) Water intake and NaCl appetite in sodium depletion. *Psychol Rep* 16:315-325.

Falk JL (1966) Serial sodium depletion and NaCl solution intake. *Physiol Behav* 1:75-77.

Falk JL, Lipton JM (1967) Temporal factors in the genesis of NaCl appetite by intraperitoneal dialysis. *J Comp Physiol Psychol* 63:247-251.

Fitzsimons JT (1998) Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 78:583-686.

Folkow B (1990) Salt and hypertension. *News Physiol Sci* 5:220-224.

Frankmann SP, Dorsa DM, Sakai RR, Simpson J (1986) A single experience with hyperoncotic dialysis persistently alters water and sodium intake. In: Caro, G.; Massi, M.; Epstein, A.N. *The Physiology of Thirst and Sodium Appetite*. New York: Plenum Press; p115-121.

Fregly MJ (1975) NaCl intake and preference threshold of spontaneously hypertensive rats. *PSEBM* 149:915-920.

Fitts, D. A.; Masson, D. B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. *Behav. Neurosci.* 1989, 103:865-872.

Jalowiec JE (1974) Sodium appetite induced by furosemide: effects of differential dietary maintenance. *Behav Biol* 10:313-25.

Kleiner SM (1999) Water: An essential but overlooked nutrient. *J Am Diet Assoc* 99:200-206.

Lebrun CJ, Blume A, Herdegen T, Seifert K, Bravos R, Unger T (1995) Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of fos, jun and krox proteins. *Neuroscience* 65(1):93-99.

Leshem M, Saadi A, Alem N, Hendi K (2008) Enhanced salt appetite, diet and drinking in traditional Bedouin women in the Negev. *Appetite* 50:71-82.

McConnell SD, Henkin RI (1973a) Increased preference for Na⁺ and K⁺ salts in spontaneously hypertensive (SH) rats. *PSEBM* 143:185-188.

McConnell SD, Henkin RI (1973b) NaCl preference in spontaneously hypertensive rats: age and blood pressure effects. *PSEBM* 225:624-627.

Mogenson GJ, Morris P (1980) Increased salt appetite precedes the onset of arterial hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Appetite* 1:167-171.

Moellenhoff, E.; Blume, A.; Culman, J.; Chatterjee, B.; Herdegen, T.; Lebrun, C. J.; Unger, T. Effect of repetitive icv injections of ANG II on c-Fos and AT(1)-receptor expression in the rat brain. *Am. J. Physiol.* 2001, 280:R1095-R1104.

Na ES, Morris MJ, Johnson RF, Beltz TG, Johnson AK (2007) The neural substrates of enhanced salt appetite after repeated sodium depletions. *Brain Res* 1171:104-110.

Okamoto K, Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* 27:282-293.

Pereira DTB, David RB, Menani JV, De Luca LA Jr (2002) Episodes of water deprivation enhance daily hypertonic NaCl intake in rats. *Braz J Med Biol Res* 35:465-468.

Pereira DTB, Menani JV, De Luca Jr LA (2008a) FURO/CAP: a protocol for sodium intake enhancement. (Artigo #1 da presente tese)

Pereira DTB, Constancio J, Vendramini RC, Menani JV, Chiavegatto S, De Luca Jr LA (2008b), Correlation between sodium intake enhancement and hypothalamic renin-angiotensin system transcript alteration in the rat. (Artigo #2 da presente tese)

Pereira DTB, Vendramini RC, Menani JV, De Luca Jr LA (2008c) Water deprivation-induced sodium appetite and differential encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. (Artigo #3 da presente tese)

Rhuf, A. A.; Starbuck, E. M.; Fitts, D. A. Effects of SFO lesions on salt appetite during multiple sodium depletions. *Physiol. Behav.* 2001, 74:629-636.

Roitman MF, Na E, Anderson G, Jones TA, Bernstein IL (2002) Induction of a salt appetite alters dendritic morphology in nucleus accumbens and sensitizes rats to amphetamine. *J Neurosci* 22:1-5.

Sakai RR, Nicolaidis S, Epstein AN (1986) Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin II and aldosterone. *American Journal of Physiology* 251(20):R762-R768.

Sakai RR, Fine WB, Epstein AN, Frankmann SP (1987) Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. *Behav Neurosci* 101:724-731

Sakai RR, Frankmann SP, Fine WB, Epstein AN (1989) Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake of the rat. *Behav Neurosci* 103:186-192.

Sato MA, Yada MM, De Luca LA Jr (1996) Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. *Physiol Behav* 60:1099-1104.

Stricker EM, Gannon KS, Smith JC (1992) Thirst and salt appetite induced by hypovolemia in rats: analysis of drinking behavior. *Physiol Behav* 51:27-37.

Schulkin J (1991) Salt seeking behavior. In: *Sodium hunger*, vol. 1, pp 6-30
Cambridge: Cambridge University Press.

Takamata A, Mack GW, Gillen CM, Nadel ER (1994) Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement. *Am J Physiol* 266:R1493-R1502.

Tekol Y (2006) Salt addiction: A different kind of drug addiction. *Med Hypotheses* 67:1233-1234.

Thunhorst RL, Morris M, Johnson AK (1994) Endocrine changes associated with a rapidly developing sodium appetite in rats. *Am J Physiol* 267:R1168-R1173.

Thunhorst RL, Beltz TG, Johnson AK (1999) Effects of subfornical organ lesions on acutely induced thirst and salt appetite. *Am J Physiol* 277:R56-R65.

Thunhorst RL, Johnson AK (1994) Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. *Am J Physiol* 266:R458-R465.

Verbalis JG (2003) Disorders of body water homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 17(4):471-503.

Weisinger RS, Denton DA, McKinley MJ, Nelson JF (1985) Dehydration-induced sodium appetite in rats. *Physiol Behav* 34:45-50.

Wright JW, Kramár EA, Meighan SE, Harding JW (2002a) Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides* 23(1):221-246.

Wright JW, Reichert JR, Davis CJ, Harding JW (2002b) Neural plasticity and the brain renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev* 26:529-552.

Wright JW, Harding JW (2004) The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog Neurobiol* 72(4):263-293.

2. Artigo #1 – FURO/CAP : um protocolo para o incremento da ingestão de sódio

Daniela de T. B. Pereira, José V. Menani, Laurival A. De Luca Jr.*

Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia, Rua Humaitá,
1680, UNESP – Universidade do Estado de São Paulo, 14801-903, Araraquara, São
Paulo, Brasil.

*autor correspondente: lucajr@foar.unesp.br

Telefone: +55 16 3301-6484; Fax: +55 16 3301-6488.

2.1 Resumo

PEREIRA, D. T. B., MENANI, J. V., DE LUCA, L. A. Jr. FURO/CAP: um protocolo para o incremento da ingestão de sódio. *PHYSIOL BEHAV* XX(Y) 000-000, 2008. Administração simultânea de furosemida (FURO) e captopril (CAP), totalizando dois ou quatro FURO/CAP intervalados por uma semana, e respectivo teste de ingestão induzida incrementou a ingestão de solução de NaCl 0,3 M e água no segundo e terceiro teste, respectivamente. Repetição do FURO/CAP também incrementou a ingestão diária de NaCl 0,3 M, mas não alterou a ingestão diária de água. O antagonista do receptor de angiotensina (ANG) II tipo-1, losartan (10, 20 ou 40 mg/kg) administrado simultaneamente com FURO/CAP, totalizando dois tratamentos combinados intervalados por uma semana, aboliu a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pelo FURO/CAP nos respectivos testes de ingestão induzida. Losartan nas menores doses (10 e 20 mg/kg) inibiu o incremento da ingestão diária de sódio e na maior dose (40 mg/kg) aboliu este incremento. Após o tratamento com apenas FURO/CAP, administração prévia de losartan nas maiores doses (20 e 40 mg/kg) paradoxalmente facilitou o incremento da ingestão diária de NaCl 0,3 M induzido pelo FURO/CAP, mas na menor dose (10 mg/kg) inibiu o incremento da ingestão diária de sódio e da ingestão induzida de água. Repetição do FURO/CAP também incrementou outro comportamento mediado pela ANG II encefálica: a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por 36 h de privação hídrica seguida de 2 h de rehidratação parcial com apenas água. Estes resultados sugerem que o FURO/CAP é um protocolo válido para se estudar o incremento da ingestão de sódio e talvez o incremento da ingestão induzida de água, e reforça o papel da ANG II encefálica

como um peptídeo que medeia alterações de longo prazo no comportamento ingestivo.

FURO/CAP, apetite ao sódio, angiotensina II, losartan, incremento, privação hídrica, sensibilização, natriurese

2.2 Introdução

Repetidos episódios de desidratação extracelular ou depleção de sódio aumentam a ingestão de solução hipertônica de sódio em ratos. Este fenômeno tem importantes características que correlacionam fisiologia ao comportamento motivado e à plasticidade comportamental. O incremento da ingestão de sódio ganhou maior importância com os resultados de uma série de experimentos que detalharam a sua relação com gênero, gravidez e mecanismos envolvendo o efeito organizacional de dois hormônios que facilitam o apetite ao sódio: angiotensina (ANG) II e o mineralocorticóide aldosterona (1, 2, 3). O incremento da ingestão de sódio ocorre não apenas com o apetite ao sódio (ingestão induzida), mas também com a ingestão espontânea de sódio (ingestão diária). O incremento tem sido demonstrado por diferentes laboratórios utilizando diferentes linhagens e procedimentos para induzir desidratação extracelular (diálise intraperitoneal, furosemida associada à dieta pobre em sódio por 24 h e privação hídrica), com implicações para a saúde e comportamentos de dependência (1-8). O incremento está também relacionado à sensibilização comportamental, efeito pronunciado de uma droga que aparece como resultado de prévias exposições à mesma droga, particularmente a sensibilização induzida por drogas de abuso (9).

Embora as implicações e os mecanismos do incremento da ingestão de sódio sejam interessantes, existe uma preocupação a respeito da reprodutibilidade do incremento como um fenômeno confiável para investigação. Tal preocupação é levantada a partir de estudos empregando repetidos episódios de injeção subcutânea de furosemida, potente diurético e natriurético, combinada com dieta pobre em sódio por 24 h (protocolo de furosemida). Por exemplo, um grupo de

investigadores mostrou resultados conflitantes entre ingestão espontânea e induzida usando diferentes linhagens e gêneros no protocolo de furosemida: ratos da linhagem Sprague-Dawley de ambos os gêneros apresentaram incremento da ingestão diária, mas não incrementaram a ingestão induzida; no entanto, ratos da linhagem Wistar se comportaram de modo exatamente oposto (5, 10).

Considerando apenas machos, o padrão do incremento foi novamente diferente entre ratos da linhagem Wistar originados de duas colônias diferentes (5); uma delas mostrou consistente incremento da ingestão induzida, mas incremento transiente da ingestão diária, semelhante ao que ocorre com ratos da linhagem Zucker (11). Além disso, incremento da ingestão induzida em ratos da linhagem Long Evans foi obtido em um laboratório, mas não em outro (12, 13). Estes resultados contrastam com os das pesquisas lideradas por Alan Epstein, nas quais observam-se consistente incremento da ingestão de sódio em ambas as condições, diária e induzida, em ratos da linhagem Sprague-Dawley de ambos os gêneros (1, 2, 7, 14, 15).

Os resultados de Epstein et al. mostraram que o apetite ao sódio e seu incremento, induzido pelo protocolo da furosemida, resultaram do sinergismo entre os níveis elevados de ANG II e aldosterona endógenas (1, 2, 3, 16, 17). No entanto, a ANG II pode induzir apetite ao sódio independentemente do aumento dos níveis circulantes de aldosterona, por exemplo, como resposta a adrenalectomia ou privação hídrica (8, 18-21) e também sensibilização comportamental.

Sensibilização comportamental pode ocorrer em resposta a um aumento diário de ANG II exógena no cérebro de ratos por meio de injeção intracerebroventricular (icv), feita através de uma cânula de demora, o que reforça a habilidade do peptídeo em induzir sede ou ingestão de NaCl 0,5 M (22, 23). Este

último efeito é surpreendente considerando a ineficácia de uma única dose de ANG II em induzir ingestão de NaCl hipertônico (24). Os resultados conflitantes entre o protocolo da furosemida e a habilidade da ANG II em sensibilizar a ingestão de sódio nos levaram a investigar um protocolo confiável no qual o peptídeo incrementa tanto a ingestão induzida quanto a diária.

Embora um método válido para injeção de drogas em regiões específicas do encéfalo, o implante de cânula encefálica envolve uma técnica elaborada e invasiva que pode acarretar algumas dificuldades em estudos de longo prazo, tais como aqueles relacionados com o incremento da ingestão de sódio. Além disso, a administração sistêmica de ANG II é menos eficaz do que administração central na indução do apetite ao sódio (25, 26). No entanto, existe um protocolo confiável para se induzir rapidamente apetite ao sódio, o qual se baseia no fato de que a ANG II formada no encéfalo desencadeia os circuitos que facilitam este comportamento. Este protocolo é conhecido como FURO/CAP e induz paradoxalmente sede e ingestão de NaCl hipertônico em ratos através da administração sistêmica de furosemida e captopril, inibidor da enzima conversora de ANG. O FURO/CAP é um protocolo muito mais efetivo do que uma única injeção icv de ANG II na indução da ingestão de NaCl hipertônico, provavelmente por causa da intensa conversão de ANG I em ANG II no encéfalo é facilitada pela leve hipotensão resultante da falta de ANG II na periferia (27). O princípio deste protocolo consiste no fato de que subsequente à administração de furosemida, a qual induz rapidamente intensa desidratação extracelular, poderoso estímulo para secreção de renina (enzima responsável pela conversão do angiotensinogênio em ANG I), captopril é administrado em baixa dosagem impedindo a formação de ANG II circulante e desse modo facilitando o aumento do aporte de ANG I em regiões encefálicas que não

foram atingidas pelo captopril (28, 29, 30). ANG I é então convertida em ANG II no encéfalo, por conseguinte a formação de ANG II encefálica desencadeia os circuitos que induzem apetite ao sódio e sede.

Assume-se que aumento episódico de ANG II encefálica em resposta a repetição do protocolo FURO/CAP incrementará o apetite ao sódio como resultado de sensibilização deste peptídeo. Portanto, o objetivo deste artigo foi testar se a repetição do protocolo FURO/CAP incrementa a ingestão induzida e espontânea de NaCl 0,3 M e água. Em seguida, tentou-se validar a participação da ANG II no bloqueio do incremento da ingestão de sódio através da administração de losartan, antagonista do receptor de ANG II tipo-1 (Agtr1). Finalmente, foi testado se a repetição do protocolo FURO/CAP incrementa o apetite ao sódio mediado pela ANG II em resposta a privação hídrica (31, 32).

2.3 Materiais e métodos

2.3.1 Animais

Foram utilizados noventa e três ratos adultos da linhagem Holtzman, criados no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, São Paulo, cujo peso inicial variou em 300 ± 5 g no início dos experimentos. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável em ambiente controlado: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ umidade e ciclo claro-escuro de 12:12 h, com o início da fase clara às 7 h da manhã. Água e solução de NaCl 0,3 M ficaram disponíveis “ad libitum” em dois bebedouros de polipropileno colocados na parte da frente da gaiola. Os bebedouros com capacidade para 100 ml eram graduados a cada 1 ml e tampados com rolhas

de borracha providas de bico de aço inoxidável. A leitura da ingestão espontânea de água e NaCl 0,3 M em 24 h foi realizada diariamente, a não ser quando indicado o contrário. Ração granulada contendo 0,5 – 1,0% de sódio (GUABI, Paulínia, SP, Brazil) ficou disponível à vontade para consumo em um recipiente localizado na lateral de cada gaiola. Os animais foram adaptados às condições laboratoriais (período de adaptação) por quatro dias e o registro da ingestão espontânea dos líquidos foi ignorado durante os três primeiros dias de ambientação individual. Todos os tratamentos foram aplicados pelos menos sete dias após o período de adaptação e a média da ingestão espontânea durante estes sete dias foi denominada ingestão basal. O teste de ingestão induzida pelo FURO/CAP foi iniciado entre 1 e 2 h da tarde, a rehidratação parcial seguida do teste do apetite ao sódio após 36 h de privação hídrica foi iniciada entre 8 e 9 h da manhã, e a leitura da ingestão diária foi realizada entre 4 e 6 h da tarde. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê Ético Institucional de Cuidados aos Animais (FOAr, UNESP) e seguidas as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

2.3.2 Drogas e soluções

Furosemida (FURO) (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA) foi dissolvida numa mistura de veículos de pH 9,0 que consistiu de (v/v) 96% de água deionizada e 4% de NaOH 1 M (LABSYNTH, Diadema, SP, Brazil) e injetada subcutaneamente (sc) na dose de 10 mg/ml, sendo 0,1 ml/100 g de peso corporal. O mesmo volume da mistura de veículos foi injetado sc em ratos controles.

Captopril (CAP) (SIGMA-ALDRICH, Saint Louis, MO, USA) foi dissolvido em solução de NaCl 0,15 M estéril (ASTER, Sorocaba, SP, Brazil) e injetado sc na dose

de 5 mg/ml, sendo 0,1 ml/100 g de peso corporal. O mesmo volume de salina isotônica estéril foi injetado sc em ratos controles.

Losartan (LOS) (DEG, Índia) foi dissolvido em solução de NaCl 0,15 M estéril (ASTER, Sorocaba, SP, Brazil) em três diferentes doses: 10, 20 e 40 mg/kg de peso corporal. Cada animal recebeu injeção intraperitoneal (ip) de uma das três doses, sendo 0,1 ml/100 g de peso corporal. O mesmo volume de salina isotônica estéril foi injetado ip em ratos controles.

Solução hipertônica de cloreto de sódio (NaCl 0,3 M) foi feita a partir do respectivo sal (LABSYNTH, Diadema, SP, Brazil) dissolvido em água filtrada.

Tiopental sódico (CRISTÁLIA, Itapira, SP, Brazil) foi injetado ip na dose de 8 mg/100 g de peso corporal para o sacrifício dos animais ao término dos experimentos.

2.3.3 Teste de ingestão induzida: apetite ao sódio e sede induzido pelo FURO/CAP

Os animais foram cuidadosamente retirados das gaiolas, pesados e receberam administração simultânea do diurético e natriurético furosemida, FURO (10 mg/kg), e de baixa dose de captopril, CAP (5 mg/kg) (FURO/CAP). A seguir, os animais retornaram à gaiola, da qual ração e os bebedouros contendo água e NaCl 0,3 M foram removidos. Após 1 h, buretas de vidro com divisões a cada 0,1 ml, providas de bico de aço inoxidável e contendo água ou NaCl 0,3 M foram oferecidas simultaneamente. A leitura das ingestões foi realizada aos 15, 30, 60 e 120 min (teste de ingestão induzida). Ao término do teste, as buretas de vidro foram substituídas pelos bebedouros de polipropileno, os quais permaneceram disponíveis

juntamente com a ração até o próximo FURO/CAP e respectivo teste de ingestão induzida. Ratos controle (VEH/VEH) receberam os respectivos veículos, água deionizada pH 9,0 e salina isotônica estéril, ao invés de FURO/CAP. A ingestão de líquidos por 2 h que ocorreu durante o teste de ingestão induzida não foi considerada na análise da ingestão diária.

2.3.4 Privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP) e teste do apetite ao sódio

O apetite ao sódio induzido pelo protocolo PHRP envolve eliminação da sede após o período de privação hídrica, que ocorre antes dos animais terem acesso ao NaCl hipertônico e a água para ingerirem (20, 31, 32).

Os animais foram cuidadosamente retirados das gaiolas, pesados e retornaram as gaiolas, da qual os bebedouros contendo água e NaCl 0,3 M foram removidos. Os animais tiveram acesso somente à ração por 36 h (privação hídrica, PH). Após a PH, a ração foi removida do recipiente lateral das gaiolas, os animais foram pesados e retornados às gaiolas. A seguir, bureta de vidro com divisões a cada 0,1 ml, provida de bico de aço inoxidável e contendo água foi oferecida aos animais, e a ingestão de água foi mensurada após 2 h (teste de sede), durante o período de rehidratação parcial (RP). Após o RP, uma segunda bureta de vidro contendo solução de NaCl 0,3 M foi oferecida e as ingestões de NaCl 0,3 M e água foram mensuradas após 2 h (teste de apetite ao sódio). Ao término do teste, as buretas de vidro foram substituídas pelos bebedouros de polipropileno, os quais permaneceram disponíveis juntamente com a ração até a próxima PHRP e respectivo teste de apetite ao sódio, que ocorreram sete dias após a primeira PHRP.

A ingestão de líquidos por 4 h que ocorreu durante os testes de sede e apetite ao sódio não foi considerada na análise da ingestão diária.

2.3.5 Excreção Urinária

Amostras de urina foram coletadas em tubos de polipropileno graduados a cada 0,1 ml e o volume urinário (UV) foi mensurado. A concentração de sódio na urina foi determinada num eletrodo íon-específico (NOVA modelo 1, NOVA BIOMEDICAL) por potenciometria (33), e a quantidade total de sódio excretada na urina (UNaV) foi inferida pelo produto do UV pela concentração de sódio na urina. Osmolalidade urinária (UOsmol) foi determinada num osmômetro (Digimatic modelo 3D2, ADVANCED INSTRUMENTS) por diminuição do ponto de congelamento (34).

2.3.6 Análise estatística

Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média. Utilizou-se análise de variância (ANOVA) de dois fatores com medidas repetidas e de um fator com medidas não-repetidas. Os fatores considerados foram tempo, semana, teste e/ou grupo. A significância das interações foi testada posteriormente a ANOVA com o teste Student Newman Keuls. Teste “t” de Student pareado foi utilizado para avaliar semanas ou testes. O nível de significância foi fixado em p 0,05 para ambos os testes.

2.3.7 Experimento 1. Efeito da repetição do FURO/CAP na ingestão induzida e espontânea de NaCl 0,3 M.

Este experimento foi um experimento-piloto destinado a testar se repetidos episódios de FURO/CAP incrementam a ingestão de solução de NaCl 0,3 M induzida por FURO/CAP e também a ingestão diária de NaCl 0,3 M nos mesmos animais.

Após a medida da ingestão basal, os animais receberam um 1º FURO/CAP (FURO/CAP, n = 8) ou veículo (VEH/VEH, n = 8) e entraram no respectivo teste de ingestão induzida. Ao término do teste, as buretas de vidro foram substituídas pelos bebedouros de polipropileno contendo NaCl 0,3 M e água, os quais permaneceram juntamente com a ração até o próximo FURO/CAP e teste. FURO/CAP ou VEH/VEH e respectivo teste de ingestão induzida foram repetidos a cada sete dias por mais três vezes. A ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M e água foi mensurada durante todo o experimento, ou seja, por 35 dias.

2.3.8 Experimento 2. Efeito da repetição do FURO/CAP na ingestão de NaCl 0,3 M e excreção urinária: combinação com antagonista de receptor de ANG II.

O FURO/CAP induz ingestão de sódio e água dependente da ativação de receptores encefálicos de ANG II e estas ingestões são inibidas pela administração sistêmica de losartan, antagonista de receptor Agtr1 (29, 30, 35, 36). Portanto, é possível que o mesmo tipo de administração interfira com o incremento induzido pelo FURO/CAP. Neste experimento, o objetivo foi o de testar se o incremento induzido

pela repetição do FURO/CAP é inibido pelo losartan e se este incremento é acompanhado de alterações na excreção urinária.

Animais (n = 45) submetidos à repetição do FURO/CAP, combinada ou não com losartan (LOS), foram ambientados 1 h por dia em gaiolas metabólicas durante o período de adaptação. Os animais foram divididos em quatro grupos: um grupo que recebeu FURO/CAP combinado com o veículo do LOS (salina isotônica estéril, SAL) e três grupos nos quais o FURO/CAP foi combinado com uma dose de LOS (10, 20 ou 40 mg/kg). No dia do teste de ingestão induzida, os animais foram retirados de suas gaiolas individuais, receberam massagem pélvica para evitar retenção urinária e então, foram retornados para suas gaiolas individuais. Após 10 min, os animais foram pesados, receberam uma injeção ip de SAL (FURO/CAP + SAL) ou LOS 10, 20 ou 40 mg/kg (FURO/CAP + LOS 10, 20 ou 40, respectivamente) e logo a seguir, foram colocados em gaiolas metabólicas. Após 50 min, os animais receberam uma segunda injeção ip de SAL ou LOS (10, 20 ou 40 mg/kg). Massagem pélvica foi realizada novamente para garantir total excreção urinária e os animais retornados as gaiolas metabólicas. Após 10 min, todos os animais foram transferidos para suas gaiolas individuais para realização do teste de ingestão induzida. Um quinto (VEH/VEH + SAL) grupo recebeu injeção de apenas os respectivos veículos ao invés de FURO/CAP ou LOS no mesmo protocolo acima citado. Ração não foi disponibilizada durante os testes. A seqüência deste protocolo está demonstrada no diagrama da Fig. 1.

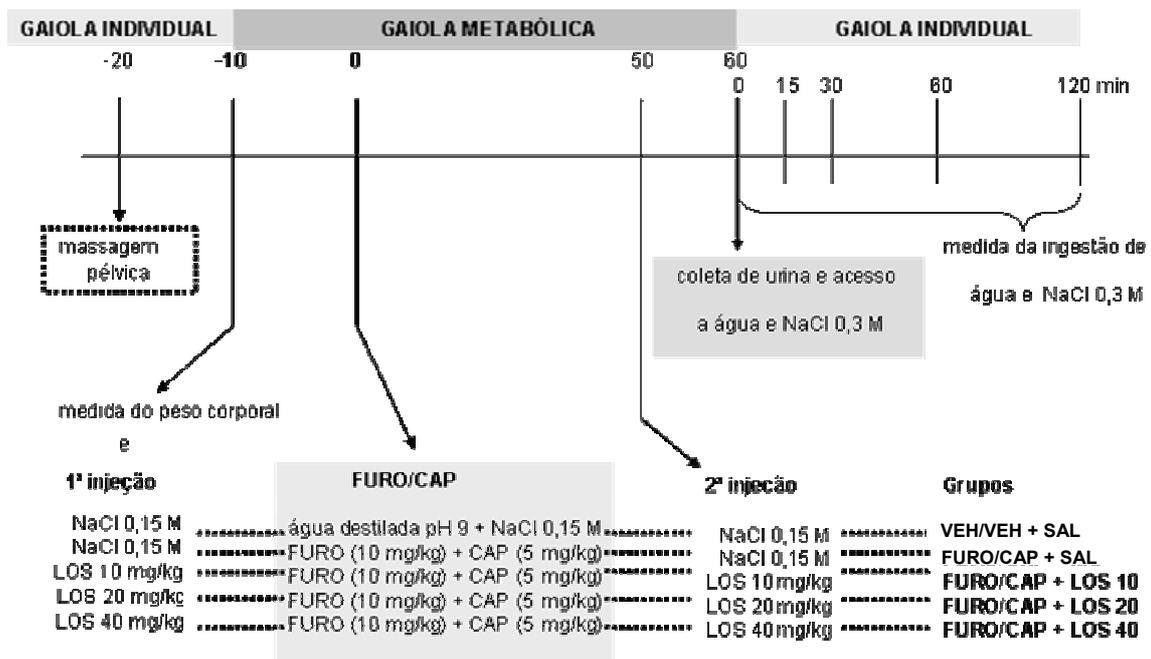


Figura 1. Diagrama ilustrando a seqüência de procedimentos realizados em diferentes grupos de animais do Experimento 2 durante a coleta de excreção urinária e teste de ingestão induzida pelo FURO/CAP.

2.3.8.1 Experimento 2a. Efeito do losartan no incremento da ingestão induzida de NaCl 0,3 M por repetição do FURO/CAP: experimento de validação do papel da ANG II.

O teste de ingestão induzida foi realizado, como descrito previamente, e repetido duas vezes sendo de uma semana o intervalo entre cada teste.

2.3.8.2 Experimento 2b. Efeito do FURO/CAP, combinado ou não com losartan, na excreção urinária.

Urina foi coletada antes dos animais ingressarem no teste de ingestão induzida do Experimento 2a. O UV foi determinado e a UNaV inferida em ambos os testes, como descrito previamente.

2.3.8.3 Experimento 2c. Efeito do losartan no incremento da ingestão espontânea de NaCl 0,3 M induzido pela repetição do FURO/CAP.

As ingestões diárias de solução de NaCl 0,3 M e água foram mensuradas por três semanas, sendo a primeira anterior ao 1º teste de ingestão induzida (basal), a segunda entre os dois testes (2ª semana), e a terceira após o 2º teste (3ª semana).

2.3.8.4 Experimento 2d. Efeito do FURO/CAP na ingestão induzida e espontânea de NaCl 0,3 M em animais com histórico de veículo ou losartan combinado ao FURO/CAP.

Os animais testados no Experimento 2a foram submetidos a um 3º teste de ingestão induzida, no qual todos os grupos receberam apenas FURO/CAP uma semana após o 2º teste. A previsão neste experimento era de que animais previamente tratados, 1º e 2º teste, com veículo (VEH/VEH + SAL group) e losartan (FURO/CAP + LOS) apresentassem menor ingestão induzida de solução de NaCl 0,3 M do que o grupo FURO/CAP + SAL. Urina também foi coletada nestes animais antes deles serem submetidos ao 3º teste de ingestão induzida. O UV foi determinado e a UNaV foi inferida. Ração, água e NaCl 0,3 M permaneceram disponíveis aos animais após o 3º teste por mais uma semana (4ª semana). Novamente, a previsão era de que a ingestão diária de NaCl 0,3 M do grupo

FURO/CAP + SAL fosse maior do que a dos demais grupos. Essas previsões são baseadas no fato de que os receptores de ANG II bloqueados pelo losartan, mas na presença de níveis elevados de ANG II (FURO/CAP + LOS) ou livres, mas na presença de níveis basais de ANG II (VEH/VEH + SAL), não deveriam mediar o incremento da ingestão de sódio.

2.3.9 Experimento 3. FURO/CAP e sensibilização do apetite ao sódio induzido por privação hídrica.

Baseado em estudos prévios (37, 38), em 1996 Sato e colaboradores (31) desenvolveram um protocolo: PHRP, para analisar o apetite ao sódio induzido pela PH, no qual permite-se primeiramente que o rato privado de água saciar-se totalmente ao ingerir apenas água. Este simples procedimento permite interpretar a subsequente ingestão de NaCl hipertônico como sendo apetite ao sódio, e esta ingestão permite que o animal recupere totalmente a perda de volume extracelular que ocorre na falta de água e sódio (20, 32).

A ANG II medeia o apetite ao sódio induzido pela PH, pois este apetite é inibido pelo antagonismo do sistema renina-ANG (31). Portanto, é possível que repetidas ações episódicas da ANG II encefálica resultante da repetição do FURO/CAP irão também sensibilizar o apetite ao sódio induzido pela PH. O objetivo deste experimento foi descobrir se repetidos episódios de FURO/CAP incrementam o apetite ao sódio após PHRP.

Após a medida da ingestão basal, os animais foram submetidos ao 1º FURO/CAP (FURO/CAP, n = 12) ou veículo (VEH/VEH, n = 12), e o 1º teste de ingestão induzida foi realizado. Ao término do teste, as buretas de vidro foram

substituídas pelos bebedouros de polipropileno e permaneceram disponíveis juntamente com a ração por mais uma semana. A seguir, os animais foram submetidos ao 2º FURO/CAP ou VEH/VEH, e o 2º teste de ingestão induzida foi realizado. Os animais permaneceram com livre acesso à ração, água e solução de NaCl 0,3 M por mais uma semana. Logo após, ambos os grupos VEH/VEH e FURO/CAP foram submetidos a 1ª PH de 36 h seguida do 3º teste: testes de sede e apetite ao sódio. Ao término do teste de apetite ao sódio, as buretas de vidro foram substituídas pelos bebedouros de polipropileno, os quais permaneceram disponíveis juntamente com a ração por mais uma semana. A seguir, novamente ambos os grupos foram submetidos a 2ª PH de 36 h seguida do 4º teste: testes de sede e apetite ao sódio. Em suma, os animais foram testados quatro vezes, sendo as duas primeiras em resposta ao FURO/CAP ou VEH/VEH, e as duas últimas em resposta a PHRP em todos os animais. A ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M e água foi mensurada durante todo o experimento, ou seja, por 35 dias.

2.4 Resultados

2.4.1 Experimento 1. Efeito da repetição do FURO/CAP na ingestão induzida e espontânea de NaCl 0,3 M

A ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo FURO/CAP foi maior aos 15 min do 3º e 4º teste de ingestão induzida quando comparada ao 1º e 2º teste [tempo, $F(3, 21) = 12,2$; teste, $F(3, 21) = 4,4$; tempo vs. teste, $F(9, 63) = 3,7$; $p < 0,05$] (Fig. 2). O mesmo incremento foi observado aos 60 min do 3º teste [$p < 0,05$] (Fig. 2). No entanto, ao término das 2 h do teste de ingestão induzida, apenas ratos que receberam

FURO/CAP pela 3ª vez apresentaram incremento da ingestão induzida de NaCl 0,3 M [p 0,05] (Fig. 2).

A ingestão de água induzida pelo FURO/CAP foi maior aos 15 min do 3º e 4º teste de ingestão induzida quando comparada ao 1º e 2º teste [time, $F(3, 21) = 89,4$; test, $F(3, 21) = 14,9$; time vs. test, $F(9, 63) = 10,1$; p 0.05] (Fig. 2). O mesmo incremento foi observado aos 60 e 120 min do 3º teste e aos 30 min do 4º teste [p 0,05] (Fig. 2). Os animais ingeriram menor quantidade de água aos 15 min do 2º teste quando comparada ao 3º teste [p 0,05] (Fig. 2). Animais tratados com VEH/VEH ingeriram insignificante quantidade de NaCl 0,3 M ($0,5 \pm 0,3$ ml/2 h, por teste) e água ($0,6 \pm 0,4$ ml/2 h, por teste) quando comparados aos animais tratados com FURO/CAP [teste “t” não-pareado; p 0,05].

Repetição do FURO/CAP aumentou a ingestão diária de NaCl 0,3 M a partir da 3ª semana quando comparada com a ingestão do grupo VEH/VEH nas respectivas semanas, e com a ingestão do mesmo grupo na 1ª (basal) e 2ª semana [semana, $F(4, 56) = 7,9$; grupo, $F(1, 14) = 12,5$; semana. vs. grupo, $F(4, 56) = 2,5$; p 0,05] (Fig. 3). A ingestão diária de água não foi alterada com a repetição do FURO/CAP e foi semelhante entre os grupos [semana, $F(4, 56) = 2,1$; grupo, $F(1, 14) = 0,2$; semana vs. grupo, $F(4, 56) = 0,8$] (Fig. 3).

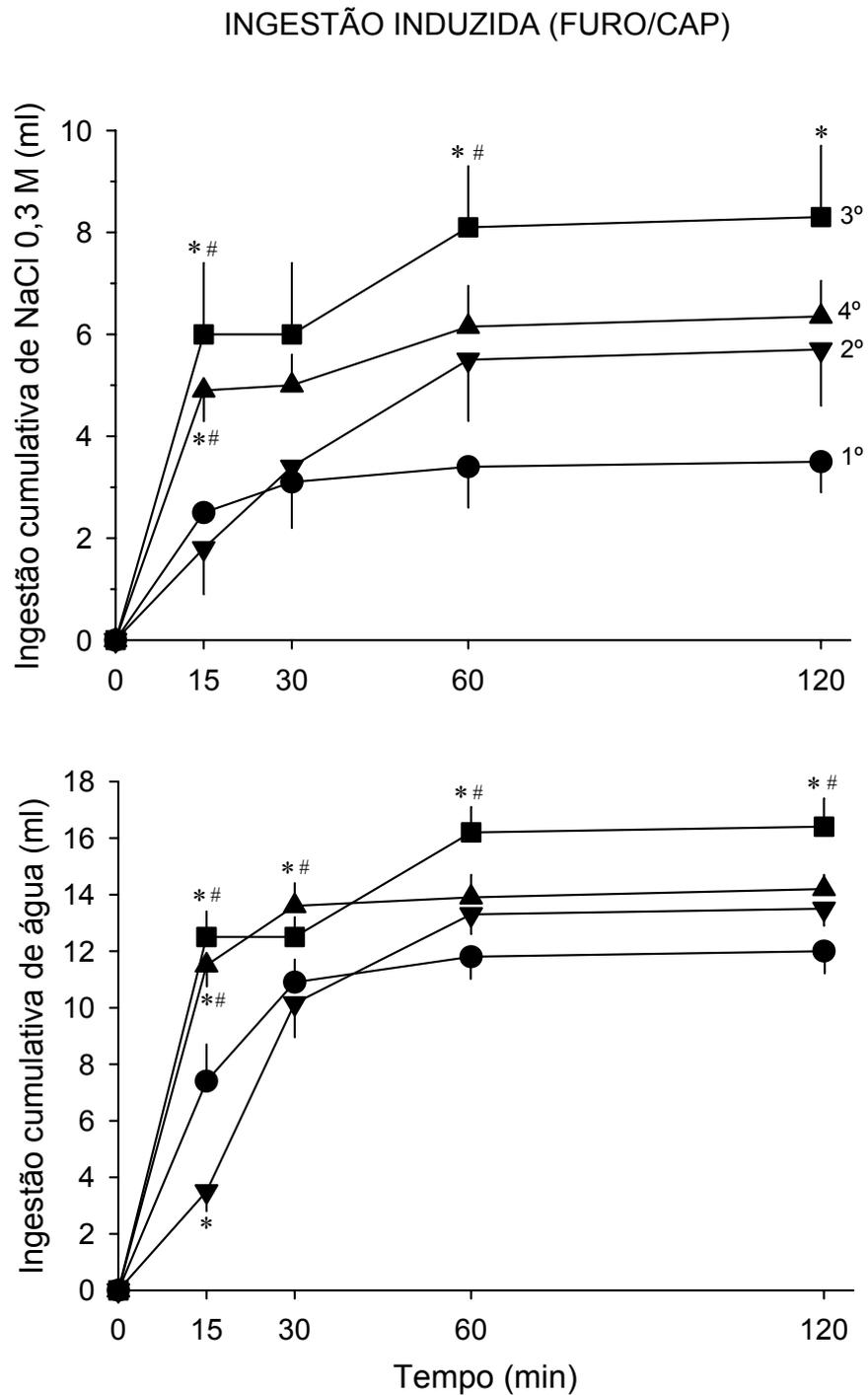


Figura 2. Ingestão de NaCl 0,3 M e água durante os testes de ingestão induzida em ratos do Experimento 1 submetidos a repetição do FURO/CAP – 1° (círculo), 2° (triângulo para baixo), 3° (quadrado) e 4° (triângulo para cima) –, sendo de sete dias o intervalo entre cada teste. * p 0,05 vs. 1° teste, # p 0,05 vs. 2° teste; n = 8 por grupo.

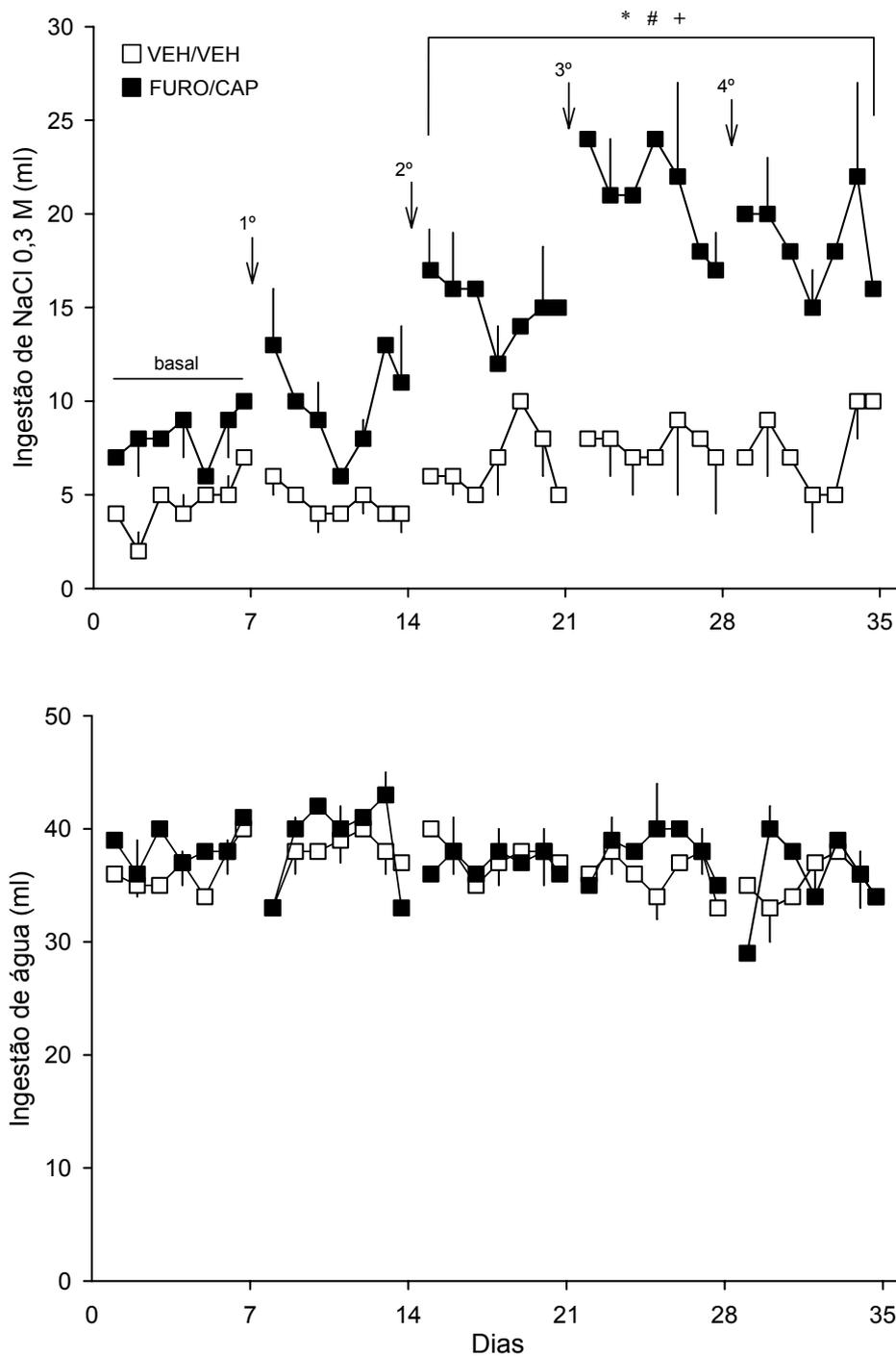


Figura 3. Ingestão diária de NaCl 0,3 M e água em ratos do Experimento 1 submetidos a repetição do FURO/CAP (FURO/CAP, quadrado preto) ou veículo (VEH/VEH, quadrado branco), sendo de sete dias o intervalo entre cada repetição. * p 0,05 vs. basal; # p 0,05 vs. 2ª semana, + p 0,05 vs. VEH/VEH; n = 8 por grupo.

2.4.2 Experimento 2. Efeito da repetição do FURO/CAP na ingestão de NaCl 0,3 M e excreção urinária: combinação com antagonista de receptor de ANG II

2.4.2.1 Experimento 2a. Efeito do losartan no incremento da ingestão induzida de NaCl 0,3 M por repetição do FURO/CAP: experimento de validação do papel da ANG II

Repetição do protocolo FURO/CAP + SAL aumentou a ingestão de NaCl 0,3 M e água no 2º teste de ingestão induzida quando comparada a ingestão do mesmo grupo no 1º teste [NaCl 0,3 M: grupo, $F(4, 40) = 33,3$; teste, $F(1, 40) = 18,3$; grupo vs. teste, $F(4, 40) = 10,5$; $p < 0,05$] [água: grupo, $F(4, 40) = 63,4$; teste, $F(1, 40) = 4,6$; grupo vs. teste, $F(4, 40) = 2,8$; $p < 0,05$] (Fig. 4). Todas as doses de LOS inibiram por completo a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pelo FURO/CAP nos dois testes [$p < 0,05$] (Fig. 4).

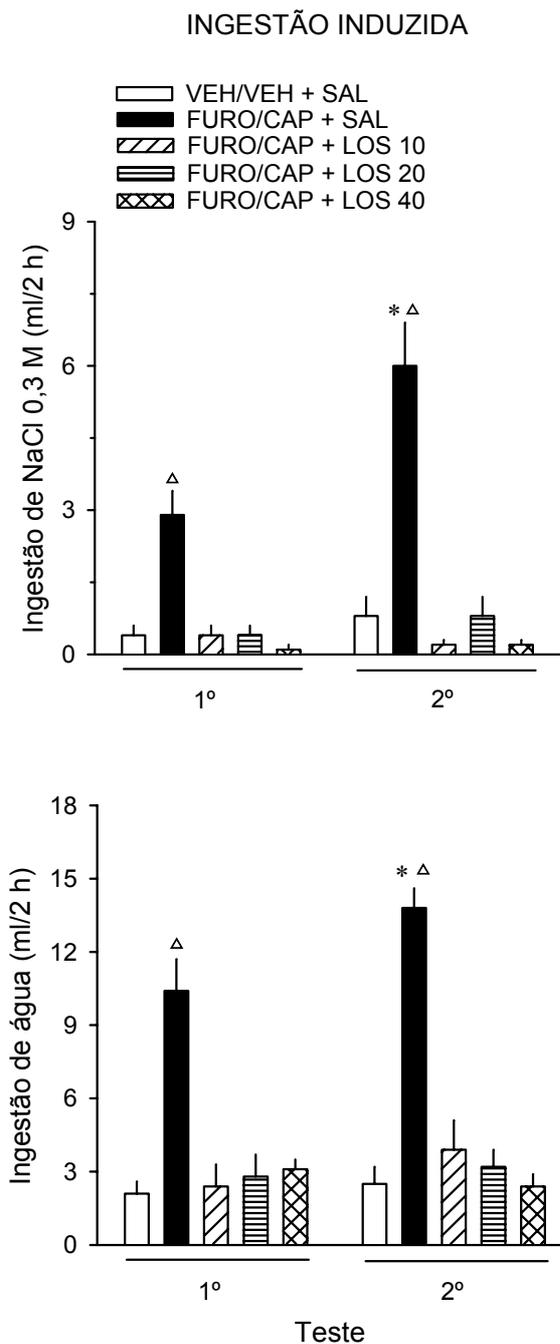


Figura 4. Ingestão de NaCl 0,3 M e água durante o 1º e 2º teste de ingestão induzida em ratos do Experimento 2a submetidos a repetição dos seguintes protocolos: VEH/VEH + SAL (barra branca), FURO/CAP + SAL (barra preta) ou FURO/CAP + LOS 10, 20 ou 40 mg/kg (barras achuradas), sendo de sete dias o intervalo entre cada protocolo. * p 0,05 vs. basal, [△] p 0,05 vs. todos os grupos; n = 9 por grupo.

2.4.2.2 Experimento 2b. Efeito do FURO/CAP, combinado ou não com losartan, na excreção urinária

O protocolo FURO/CAP + SAL induziu diurese e natriurese em ambos os testes quando comparados com o grupo VEH/VEH + SAL [UV: grupo, $F(4, 40) = 83,2$; $p < 0,05$; teste, $F(1, 40) = 0,2$; grupo vs. teste, $F(4, 40) = 1,2$] [UNaV: grupo, $F(4, 40) = 58,2$; $p < 0,05$; teste, $F(1, 40) = 0,08$; grupo vs. teste, $F(4, 40) = 1,3$] (Fig. 5). O UV e a UNaV foram semelhantes entre o 1º e 2º FURO/CAP + SAL (Fig 5). A diurese e natriurese induzida pelo FURO/CAP foram reduzidas em 40% por todas as doses de LOS em ambos os testes [$p < 0,05$] (Fig. 5).

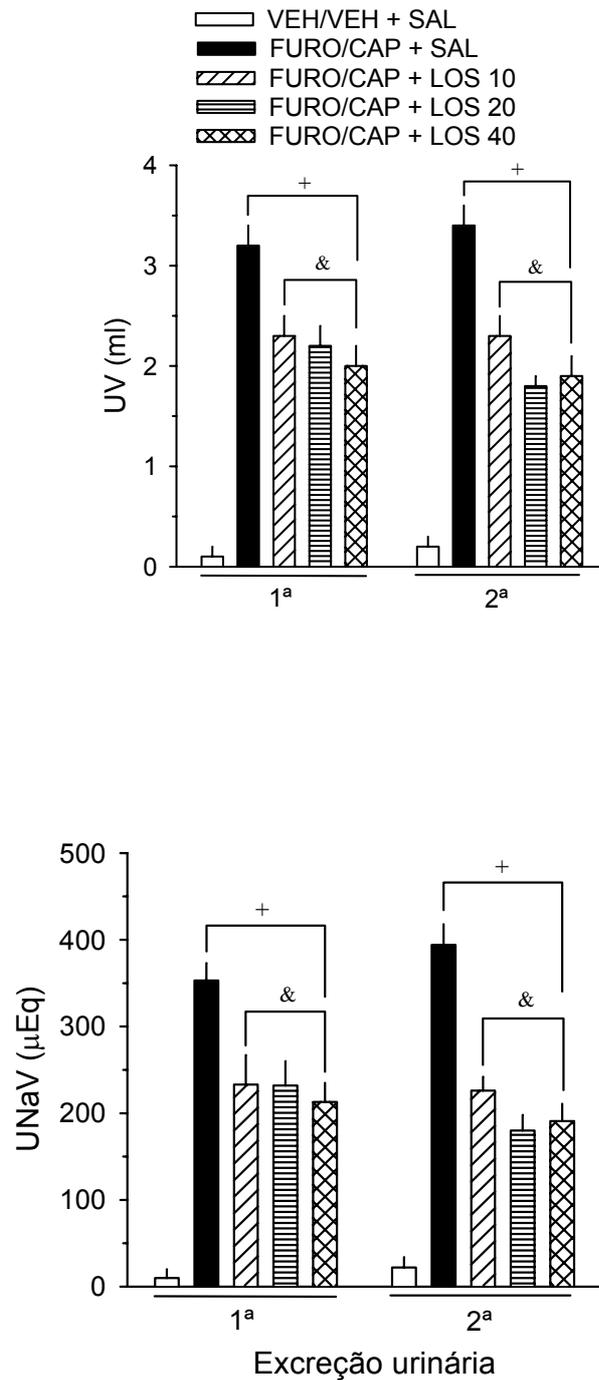


Figura 5. Excreção urinária (UV e UNaV) induzida pelo 1º e 2º FURO/CAP em ratos do Experimento 2b submetidos a repetição dos seguintes protocolos: VEH/VEH + SAL (barra branca), FURO/CAP + SAL (barra preta) ou FURO/CAP + LOS 10, 20 ou 40 mg/kg (barras achuradas), sendo de sete dias o intervalo entre cada protocolo. ⁺ p 0,05 vs. VEH/VEH + SAL, & p 0,05 vs. FURO/CAP + SAL; n = 9 por grupo.

2.4.2.3 Experimento 2c. Efeito do losartan no incremento da ingestão espontânea de NaCl 0,3 M induzido pela repetição do FURO/CAP

O 1º FURO/CAP + SAL aumentou a ingestão diária de NaCl 0,3 M quando comparada a respectiva ingestão basal (1ª semana) e a ingestão dos demais grupos [semana, $F(2, 40) = 40,3$; grupo, $F(4, 40) = 3,2$; semana vs. grupo, $F(8, 80) = 5,9$; $p < 0,05$] (Fig. 6). O 2º FURO/CAP aumentou ainda mais a ingestão diária de NaCl 0,3 M quando comparada a ingestão do mesmo grupo na 1ª (basal) e 2ª semana e a ingestão dos demais grupos [$p < 0,05$] (Fig. 6). O LOS 10 e 20 mg/kg inibiu o incremento da ingestão diária de NaCl 0,3 M induzido pela repetição do FURO/CAP [$p < 0,05$] (Fig. 6). Ambos os tratamentos fizeram com que o incremento aparecesse somente na 3ª semana, quando a ingestão destes dois grupos foi maior que as suas respectivas ingestões na 1ª (basal) e 2ª semana [$p < 0,05$] (Fig. 6). Entretanto, o LOS 40 mg/kg aboliu o incremento da ingestão diária de NaCl 0,3 M induzido pela repetição do FURO/CAP [$p < 0,05$] (Fig. 6). A ingestão diária de água não foi alterada pela repetição do FURO/CAP combinada ou não com LOS e foi semelhante entre os grupos [semana, $F(2, 40) = 0,1$; grupo, $F(4, 40) = 0,3$; semana vs. grupo, $F(8, 80) = 2,0$] (Fig. 6).

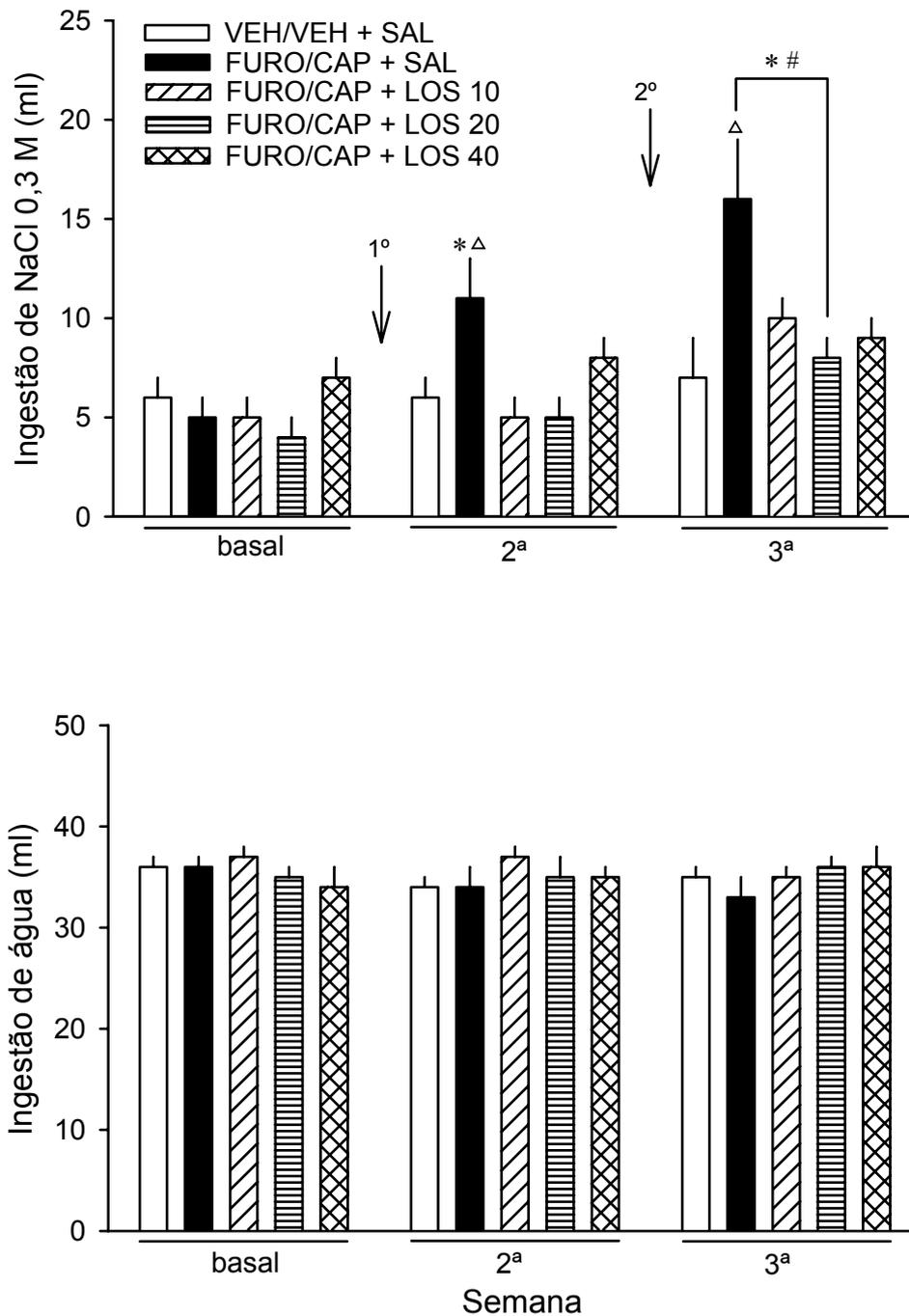


Figura 6. Ingestão diária de NaCl 0,3 M e água em ratos do Experimento 2c submetidos a repetição dos seguintes protocolos: VEH/VEH + SAL (barra branca), FURO/CAP + SAL (barra preta) ou FURO/CAP + LOS 10, 20 ou 40 mg/kg (barras achuradas), sendo de sete dias o intervalo entre cada protocolo. * p 0,05 vs. basal; # p 0,05 vs. 2^a semana, Δ p 0,05 vs. todos os grupos; n = 9 por grupo.

2.4.2.4 Experimento 2d. Efeito do FURO/CAP na ingestão induzida e espontânea de NaCl 0,3 M em animais com histórico de veículo ou losartan combinado ao FURO/CAP

Os resultados descritos abaixo se referem aos 15 min do 3º teste de ingestão induzida, pois foi neste tempo que se observou incremento da ingestão induzida de solução de NaCl 0,3 M e água no 3º e 4º FURO/CAP do Experimento 1 (vide Fig. 2). Sendo assim, no 3º teste de ingestão induzida, não houve diferença entre os grupos na quantidade de NaCl 0,3 M ($2,8 \pm 0,4$ ml/15 min, média por grupo) ingerida em resposta ao tratamento com FURO/CAP [grupo, $F(4, 40) = 0,8$] (Fig. 7). Animais previamente tratados com LOS 10, 20 ou 40 mg/kg ou veículo, mas não os tratados com FURO/CAP + SAL, ingeriram maior quantidade de NaCl 0,3 M e água no 3º teste quando comparados aos seus respectivos 2º teste [NaCl 0,3 M, grupo, $F(4, 40) = 4,7$; teste, $F(1, 40) = 24,2$; $p < 0,05$, grupo vs. teste, $F(4, 40) = 1,3$] [água, grupo, $F(4, 40) = 16,0$; teste, $F(1, 40) = 69,5$; grupo vs. teste, $F(4, 40) = 8,8$; $p < 0,05$] (Fig. 7).

A ingestão de água induzida pelo FURO/CAP no 3º teste foi menor no grupo previamente tratado com LOS 10 mg/kg ($6,2 \pm 0,6$ ml/15 min) quando comparado ao grupo FURO/CAP + SAL e VEH/VEH + SAL ($10,2 \pm 1,0$ ml/15 min, média por grupo) [grupo, $F(4, 40) = 3,7$; $p < 0,05$] (Fig. 7). No entanto, a quantidade de água ingerida pelos grupos previamente tratados com LOS 20 ou 40 mg/kg, FURO/CAP + SAL e VEH/VEH + SAL foram semelhantes (Fig. 7).

No 3º teste, quando os animais foram tratados com FURO/CAP, todos os grupos apresentaram semelhante diurese e natriurese [UV: grupo, $F(4, 40) = 2,3$] [UNaV: grupo, $F(4, 40) = 1,3$] (Fig. 8).

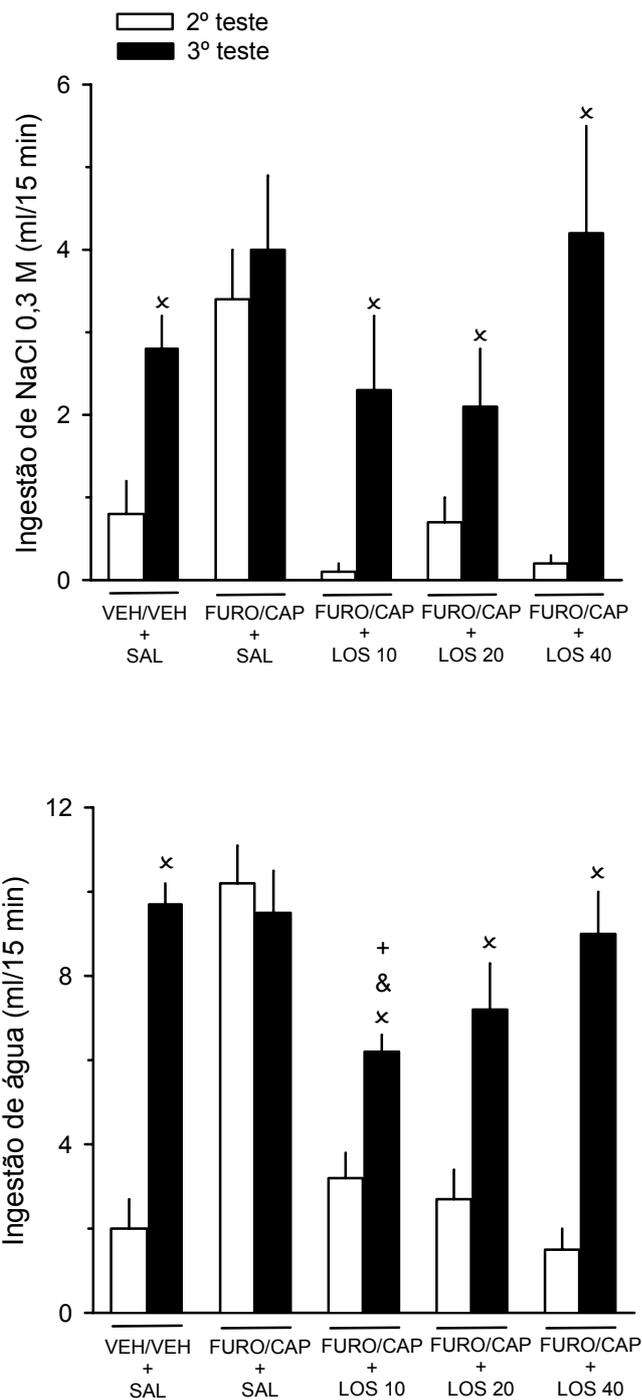


Figura 7. Ingestão de NaCl 0,3 M e água durante o 2º (barra branca) e 3º (barra preta) teste de ingestão induzida em ratos do Experimento 2d submetidos a repetição do VEH/VEH + SAL, FURO/CAP + SAL ou FURO/CAP + LOS 10, 20 ou 40 mg/kg, sendo de sete dias o intervalo entre cada teste. * p 0,05 vs. 2º teste, & p 0,05 vs. FURO/CAP + SAL, + p 0,05 vs. VEH/VEH + SAL; n = 9 por grupo.

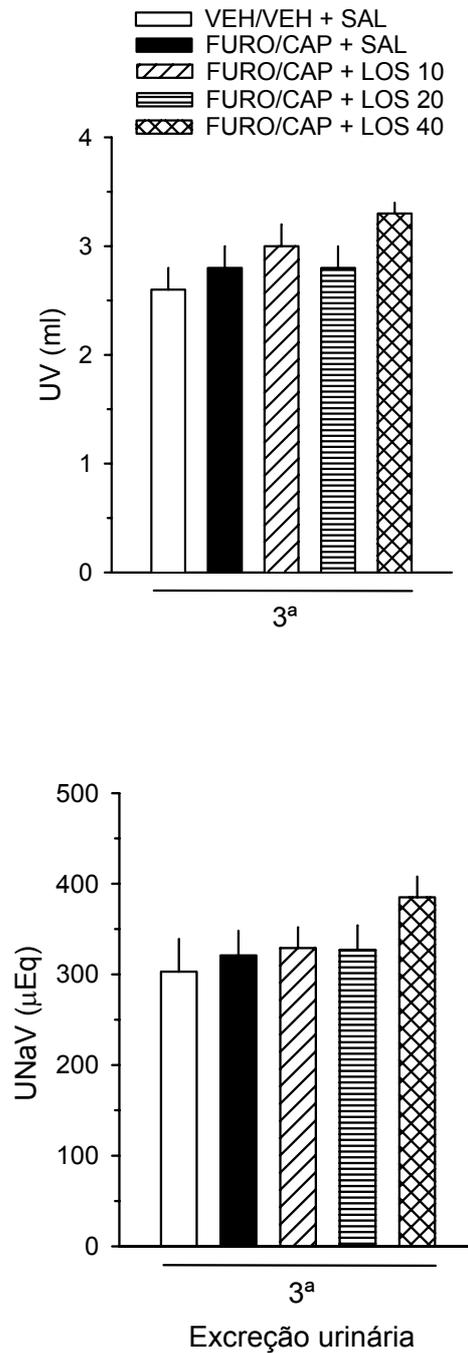


Figura 8. Excreção urinária (UV e UNaV) induzida pelo 3º FURO/CAP em ratos do Experimento 2d submetidos a prévios VEH/VEH + SAL (barra branca), FURO/CAP + SAL (barra preta) ou FURO/CAP + LOS 10, 20 ou 40 mg/kg (barras achuradas); n = 9 por grupo.

A ingestão diária de NaCl 0,3 M após o 3º FURO/CAP (4ª semana) foi menor no grupo previamente tratado com LOS 10 mg/kg e no grupo VEH/VEH + SAL ($10,2 \pm 1,0$ ml, média por grupo) comparados com FURO/CAP + SAL ($15,3 \pm 1,0$ ml) [grupo, $F(4, 40) = 4,0$; $p < 0,05$] (Fig. 9). Animais previamente tratados com LOS 20 e 40 mg/kg, mas não com VEH/VEH e FURO/CAP + SAL ou LOS 10, ingeriram mais NaCl 0,3 M na 4ª semana do que na 3ª semana [semana, $F(1, 40) = 15,0$; $p < 0,05$; grupo, $F(4, 40) = 2,3$; semana vs. grupo, $F(4, 40) = 3,7$] (Fig. 9). A ingestão diária de água (35 ± 2 ml, média por grupo) na 3ª e 4ª semana foi semelhante entre todos os grupos [semana, $F(1, 40) = 0,09$; grupo, $F(4, 40) = 0,2$; semana vs. grupo, $F(4, 40) = 0,6$] (Fig. 9).

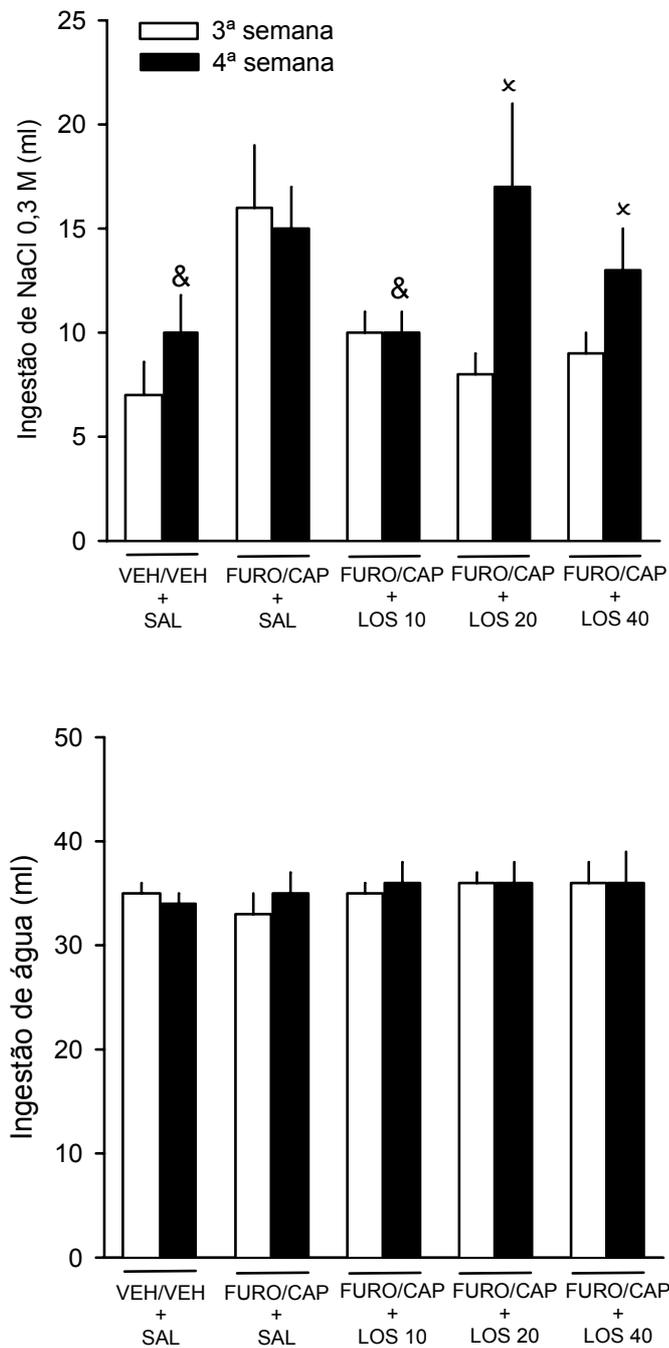


Figura 9. Ingestão diária de NaCl 0,3 M e água durante a 2ª (barra branca) e 3ª (barra preta) semana em ratos do Experimento 2d submetidos a prévios VEH/VEH + SAL (barra branca), FURO/CAP + SAL (barra preta) ou FURO/CAP + LOS 10, 20 ou 40 mg/kg (barras achuradas). * p 0,05 vs. 3ª semana, & p 0,05 vs. FURO/CAP + SAL; n = 9 por grupo.

2.4.3 Experimento 3. FURO/CAP e sensibilização do apetite ao sódio induzido por privação hídrica

A ingestão de água durante o 1º teste de sede (3º teste) foi semelhante entre os grupos FURO/CAP e VEH/VEH ($23,8 \pm 0,7$ ml, média por grupo); no entanto, a ingestão de água no 2º teste de sede (4º teste) foi maior nos animais previamente tratados com FURO/CAP ($25,9 \pm 1,2$ ml) comparados aos animais previamente tratados com VEH/VEH ($22,3 \pm 0,7$ ml) [grupo, $F(1, 22) = 5,2$; $p < 0,05$; teste, $F(1, 22) = 0,9$; grupo vs. teste, $F(1, 22) = 0,6$].

Tratamento prévio com FURO/CAP induziu aumento na ingestão de NaCl 0,3 M no 1º teste do apetite ao sódio (3º teste) [grupo, $F(1, 11) = 8,2$; teste, $F(1, 11) = 3,8$; grupo vs. teste, $F(1, 11) = 3,7$; $p < 0,05$] (Fig. 10). A ingestão de água durante este teste também foi maior no grupo FURO/CAP [grupo, $F(1, 11) = 6,8$; teste, $F(1, 11) = 17,1$; grupo vs. teste, $F(1, 11) = 4,8$; $p < 0,05$] (Fig. 10). Nos animais previamente tratados com VEH/VEH, a PHRP induziu aumento da ingestão de NaCl 0,3 M e água no 2º teste do apetite ao sódio (4º teste) quando comparado com o 3º teste [$p < 0,05$] (Fig. 10). No grupo FURO/CAP, a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela PHRP foi semelhante em ambos os testes (Fig. 10).

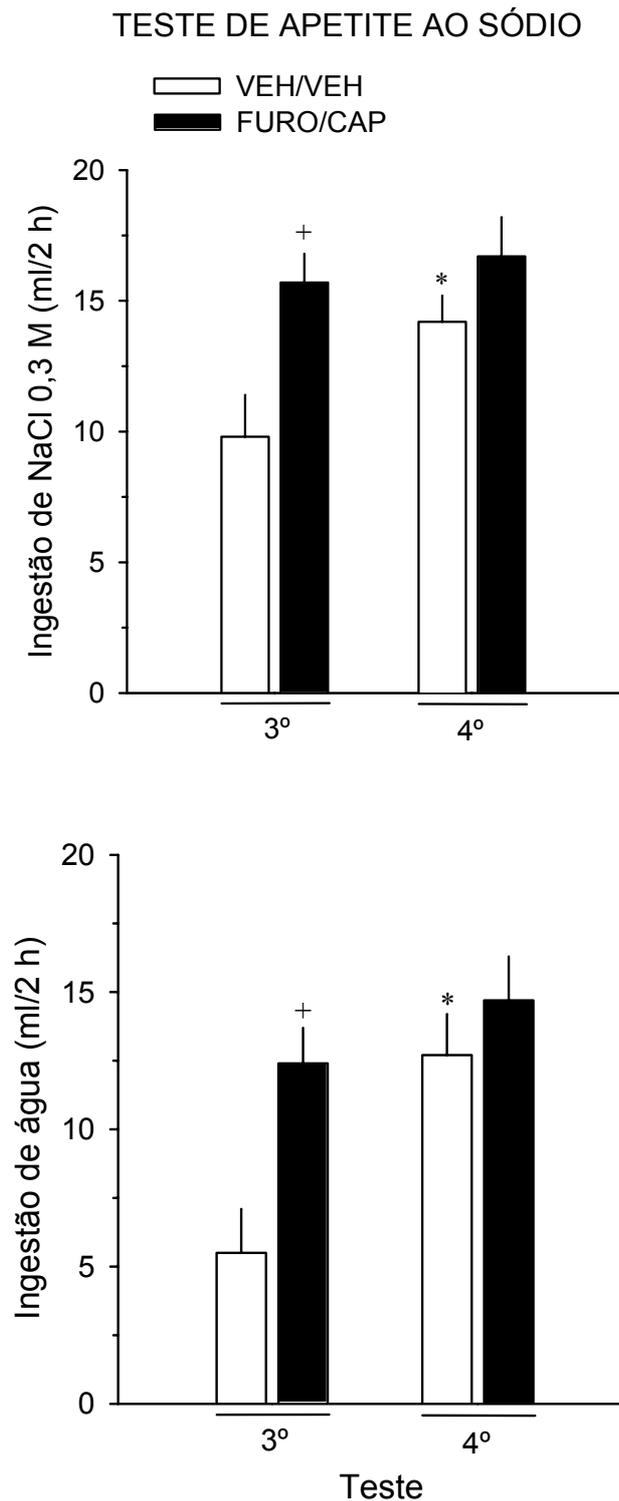


Figura 10. Ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por PHRP durante o 3º e 4º teste de apetite ao sódio em ratos do Experimento 3 submetidos a prévios VEH/VEH (barra branca) ou FURO/CAP (barra preta), sendo de sete dias o intervalo entre cada protocolo. ⁺ p 0,05 vs. VEH/VEH, ^{*} p 0,05 vs. 3º teste; n = 12 por grupo.

A ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pelo FURO/CAP foi semelhante entre o 1º (NaCl 0,3 M: $5,5 \pm 0,8$ ml e água: $12,6 \pm 0,9$ ml) e 2º teste de ingestão induzida (NaCl 0,3 M: $6,4 \pm 0,9$ ml e água: $12,7 \pm 1,1$ ml), porém estas ingestões foram maiores do que as do grupo VEH/VEH em ambos os testes (NaCl 0,3 M e água: $0,1 \pm 0,1$ ml por teste) [NaCl 0,3 M: grupo, $F(1, 11) = 85,3$; $p < 0,05$; teste, $F(1, 11) = 0,8$; grupo vs. teste, $F(1, 11) = 0,5$] [água: grupo, $F(1, 11) = 245,9$; $p < 0,05$; teste, $F(1, 11) = 0,03$; grupo vs. teste, $F(1, 11) = 0,002$].

A ingestão diária de NaCl 0,3 M aumentou no grupo FURO/CAP após o 2º teste, ou seja, da 3ª à 5ª semana (25 ± 6 ml, 28 ± 7 ml e 33 ± 10 ml, respectivamente) comparada a ingestão basal (11 ± 3 ml) [semana, $F(4, 88) = 6,7$; $p < 0,05$; grupo, $F(1, 22) = 1,3$; grupo vs. semana, $F(4, 88) = 0,8$]. O grupo VEH/VEH aumentou a ingestão diária de NaCl 0,3 M após o 3º teste, ou seja, na 4ª e 5ª semana (20 ± 3 ml e 22 ± 5 ml, respectivamente) comparada a ingestão basal (11 ± 3 ml) [$p < 0,05$]. A ingestão diária de água não se alterou com a repetição de ambos os protocolos, FURO/CAP e PHRP, e foi semelhante entre os grupos (34 ± 2 ml, média por grupo e semana) [semana, $F(4, 88) = 1,6$; grupo, $F(1, 22) = 0,04$; grupo vs. semana, $F(4, 88) = 0,3$].

2.5 Discussão

Injeção repetida de FURO/CAP incrementou a ingestão induzida e espontânea de solução de NaCl 0,3 M. Estas injeções também incrementaram a ingestão induzida de água, mas não a espontânea. O incremento induzido pela repetição do FURO/CAP foi parcialmente inibido pelo antagonista de receptor Agtr1 losartan.

Os resultados do FURO/CAP obtidos neste artigo podem ser comparados com as características e mecanismos do protocolo da furosemida elucidados por Epstein e colaboradores (1, 2, 3). As características do incremento utilizando-se o protocolo de furosemida que são pertinentes para o presente estudo incluem sensibilização após uma primeira depleção de sódio, persistência após subseqüentes depleções e seletividade para ingestão de sódio quando comparada à de água.

Embora a regra primeira depleção/primeira sensibilização foi aplicada a mais de um artigo utilizando o protocolo de furosemida (7, 10), outros artigos também mostraram que o incremento ocorre apenas após a segunda ou várias depleções de sódio (5, 14). Não temos nenhuma explicação para esta falta de consistência na latência da sensibilização, mas de acordo com nossos resultados pode-se concluir que os mecanismos do incremento não é necessariamente ativado num período crítico da maneira “tudo ou nada”, na primeira vez em que o tratamento é dado ao animal. Injeções repetidas de FURO/CAP sensibilizaram a ingestão induzida de solução de NaCl 0,3 M independentemente de alterações da atividade renal, mas ao contrário de resultados prévios com o protocolo da furosemida (1), esta sensibilização não foi exclusiva para o primeiro tratamento ou teste. No Experimento 1, o incremento ocorreu no terceiro teste e foi mantido no seguinte e último teste, particularmente aos 15 min. No Experimento 2a, o incremento aconteceu logo no segundo teste e também foi mantido no seguinte e último teste. Esta diferença na latência do incremento da ingestão induzida em diferentes experimentos também ocorreu para a ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M.

Diferentemente do protocolo de furosemida, no qual o sinergismo hormonal predomina, repetição do aumento de ANG II encefálica representa a hipótese

principal neste artigo para explicar o mecanismo do incremento da ingestão induzida e diária de sódio, induzidas pela repetição do FURO/CAP. Esta hipótese previa que o losartan inibiria o incremento induzido pelo FURO/CAP, o que foi parcialmente confirmado, e que a repetição do aumento de ANG II encefálica, induzido pela repetição do FURO/CAP, incrementaria o apetite ao sódio mediado pela ANG II, induzido pela privação hídrica.

O losartan, antagonista de receptor Agtr1, bloqueou a ingestão induzida de solução de NaCl 0,3 M e água no primeiro e segundo FURO/CAP, Experimento 2a, sem apresentar incremento ou “escape” do efeito do antagonista no segundo teste e por conseguinte, validando a ANG II como mediadora da ingestão induzida de sódio e água desencadeada pelo FURO/CAP (27). No Experimento 2d, previu-se que animais com histórico de apenas injeções de veículos (VEH/VEH + SAL) e com histórico de losartan combinado com FURO/CAP (FURO/CAP + LOS) deveriam se comportar como os ratos que receberam FURO/CAP pela primeira vez e, portanto, ingerir menos solução de NaCl 0,3 M do que ratos com histórico de salina combinada com FURO/CAP (FURO/CAP + SAL). No entanto, todos os grupos ingeriram quantidade semelhante de solução de NaCl 0,3 M quanto receberam apenas FURO/CAP no último teste de ingestão induzida (Figura 7, acima), apesar da tendência para reduzida média da ingestão de NaCl 0,3 M nos grupos com losartan. Portanto, não é possível a princípio afirmar que o losartan falhou em bloquear o mecanismo dependente de ANG II ou dependente de outro mecanismo ativado pela injeção por si. Note novamente que animais com histórico de veículo, altas doses de losartan (20 e 40 mg/kg) ou apenas FURO/CAP mostraram comportamento semelhante no teste final (Figura 7, abaixo). No entanto, o grupo que recebeu a menor dose de losartan (10 mg/kg) ingeriu menos água do que os grupos

FURO/CAP + SAL e VEH/VEH + SAL no mesmo teste (Figura 7, abaixo). Os resultados da ingestão induzida de água dos grupos com losartan até se assemelham a uma curva de dose-resposta invertida. Por conseguinte, o losartan pode ter tido um efeito parcial que desapareceu com o aumento das doses, sugerindo que parte do incremento foi devido a receptores Agtr1. Entretanto, não é possível excluir o efeito cruzado entre as injeções e os aumentos de ANG II encefálica, induzido pelo FURO/CAP, na produção do incremento em ambas as ingestões induzidas, sódio e água.

Ao contrário do que aconteceu com a ingestão induzida, o fraco efeito do terceiro tratamento, primeiro FURO/CAP no grupo VEH/VEH + SAL e terceiro FURO/CAP no grupo FURO/CAP + LOS 10 mg/kg, na ingestão diária de sódio de ambos os grupos, comparados aos animais com histórico FURO/CAP + SAL (Figura 9, acima), sugere que o mecanismo dependente de receptores Agtr1 foi responsável pelo incremento da ingestão espontânea de solução de NaCl 0,3 M. Além disso, a repetição do FURO/CAP não acarretou nenhum efeito na ingestão diária de água, sugerindo que o mecanismo da ANG II, semelhantemente ao do sinergismo ANG II/aldosterona proposto para o protocolo da furosemida, é seletivo para a ingestão diária de sódio (1-4, 5, 7, 8, 10, repare 6).

Uma análise detalhada dos resultados descritos nas Figuras 6 e 9 (acima) sugere um outro fator influenciando o incremento produzido pela repetição do FURO/CAP na ingestão espontânea de sódio em adição ao mecanismo mediado pela ANG II. Os resultados compõem-se de feitos paradoxais como o fraco, mas significativo, escape da ação inibitória do losartan (Figura 6) e o incremento da ingestão espontânea em grupos com histórico de altas doses de losartan (Figura 9). O escape do incremento foi obtido na ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M nas

semanas que seguiram o teste de ingestão induzida na presença de losartan 10 e 20 mg/kg, mas não losartan 40 mg/kg, apesar de todas as doses serem efetivas em suprimir as ingestões induzidas (Figuras 4 e 6, acima). O incremento da ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M nos grupos com histórico de altas doses de losartan (20 e 40 mg/kg) combinadas com FURO/CAP ocorreu após eles terem recebido injeção de apenas FURO/CAP (Figura 9, acima). Este resultado sugere que o losartan combinado com FURO/CAP de alguma maneira sensibilizou a ingestão de sódio. Isto necessita de futuro esclarecimento, mas de qualquer forma é consistente com a indução paradoxal do apetite ao sódio atribuído ao losartan (39) e do seu efeito facilitador de memória e processos cognitivos (40).

Em adição aos efeitos paradoxais, a dificuldade em obter uma inibição consistente do incremento com losartan pode ter sido resultada por outros dois fatores, como redução da natriurese e participação de algum tipo diferente de receptor de ANG II, ou ambos. Ao contrário de trabalhos prévios, nos quais o losartan não teve nenhum efeito na natriurese (30, 41), o losartan reduziu em 35% a natriurese induzida pela furosemida no protocolo do FURO/CAP. A diferença entre o prévio (30) e o presente trabalho é que injetamos losartan duas vezes antes do tratamento com FURO/CAP, mas a anti-natriurese não foi suficiente para explicar a completa supressão da ingestão induzida de água e sódio. Trabalhos prévios mostraram uma resposta dose-dependente entre apetite ao sódio e furosemida, no protocolo da furosemida (42). Esta resposta também tem sido associada com a relação direta entre a dose de furosemida e natriurese. Por conseguinte, se a inibição da natriurese fosse o principal fator bloqueador da ingestão induzida, então a redução do efeito natriurético deveria apenas induzir uma redução proporcional na ingestão induzida pelo FURO/CAP e não sua completa supressão. Portanto, a

dificuldade em reduzir a resposta induzida pelo FURO/CAP em ratos com histórico de losartan não pode ser atribuída apenas a natriurese reduzida; no entanto, este efeito renal pode parcialmente ter reduzido o estímulo para a produção de ANG II. Outra possibilidade para se explicar os resultados com losartan é a participação de mais de um tipo de receptor angiotensinérgico associado à transcrição gênica de proteínas responsáveis pelas alterações morfológicas de neurônios (por exemplo, 43). Embora receptores Agtr1, particularmente o tipo-1a, regule a transcrição gênica (40, 44), os resultados do losartan combinado com FURO/CAP sugerem que um receptor diferente, que também regule a transcrição, por exemplo: receptor de ANG₁₋₇, Agtr2 e/ou Agtr4, talvez combinados com receptores Agtr1, medeiam o incremento.

Outra evidência para o papel da ANG II no incremento é que repetição do FURO/CAP induziu sensibilização do apetite ao sódio. Animais com histórico de FURO/CAP ingeriram mais solução de NaCl 0,3 M no teste do apetite ao sódio do que animais com histórico de veículo, após serem submetidos ao primeiro episódio de PHRP (Figura 10, acima). Note que o grupo veículo incrementou o apetite ao sódio no segundo teste, como resultado do aumento da ANG II, o qual ocorreu na primeira PHRP. Este incremento é consistente com uma tendência para o incremento observado no teste do apetite ao sódio após a PHRP mostrado em trabalhos prévios (8, 20). A ausência da utilização de técnica invasiva no protocolo PHRP pode ter evitado que os animais associassem a ingestão de sódio à injeção intraperitoneal. Por conseguinte, a sensibilização produzida pela repetição do FURO/CAP no testes do apetite ao sódio que seguem a PHRP está de acordo com o previsto, uma vez que assumimos que a repetição do aumento de ANG II encefálica

sensibilizaria a ingestão induzida de sódio mediada pela ANG II, mas produzida por um outro método que não o FURO/CAP.

Em resumo, os resultados sugerem que procedimentos temporalmente associados com a indução do apetite ao sódio, como a técnica invasiva de injeção intraperitoneal, podem exercer algum papel no incremento da ingestão induzida de sódio e água; entretanto, experimentos futuros serão necessários para se testar esta hipótese. Além disso, os resultados também mostram que repetição do FURO/CAP induz incremento da ingestão de sódio e confirma o efeito de longo prazo da ANG II no comportamento ingestivo. O papel dos receptores de ANG II neste efeito permanece por ser esclarecido; no entanto, o presente trabalho indica alguma participação de receptores Agtr1. Como este peptídeo tem sido associado ao incremento em resposta a repetidas desidratações e também ao consumo de drogas de abuso (para revisão, 45), especula-se que o incremento pode estar participando como um mecanismo para a dependência ao sal (46). Sendo assim, o protocolo FURO/CAP é um candidato para se testar a relação da ANG II com diferentes comportamentos associados a dependência de drogas de abuso.

2.6 Agradecimentos

Os autores agradecem Ana Vítor de Oliveira pelo cuidado dos animais, Silas Pereira Barbosa e Reginaldo da Conceição Queiróz pelo suporte técnico e Silvana Aparecida Deróbio Malavolta pelo excelente auxílio de secretaria. Esta pesquisa recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Este artigo faz parte dos requisitos de Daniela de Toledo Borba Pereira (bolsista FAPESP #03/11268-2) para obtenção de seu título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo Convênio UFSCar/UNESP.

2.7 Referências

1. Sakai, R. R.; Fine, W. B.; Epstein, A. N.; Frankmann, S. P. Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. *Behav. Neurosc.* 1987, 101:724-731.
2. Epstein, A. N. Neurohormonal control of salt intake in the rat. *Brain Research Bulletin.* 1991, 27:315-320.
3. Galaverna, O.; Nicolaïdis, S.; Yao, S. Z.; Sakai, R. R.; Epstein, A. N. Endocrine consequences of prenatal sodium depletion prepare rats for high need-free NaCl intake in adulthood. *Am. J. Physiol.* 1995, 269:R578-583.
4. Falk, J. L.; Lipton, J. M. Temporal factors in the genesis of NaCl appetite by intraperitoneal dialysis. *J. Comp. Physiol. Psychol.* 1967, 63:247-251.
5. Leshem, M.; Kavushansky, A.; Devys, J. M.; Thornton, S. Enhancement revisited: the effects of multiple depletions on sodium intake in rats vary with strain, substrain, and gender. *Physiol. Behav.* 2004, 82:571-80.
6. Frankmann, S. P.; Dorsa, D. M.; Sakai, R. R.; Simpson, J. A single experience with hyperoncotic dialysis persistently alters water and sodium intake. In:

- Caro, G.; Massi, M.; Epstein, A.N., *The Physiology of Thirst and Sodium Appetite*. New York: Plenum Press; 1986:p115-121.
7. Sakai, R. R.; Frankmann, S. P.; Fine, W. B.; Epstein, A. N. Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake of the rat. *Behav. Neurosci.* 1989, 103:186-192.
 8. Pereira, D. T. B.; David, R. B.; Menani, J. V.; De Luca, L. A Jr. Episodes of water deprivation enhance daily hypertonic NaCl intake in rats. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2002, 35:465-468.
 9. Bernstein, I. L. Interaction between natural motivational systems and those which respond to drugs of abuse. *Appetite.* 2003, 41:333-334.
 10. Dietz, D. M.; Curtis, K. S.; Contreras, R. J. Taste, salience, and increased NaCl ingestion after repeated sodium depletions. *Chem. Senses.* 2006, 31:33-41.
 11. Omouessi, S. T.; Chapleur, M.; Leshem, M.; Thornton, S. N. Gender and obesity influence sodium intake and fluid regulation in Zucker rats following repeated sodium depletions. *Physiol. Behav.* 2006, 89(4):576-581.

12. Rhuf, A. A.; Starbuck, E. M.; Fitts, D. A. Effects of SFO lesions on salt appetite during multiple sodium depletions. *Physiol. Behav.* 2001, 74:629-636.
13. Clark, J. J.; Bernstein, I. L. Reciprocal cross-sensitization between amphetamine and salt appetite. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 2004, 78:691-698.
14. De Luca, L. A. Jr.; Galaverna, O.; Schulkin, J.; Yao, S. Z.; Epstein, A. N. The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. *Brain Res. Bull.* 1992, 28:73-87.
15. Galaverna, O. G.; De Luca, L. A. Jr.; Schulkin, J.; Yao, S. Z.; Epstein, A. N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res. Bull.* 1992, 28: 89-98.
16. Fluharty, S. J.; Epstein, A. N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. *Behav. Neurosc.* 1983, 97(5)746-758.

17. Epstein, A. N.; Sakai, R. R. Angiotensin-aldosterone synergy and salt intake. In: Brain peptides and catecholamines in cardiovascular regulation; eds. Buckley, J. P.; Ferrario, C. M. New York: Raven Press; 1987, p337-345.
18. Ramsay, D. J.; Thrasher, T. N.; Bie, P. Endocrine components of body fluid homeostasis. *Comp. Biochem. Physiol. A.* 1988, 90: 777-780.
19. Schneider, E. G. In water deprivation, osmolality becomes an important determinant of aldosterone secretion. *News Physiol. Sci.* 1990, 5:197-201.
20. De Luca Jr., L. A.; Xu, Z.; Schoorlemmer, G. H.; Thunhorst, R. L.; Beltz, T. G.; Menani, J. V.; Johnson, A. K. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. *Am. J. Physiol.* 2002, 282(2):R552-559.
21. Schoorlemmer, G. H.; Johnson, A. K.; Thunhorst, R. L. Circulating angiotensin II mediates sodium appetite in adrenalectomized rats. *Am. J. Physiol.* 2001, 281:R723-R729.
22. Bryant, R. W.; Epstein, A. N.; Fitzsimons, J. T.; Fluharty, S. J. Arousal of a specific and persistent sodium appetite in the rat with continuous

- intracerebroventricular infusion of angiotensin II. *J. Physiol.* 1980, 301:365-382.
23. Moellenhoff, E.; Blume, A.; Culman, J.; Chatterjee, B.; Herdegen, T.; Lebrun, C. J.; Unger, T. Effect of repetitive icv injections of ANG II on c-Fos and AT(1)-receptor expression in the rat brain. *Am. J. Physiol.* 2001, 280:R1095-R1104.
24. Fitzsimons, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol. Rev.* 1998, 78:583-686.
25. Fitzsimons, J. T.; Wirth, J. B. The renin-angiotensin system and sodium appetite. *J. Physiol.* 1978, 274:63-80.
26. Avrith, D. B.; Fitzsimons, J. T. Increased sodium appetite in the rat induced by intracranial administration of components of the renin-angiotensin system. *J. Physiol.* 1980, 301:349-364.
27. Thunhorst, R. L.; Morris, M.; Johnson, A. K. Endocrine changes associated with a rapidly developing sodium appetite in rats. *Am. J. Physiol.* 1994, 267:R1168-R1173.

28. Fitts, D. A.; Masson, D. B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. *Behav. Neurosci.* 1989, 103:865-872.
29. Thunhorst, R. L.; Beltz, T. G.; Johnson, A. K. Effects of subfornical organ lesions on acutely induced thirst and salt appetite. *Am. J. Physiol.* 1999, 277:R56-R65.
30. Thunhorst, R. L.; Johnson, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.* 1994, 266:R458-R465.
31. Sato, M. A.; Yada, M. M.; De Luca, L. A Jr. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. *Physiol. Behav.* 1996, 60:1099-1104.
32. De Luca, L. A. Jr.; Vendramini, R. C.; Pereira, D. T. B.; Colombari, D. S. A.; David, R. B.; de Paula, P. M.; Menani, J. V. Water deprivation and the double-depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007, 40:707-712.
33. Maas, A. H. R.; Kofstad, J.; Siggard-Andersen, O. Ionized calcium, sodium and potassium by ion selective electrodes. In: International Federation of clinical chemistry workshop. Proceedings of the first meeting of the European

- Working Group on ion selective electrodes. 1983. Oslo Copenhagen: Private Press, 1984.
34. Doward, W. V.; Chalmers, L. Comparison of methods for calculation serum osmolality from chemical concentrations, and prognostic value of such calculations. In: Clin. Chem. Winston-Salem; 1975:p190-194; vol. 21.
35. Wong, P. C.; Price, W. A.; Chiu, A. T.; Duncia, J. V.; Carini, D. J.; Wexler, R. R.; Johnson, A. L.; Timmermans, P.B.M.W.M. In Vivo Pharmacology of DuP 753. Am. J. Hypertens. 1991, 4(Pt 2):288S-298S.
36. Wong, P. C.; Hart, S. D.; Duncia, J. V.; Timmermans, P. B. Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. Studies with DuP 753 and EXP3174 in dogs. Eur. J. Pharmacol. 1991, 202:323-330.
37. McKinley, M. J.; Denton, D. A.; Nelson, J. F.; Weisinger, R. S. Dehydration induces sodium depletion in rats, rabbits, and sheep. Am. J. Physiol. 1983, 245(2):R287-R292.
38. Weisinger, R. S.; Denton, D. A.; McKinley, M. J.; Nelson, J. F. Dehydration-induced sodium appetite in rats. Physiol. Behav. 1985, 34(1)45-50.

39. Lienard, F.; Thornton, S. N.; Martial, F. P.; Mousseau, M. C.; Nicolaidis, S. Angiotensin II receptor subtype antagonists can both stimulate and inhibit salt appetite in rats. *Regul. Pept.* 1996, 66:87-94.
40. Wright, J. W.; Harding, J. W. The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog. Neurobiol.* 2004, 72:263-293.
41. Dobrowolski, L.; Badzyńska, B.; Grzelec-Mojzesowicz, M.; Sadowski, J. Renal vascular effects of frusemide in the rat: influence of salt loading and the role of angiotensin II. *Exp. Physiol.* 2001, 86:611-616.
42. Jalowiec, J.E. Sodium appetite elicited by furosemide: effects of differential dietary maintenance. *Behav. Biol.* 1974, 10:313-327.
43. Roitman, M.F.; Na, E.; Anderson, G.; Jones, T.A.; Bernstein, I.L. Induction of a salt appetite alters dendritic morphology in nucleus accumbens and sensitizes rats to amphetamine. *J. Neurosci.* 2002, 22:RC225.

44. Lebrun, C. J.; Blume, A.; Herdegen, T.; Seifert, K.; Bravo, R.; Unger, T. Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of Fos, Jun and Krox proteins. *Neuroscience*. 1995, 65:93-99.
45. Sommer, W. H.; Rimondini, R.; Marquitz, M.; Lidström, J.; Siems, W. E.; Bader, M.; Heilig, M. Plasticity and impact of the central renin-angiotensin system during development of ethanol dependence. *J. Mol Med*. 2007, 85:1089-1097.
46. Tekol, Y. Salt addiction: A different kind of drug addiction. *Med. Hypotheses*. 2006, 67:1233-1234.

3 Artigo #2 – Correlação entre incremento da ingestão de sódio e alteração de transcritos do sistema renina-angiotensina hipotalâmico em ratos

Daniela de T. B. Pereira^{1,2}, Juliana Constancio¹, Regina Célia Vendramini³, José V. Menani¹, Silvana Chiavegatto^{2,4}, Laurival A. De Luca Jr. ^{1*}

¹Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Araraquara, SP, Brasil.

²Instituto do Coração (InCor), Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

³Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, Brasil.

⁴Departamento de Farmacologia, Instituto de Biociências (ICB), Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil.

*autor correspondente: L.A. De Luca Jr., Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, UNESP. Rua Humaitá, 1680, 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brasil. Telefone: +55 16 3301-6484, fax: +55 16 3301-6488, email: lucajr@foar.unesp.br

3.1 Agradecimentos

Os autores agradecem Silvana A. D. Malavolta pelo suporte de secretaria, Thais L. Borella, Richard B. David, Silas P. Barbosa, Silvia Fógliã, Reginaldo C. Queiróz, Guilherme Ambar, Marcela Bermúdez-Echeverry, Angelo M. Lana, Mariliza Velho e Gregory A. Derderian pelo suporte técnico, e Ana Vítor de Oliveira pelo cuidado dos animais. Esta pesquisa recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Este artigo faz parte dos requisitos de Daniela de Toledo Borba Pereira (bolsista FAPESP #03/11268-2) para obtenção de seu título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo Convênio UFSCar/UNESP.

3.2 Resumo

A ingestão de sódio pode ocorrer de duas maneiras: espontânea ou induzida. Tratamentos que induzem depleção de sódio incrementam ambas as formas de ingestão de sódio. O objetivo do presente trabalho foi relacionar o incremento da ingestão de sódio induzido por privação hídrica com alterações do sistema renina-angiotensina (SRA) hipotalâmico e parâmetros sistêmicos. Repetidos episódios de privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP) incrementaram a ingestão espontânea e induzida de solução de NaCl 0,3 M, mas não alteraram a ingestão de água nem os parâmetros sanguíneos e urinários investigados. Animais sob hidratação submetidos a um prévio episódio de PHRP aumentaram em 76% a quantidade de RNAm hipotalâmico que codifica receptor de angiotensina (ANG) II tipo-1a (Agtr1a). No entanto, nestes mesmos animais não se observou alterações na expressão gênica hipotalâmica de angiotensinogênio (Agt), renina (Ren), enzima conversora de ANG isoforma-1 (Eca1), enzima conversora de ANG isoforma-2 (Eca2), aminopeptidase N (Anpep), proteína associada ao Agtr1 (Agtrap), receptor de ANG semelhante ao tipo-1 (Agtr1 ou receptor de apelina, APJ) e apelina (Apln). Animais sob hidratação submetidos a três prévios episódios de PHRP não alteraram a expressão gênica hipotalâmica de Agtr1a, Agt, Ren, Eca1, Eca2, Agtrap, APJ e Apln. Portanto, o incremento da ingestão espontânea de sódio induzido por repetidos episódios de PHRP não está relacionado a alterações gênicas do SRA hipotalâmico. Animais sob rehidratação submetidos a três prévios episódios de PHRP aumentaram em 43%, 60%, 36% e 159% o RNAm hipotalâmico que codifica Agt, Anpep, Agtrap e APJ, respectivamente. No entanto, a expressão gênica hipotalâmica de Ren, Eca1, Eca2, Agtr1a e Apln não foi alterada nestes mesmos animais. Portanto, o incremento da

ingestão induzida de sódio está relacionado com alterações gênicas do SRA hipotalâmico. Contudo, repetidos episódios de PHRP sensibiliza tanto a ingestão espontânea de sódio quanto o apetite ao sódio. Ambas as formas de incremento da ingestão de sódio não estão associadas com alterações de parâmetros sistêmicos que facilitam a natriorexigênese, e o incremento da ingestão espontânea de sódio não está associado a alterações do RNAm hipotalâmico para o SRA. Além disso, o incremento da ingestão induzida de sódio está associado com aumento dos níveis de RNAm hipotalâmico que codificam Agt, Anpep, Agtrap e APJ. Portanto, sugere-se que ambos os peptídeos hipotalâmicos, ANG II e apelina, podem estar modulando o incremento do apetite ao sódio.

Palavras-chave: ingestão de sódio, sensibilização, hipotálamo, desidratação, APJ, Agtrap

3.3 Introdução

A ingestão de sódio pode ocorrer de duas maneiras: espontânea ou induzida. A ingestão espontânea refere-se ao consumo de sal de um animal hidratado em excesso à necessidade diária de sódio, e a ingestão induzida, também chamada de apetite ao sódio, refere-se ao consumo de sal desencadeado pela diminuição de volume do compartimento extracelular (Denton, 1984; Schulkin, 1991; Epstein, 1991).

Tratamentos que induzem depleção de sódio ou aumento episódico de hormônios natriorexigênicos, angiotensina (ANG) II e aldosterona, por exemplo, incrementam ambas as formas de ingestão de sódio, o que provavelmente corresponde a uma adaptação à perda de sódio. (Falk, 1966; Frankmann et al., 1986; Sakai et al., 1987, 1989; Pereira et al., 2002, 2005a, 2005b; De Luca Jr. et al., 2007). No entanto, a ingestão de solução hipertônica de NaCl não pode ser induzida por apenas uma única injeção intracerebroventricular (icv) de ANG II exógena (Fitzsimons, 1998). Porém, repetidos aumentos episódicos, através de repetidas injeções icv, ou contínua infusão icv de ANG II exógena induzem ingestão de NaCl hipertônico (Bryant et al., 1980; Moellenhoff et al., 2001).

Trabalhos prévios utilizando-se furosemida associada à dieta pobre em sódio (protocolo da furosemida) e diálise hiperoncótica demonstraram que o incremento da ingestão espontânea e induzida de sódio não está relacionado com alterações sistêmicas permanentes (Frankmann et al., 1986; Sakai et al., 1987, 1989). No entanto, o incremento do apetite ao sódio induzido pela repetição do protocolo da furosemida está relacionado com: 1) sinergismo entre angiotensina (ANG) II e aldosterona (Sakai et al., 1987), 2) reorganização sináptica e aumento da atividade celular no núcleo accumbens, região encefálica relacionada com motivação

e recompensa (Roitman et al., 2002; Na et al., 2007) e 3) aumento da atividade celular no órgão subfornical e núcleo basolateral da amígdala, regiões encefálicas relacionadas com o controle do apetite ao sódio (Na et al., 2007). Por conseguinte, as alterações de longo prazo que ocorrem no incremento da ingestão de sódio provavelmente se devem à plasticidade neural, habilidade do sistema nervoso central em alterar conexão e/ou força sináptica baseada em prévios desafios. No entanto, não se sabe quais alterações estão associadas ao incremento da ingestão de sódio induzido por múltiplos episódios de privação hídrica (Pereira et al., 2002).

O hipotálamo é uma região encefálica responsável por regular pressão arterial, frequência cardíaca e atividade do nervo simpático (Yardley et al., 1986; Kramer et al., 2000). Esta região também é responsável pela integração de vários comportamentos motivados, tais como defesa, estresse, fome, sede e ingestões específicas, como por exemplo: apetite ao sódio, cálcio e fósforo (Covian e Antunes-Rodrigues, 1963; Saad et al., 1972, 1981; Grossman, 1990; Denton et al., 1996; Schulkin, 1996; Tsigos e Chrousos, 2002). Além disso, o hipotálamo está localizado na base inferior do encéfalo, numa posição estratégica de fácil acesso para dissecação e tem sido empregado em técnicas de biologia molecular no estudo de comportamentos motivados, como agressividade (Chiavegatto et al., 2001) e ingestão de alimento (Bertelli et al., 2006; Moraes et al., 2006), e isolamento social (Bibancos et al., 2007).

O hipotálamo também está envolvido no controle da ingestão espontânea e induzida de sódio e água. Nas décadas de 50 e 60 do século XX, vários estudos de lesão eletrolítica no hipotálamo lateral ou dorsomedial mostraram adipsia em ratos (Anand e Brobeck, 1951; Montemurro e Stevenson, 1957; Smith e McCann, 1962; Epstein e Teitelbaum, 1964). Lesão no hipotálamo lateral afeta a

ingestão de água induzida por privação hídrica e angiotensina (ANG) II injetada centralmente (Epstein e Teitelbaum, 1964; Black et al., 1974). Lesão no hipotálamo ventromedial abole a ingestão espontânea de sódio e lesão no hipotálamo dorsomedial afeta o apetite ao sódio induzido por adrenalectomia, tratamento com mineralocorticóide e diálise intraperitoneal (Wolf, 1964; Nováková e Cort, 1966; Wolf e Quartermain, 1967). Estudos prévios de estimulação elétrica no hipotálamo lateral e dorsomedial demonstraram polidipsia em ratos (Greer, 1955; Mogenson e Stevenson, 1967; Mogenson et al., 1971; Miller, 1960) e bodes (Anderson, 1955; Anderson e McCann, 1955), bem como aumento da ingestão de sódio hipertônico em ratos (Miller, 1960; Wise, 1968, 1969; Cox e Valenstein, 1969; Mogenson, 1971), bodes (Anderson, 1955) e ovelhas (McKenzie e Denton, 1974).

O equilíbrio hidro-eletrolítico está sob controle do sistema hipotálamo-neurohipofisário (Antunes-Rodrigues et al., 2004), e neurônios magnocelulares do hipotálamo sofrem alteração transcriptômica, proteômica e morfológica durante a desidratação (Perlmutter et al., 1985; Miyata et al., 1994; Theodosis et al., 1998; Miyata e Hatton, 2002; Sharman et al., 2004; Hindmarch et al., 2006; Gouraud et al., 2007). No entanto, não se sabe se o hipotálamo está envolvido no incremento da ingestão de sódio, uma vez que esta região encefálica é passível de plasticidade neural induzida por desidratação. A desidratação diminui o volume dos líquidos corporais de ambos os compartimentos, intracelular e extracelular; e pode ser induzida, tanto na natureza quanto no laboratório, pela privação hídrica.

A restrição hídrica pode causar danos à saúde (Kleiner, 1999; Verbalis, 2003) e é a forma mais comum e natural de se produzir desidratação resultante de diminuição do volume extracelular. O protocolo privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP) foi desenvolvido em nosso laboratório por Sato et al (1996) e tem como

objetivo dissociar a sede do apetite ao sódio ativado pela privação hídrica, permitindo que os animais tenham acesso primeiro à água (teste de sede), durante o período de reidratação parcial (RP), e depois ao sódio (teste de apetite ao sódio) (De Luca Jr. et al., 2002, 2007). A sede restabelece parcialmente o volume extracelular e o apetite ao sódio permite o restabelecimento completo de volume (De Luca Jr. et al., 2002, 2007). Episódios de privação hídrica são comuns em animais e humanos e induzem apetite ao sódio nestas espécies (Denton, 1984; Weisinger et al., 1985; Takamata et al., 1994; Sato et al., 1996; De Luca Jr. et al., 2002; Leshem et al., 2008). No rato, o sistema renina-angiotensina (SRA) medeia o apetite ao sódio induzido por privação hídrica, o qual é abolido por injeção intraperitoneal de captopril, inibidor da enzima conversora de ANG (Eca), e por injeção intracerebroventricular de losartan ou PD123319, antagonistas de receptores de ANG II tipo-1 (Agtr1) e tipo-2 (Agtr2), respectivamente (Sato et al., 1996).

O SRA, bem como sua localização, sinais intracelulares, papéis fisiológicos e implicações patofisiológicas, tem sido extensivamente estudado e revisto por décadas (Ganong, 1984; Lind et al., 1985; Deschepper et al., 1986; Moffett et al., 1987; Phillips, 1987; Mendelsohn et al., 1990; Bunnemann et al., 1992; Phillips et al., 1993; Wright e Harding, 1994, 1997; Lippoldt et al., 1995; Lenkei et al., 1997; Fitzsimons, 1998; Allen et al., 2000; Belova, 2000; De Gasparo et al., 2000; Salzet et al., 2001; McKinley et al., 2001, 2003; Campbell, 2003; Burrell et al., 2004; von Bohlen und Halbach, 2005; von Bohlen und Halbach and Albrecht, 2006; Lazartigues et al., 2007; Luft, 2007; Wright et al., 2008). Em 1971, Ganten et al. foi o primeiro a demonstrar a presença de renina no encéfalo. O pré-pró-precursor da ANG II, angiotensinogênio, é uma α -2-globulina presente em neurônios, células da glia, líquido e líquido extracelular (Reid e Ramsay, 1975; Hilgenfeld, 1984; Stornetta

et al., 1988; Intebi et al., 1990). Em neurônios, o angiotensinogênio é clivado pela renina, resultando o decapeptídeo ANG I. A ANG I resultante pode ter dois resíduos terminais removidos pela Eca isoforma-1 (Eca1) tornando-se o octapeptídeo ANG II, ou pode ser degradada à ANG1-9 pela Eca isoforma-2 (Eca2) e/ou ANG1-7 pela endopeptidase neutra, as quais podem ser posteriormente degradadas à ANG1-5 pela Eca1. A ANG II formada pode exercer suas funções ligando-se pelo menos a dois tipos diferentes de receptores, Agtr1 e Agtr2, ou pode ser metabolizada no heptapeptídeo ANG II pela aminopeptidase A ou no hexapeptídeo ANG IV pela aminopeptidase N ou ANG1-7 pela Eca1, as quais novamente podem ser degradadas posteriormente à ANG1-5 pela Eca1. Em ratos, a maior concentração de sítios ligantes para a ANG II está localizada no hipotálamo e tálamo, e seus receptores possuem ampla distribuição pelo encéfalo (Bennett e Snyder, 1980; Allen et al., 2000; Lenkei et al., 1997; Fitzsimons, 1998; Gasparo et al., 2000). Com relação à plasticidade neural e aos efeitos de longo prazo induzidos por hormônios, sabe-se que a ANG II induz sinaptogênese, ativa fatores de transcrição no encéfalo e exibe um papel organizacional nos mecanismos centrais que controlam o apetite ao sódio (Epstein, 1991; Lebrun et al., 1995; Wright et al., 2002a, 2002b, 2004). No entanto, não se sabe se o SRA hipotalâmico está envolvido no incremento da ingestão de sódio, uma vez que o hipotálamo apresenta RNAm que codifica receptor Agtr1a, sítios ligantes para ANG II e terminais imunorreativos para ANG II (Lenkei et al., 1997; Fitzsimons, 1998; Gasparo et al., 2000).

Assim, o objetivo do presente trabalho foi investigar se o incremento da ingestão de sódio induzido por múltiplos episódios de PHRP está relacionado com alterações da expressão gênica do SRA hipotalâmico.

3.4 Procedimentos Experimentais

3.4.1 Animais

Foram utilizados setenta e sete ratos (280 – 320 g) da linhagem Holtzman criados no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, São Paulo, e com três meses de idade no início dos experimentos. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável em ambiente controlado: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ umidade e ciclo claro-escuro de 12:12 h, com o início da fase clara às 7 h da manhã. Água e solução de NaCl 0,3 M ficaram disponíveis “ad libitum” em dois bebedouros de polipropileno colocados na parte da frente da gaiola, a não ser quando indicado o contrário. Os bebedouros com capacidade para 100 ml eram graduados a cada 1 ml e tampados com rolhas de borracha providas de bico de aço inoxidável. Ração granulada contendo 0,5 – 1,0% de sódio (Guabi, Paulínia, SP, Brazil) ficou disponível à vontade para consumo, a não ser quando indicado o contrário, em um recipiente localizado na lateral de cada gaiola. Todos os experimentos foram iniciados, no mínimo, três dias após os animais terem sido adaptados às condições laboratoriais (período de adaptação). Todos os testes experimentais e procedimentos de coleta foram iniciados entre 8 e 10 h da manhã. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (FOAr, UNESP) e seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.4.2 Solução

Solução hipertônica de cloreto de sódio (NaCl 0,3 M) foi feita a partir do respectivo sal (Labsynth, Diadema, SP, Brazil) dissolvido em água filtrada.

3.4.3 Protocolo PHRP e teste de apetite ao sódio

Os animais foram privados de água e NaCl 0,3 M, com livre acesso à ração, por 36 h (privação hídrica, PH). Logo após, a ração foi removida do recipiente lateral das gaiolas e uma bureta de vidro (provida de bico de aço inoxidável e graduada a cada 0,1 ml) contendo água foi oferecida aos animais por 120 min (RP), ao final das 2 h foi realizada a medida a ingestão de água (teste de sede). A ingestão de água durante o RP resulta em recuperação parcial do volume extracelular diante de uma elevada atividade de renina plasmática (ARP) persistente (De Luca Jr. et al., 2002).

Após o RP, uma segunda bureta de vidro (provida de bico de aço inoxidável e graduada a cada 0,1 ml) contendo solução de NaCl 0,3 M foi oferecida. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram mensuradas aos 15, 30, 60 e 120 min (teste de apetite ao sódio).

3.4.4 Parâmetros sanguíneos

Amostras de sangue troncular foram coletadas imediatamente após a decapitação de animais hidratados (Experimento 1, ingestão espontânea), e de animais privados de água por 36 h e reidratados parcialmente por 2 h no RP (Experimento 2, ingestão induzida). As amostras foram coletadas em tubos contendo gel separador (SST, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e centrifugadas a 2500 rpm por 10 min à temperatura ambiente para obtenção de soro. A concentração sérica de sódio e potássio foi determinada através de eletrodo íon-específico (ISE AVL 9180, Medical Instruments) por potenciometria (Maas et al., 1983). Proteína total sérica foi determinada em refratômetro (Atago), e a osmolalidade sérica em

osmômetro (Digimatic 3D2, Advanced Instruments) por diminuição do ponto de congelamento (Doward e Chalmers, 1975).

3.4.5 Parâmetros urinários

Amostras de urina dos animais do Experimento 1 foram coletadas em tubos de polipropileno graduados a cada 0,1 ml, no qual o volume urinário (UV) foi mensurado. Osmolalidade (UOsmol) e concentração de sódio e potássio urinária foram determinadas como descrito no item 3.4.4. A quantidade total de sódio (UNaV) e potássio (UKV) excretados na urina foram inferidas pelo produto do UV pela concentração de cada íon na urina.

3.4.6 Dissecção do hipotálamo

Os grupos de animais para análise da expressão gênica hipotalâmica (Experimentos 1a e 2) foram decapitados em ordem alternada, ou seja, primeiro os grupos experimentais, a seguir o grupo controle e novamente os grupos experimentais e assim sucessivamente. O cérebro foi imediatamente removido do crânio e o hipotálamo dissecado numa placa de Petri contendo gelo seco (Nitro Paulista Comercial Ltda, Ribeirão Preto, SP, Brasil). A amostra de hipotálamo foi rapidamente imersa em solução de preservação de RNA (RNAlater™, QIAGEN, Valencia, CA, USA) e pesada (peso do tubo contendo RNAlater™ mais hipotálamo dissecado menos o peso do tubo contendo apenas RNAlater™). As amostras permaneceram à 4°C (Context 28, Cònsul) por um dia e então, foram congeladas e estocadas à -80°C (ThermoForma model 725, ULT Freezer) até o momento de uso.

3.4.7 Histologia

Dezesseis cérebros, dos quais o hipotálamo foi removido, e um intacto foram fixados em paraformaldeído (PFA) 4% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) tamponado em solução fosfato salina (PBS) 0,1 M, pH 7,4 (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) por 4 dias e então, armazenados à 4°C em sacarose 30% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) tamponada em PBS 0,1 M. Secções coronais (50 µm de espessura) das áreas em que o hipotálamo foi dissecado e das mesmas áreas do cérebro intacto foram feitas utilizando-se um micrótomo de congelamento (Leica SM 2000R). Os cortes foram imersos por 1 h em solução aquosa com peróxido de hidrogênio 10% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e metanol 10% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil); e a seguir, lavados em PBS 0,1 M. Logo após, os cortes foram montados em lâmina gelatinizada, secos por 3 – 4 dias à temperatura ambiente, corados com Giemsa, desidratados com álcool etílico (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), clareados com xilol (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e cobertos por lamínulas fixadas com Permount (SP15-500, Fisher Scientific, Hampton, NH, USA). As secções coronais de interesse foram localizadas no aumento de 4 X de um microscópio (BX 50, Olympus) e as fotomicrografias foram capturadas por uma câmera (DP10, Olympus) conectada a um computador, utilizando-se o software Image Pro-Plus 4.1.0.0 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA); nas quais examinou-se a extensão do hipotálamo dissecado, de acordo com Paxinos and Watson (2005).

3.4.8 Análise da expressão gênica hipotalâmica: transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase (PCR) quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

As amostras de tecido hipotalâmico dissecado foram removidas da solução de preservação de RNA (RNAlater™) e imediatamente imersas em TRIzol® Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gelado e homogeneizadas (PowerGen 125 and Generator 5mm x 95 mm, Fischer Scientific, Hampton, NH, USA) por 30 s na velocidade máxima. RNA total foi isolado de acordo com as instruções do fabricante. A seguir, o RNA foi quantificado por espectrofotometria (NANODROP® ND-1000 Spectrophotometer, Nanodrop Technologies, USA) e sua pureza verificada pela razão de densidade óptica (OD) 260:280, sendo que apenas RNA total com OD \geq 1,85 foi utilizado. A integridade do RNA total foi verificada em gel de agarose 1% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) corado com brometo de etídio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), e a intensidade de fluorescência da razão 28S:18S do RNAr foi visualmente determinada (Eagle Eye, Stratagene, La Jolla, CA, USA). O RNA total (4 μ g) foi tratado com 4U da enzima DNase (1U/ μ l) (RQ1 RNase-Free DNase, Promega, Madison, WI, USA), 0,5 μ l de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e 2 μ l de tampão 10x por 30 min à 37°C, posteriormente adicionou-se 2 μ l de DNase Stop Solution (Promega, Madison, WI, USA) e a reação foi incubada por mais 15 min. Logo a seguir, as amostras foram purificadas com fenol saturado-tampão com Tris-HCl (UltraPure™ buffer-saturated phenol with Tris-HCl, pH 7,49–7,79 à 25°C, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e clorofórmio (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), de acordo com as instruções do fabricante. Como descrito acima, o RNA total tratado com DNase foi novamente quantificado e verificou-se pureza e integridade do mesmo; novamente, apenas amostras com OD \geq 1,85 foram utilizadas. O RNA total tratado com DNase (2 μ g) foi transcrito reversamente utilizando-se uma solução contendo 4 μ l de tampão 5x (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 mM de DTT 0,1 M (Invitrogen, Carlsbad, CA,

USA), 0,5 µg de Oligo(dT)20Primer (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 2 mM de dNTP mix 10 mM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,5 µl de RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 0,5 µl de água destilada livre de DNase-RNase (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e 200 U de enzima SuperScript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA); totalizando 20 µl de volume final. A seguir, as amostras de RNA transcritas reversamente (DNAc) foram congeladas e estocadas à -20°C (Bosch 260, Campinas, São Paulo, Brazil) até o momento de uso. Primers específicos para angiotensinogênio (Agt), renina (Ren), Eca1, Eca2, aminopeptidase N (Anpep), Agtr1a, Agtr1b, Agtr2, proteína associada ao Agtr1 (Agtrap), receptor de ANG semelhante ao tipo-1 (Agtr1) e apelina (Apln), e dois genes controles, β-actina (Actb) e gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (Gapdh), foram desenhados utilizando-se o software Primer3 v. 0.4.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/>), conforme Bibancos et al. (2007) (Tabela 1). As seqüências desenhadas para os primers sense e anti-sense foram posicionadas em exons diferentes, analisadas com o software NetPrimer, e suas especificidades foram avaliadas no BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), software de busca assistida à procura de seqüências de nucleotídeos para *Rattus norvegicus*. Os primers foram sintetizados pela IDT® Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA). O tamanho da seqüência amplificada e a ausência de produtos extra de amplificação foram testados por PCR e visualizados em gel de agarose 3% (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). A expressão do RNAm foi quantificada por qRT-PCR no equipamento Rotor-Gene™ Real-Time Rotatory Analyzer (Corbett Life Science, Sydney, Australia) utilizando-se a metodologia do SYBR® Green (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A concentração ótima de DNAc e primers, e a eficiência de amplificação foram obtidas através de uma curva de diluição com cinco

pontos (50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 ng/ μ l) para cada gene. Como resultado, o qRT-PCR continha 12,5 ng DNAc, 200 nM de cada primer (sequências sense e anti-sense), 8,36 μ l de água destilada livre de DNase-RNase (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), e 10 μ l de SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA); totalizando 20 μ l de volume final. Amostras de DNAc dos grupos do Experimento 1 (ingestão espontânea) ou Experimento 2 (ingestão induzida) foram processadas na mesma corrida e em triplicata para cada gene. Amostras sem DNAc (NTC) ou primers (NAC) foram incluídas como controles negativo em cada corrida. Os parâmetros utilizados no qRT-PCR foram 95°C por 10 min, seguido por 50 ciclos de 15 s à 95°C e 60 s à 60°C. A curva de dissociação foi feita após cada corrida, com os seguintes parâmetros: 95°C por 15 s, estabilização à 60°C seguida de elevação gradual da temperatura de 0,5°C a cada 15 s. Os resultados do qRT-PCR foram analisados utilizando-se os softwares Rotor-Gene[™] version 6.0 (Corbett Life Science, Sydney, Australia) e Microsoft Office Excel. A expressão de cada gene hipotalâmico foi calculada de acordo com Vandesompele et al. (2002).

Tabela 1 – Seqüência sense e anti-sense dos primers utilizados na análise da expressão gênica hipotalâmica por transcrição reversa seguida de qRT-PCR.

Gene	Seqüência de Primers	
	Sense	Anti-sense
Agt	5'-TCTACCCTTTTGGGTGCTG-3'	5'-CAAGGAGGATGCTGTTGAGA-3'
Ren	5'-GTGTGAGGAGGGCTGTATGG-3'	5'-CAGTGGGTGGTGGGATGT-3'
Ace1	5'-CAGGAACGTGGAACCTTGA-3'	5'-CTTTGACGGAAGCATCACC-3'
Ace2	5'-CGCTGTCACCAGACAAGAA-3'	5'-GCCATTATTTTCGTCCAATCC-3'
Anpep	5'-CTCCACCATCGTCAGCATC-3'	5'-CTCCGCAATCTTCAAAC-3'
Agtr1a	5'-CAACTGCCTGAACCCTCTGT-3'	5'-AAAGCGTGCTCATTTTCGTAG-3'
Agtr1b	5'-ACTCTTTCCTACCGCCCTTC-3'	5'-TTAGCCCAAATGGTCCTCTG-3'
Agtr2	5'-CCCTAAAAGGTGTCCAGCA-3'	5'-GCACATCACAGGTCCAAAGA-3'
Agtr1	5'-GGAGCAGCCGAGAAAAGAG-3'	5'-GGCAAAGTCACCACAAAGG-3'
Agtrap	5'-CATTGGCATGTTTCTTGGTG-3'	5'-ACGGCAACGCTTGAGTAGA-3'
Apln	5'-GCTCTGGCTCTCCTTGAGTG-3'	5'-GTAGCGCATGTTGCCTTCTT-3'
Actb	5'-CGTTGACATCCGTAAAGACC-3'	5'-GCCACCAATCCACACAGA-3'
Gapdh	5'-ATGGTGAAGGTCGGTGTG-3'	5'-GAACTTGCCGTGGGTAGAC-3'

3.4.9 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Após a verificação de que todos os resultados são paramétricos, análise de variância (ANOVA) ou teste “t” de Student foi aplicado nos resultados. ANOVA de um fator com medidas repetidas ou não-repetidas e ANOVA de dois fatores com medidas repetidas foram aplicadas nos resultados para comparar peso do hipotálamo, ingestão diária e induzida de água e sódio, parâmetros sanguíneos e expressão gênica entre grupos ou entre privações. A significância das interações foi testada,

posteriormente a ANOVA, com o emprego do teste Student Newman Keuls. Teste “t” de Student foi utilizado para comparar peso do hipotálamo, ingestão induzida de água e sódio, parâmetros sanguíneos e urinários e expressão gênica entre grupos ou entre privações. O nível de significância foi fixado em $P < 0,05$ para ambos os testes.

3.4.10 Experimento 1. Identificação de alterações na expressão gênica hipotalâmica induzidas por múltiplos episódios de PHRP em animais sob hidratação.

Múltiplos episódios de PHRP incrementam a ingestão espontânea de solução de NaCl 0,3 M (Pereira et al., 2002). Como o apetite ao sódio é mediado pela ANG II encefálica (Sato et al., 1996) e este peptídeo é capaz de ativar fatores de transcrição no encéfalo (Lebrun et al., 1995, 1996) e, portanto, passível de induzir alterações de longo prazo; a hipótese levantada foi de que episódio único ou repetidos de PHRP alteram a expressão gênica hipotalâmica, modulando o incremento da ingestão espontânea de NaCl 0,3 M. Sendo assim, os objetivos deste experimento foram avaliar a ingestão de sódio em animais submetidos a múltiplos episódios de PHRP (Experimento 1a) e relacionar alterações sistêmicas, como parâmetros sanguíneos (Experimento 1a) e excreção urinária (Experimento 1b), e/ou alterações na expressão gênica hipotalâmica (Experimento 1a) ao incremento da ingestão diária de NaCl 0,3 M induzido pela repetição do protocolo PHRP.

3.4.10.1 Experimento 1a. Análise da ingestão de sódio, parâmetros sanguíneos e expressão gênica hipotalâmica em animais hidratados (-H) submetidos a prévios episódios de PHRP.

Três grupos de animais (n = 6-12 por grupo) foram utilizados: ratos submetidos a um (1PHRP-H) ou três episódios de PHRP (3PHRP-H) ou não privados (CONT-H). Após o período de adaptação, a medida diária da ingestão espontânea de NaCl 0,3 M e água foi realizada por 31 dias. A medida diária durante os primeiros sete dias foi considerada ingestão basal. Após a medida da ingestão basal de NaCl 0,3 M e água, o grupo 3PHRP-H foi privado de água pela primeira vez no 7º dia e as subseqüentes privações hídricas foram realizadas a cada sete dias. O grupo 1PHRP-H foi privado de água apenas uma vez no 25º dia, simultaneamente à 3ª privação hídrica do grupo 3PHRP-H. Após cada PHRP realizou-se o teste de apetite ao sódio, como descrito anteriormente no item 3.4.3. Para evitar uma possível associação temporal entre as privações hídricas a cada sete dias pelos animais, os mesmos foram sacrificados após quatro dias da 3ª (3PHRP-H) ou 1ª PHRP (1PHRP-H) para determinação dos parâmetros sanguíneos e análise da expressão gênica hipotalâmica, uma vez que ambos os procedimentos requerem sacrifício por decapitação.

3.4.10.2 Experimento 1b. Análise de parâmetros urinários e ingestão de alimento antes, durante e depois de um episódio de PHRP.

Com o intuito de se avaliar os parâmetros urinários entre animais submetidos a um (1PHRP, n = 6) ou três episódios de PHRP (3PHRP, n = 10), os mesmos foram mantidos em gaiolas metabólicas durante todo o experimento, mesmo protocolo descrito no Experimento 1a, e devido ao fato de estarem ambientados em gaiolas metabólicas, outros dois grupos de animais, diferentes dos do Experimento 1a foram

utilizados. Ambos os grupos foram ambientados em gaiolas metabólicas durante toda a sessão experimental. Amostra de urina foi coletada e a ingestão de ração mensurada em 5 momentos diferentes: no 4^o dia da 3^a e 4^a semana (urina de 24 h), após a 1^a (1PHRP) ou 3^a (3PHRP) privação hídrica (urina de 36 h), e ao término do RP (teste de sede) e respectivo teste de apetite ao sódio (urina de 2h para ambos os testes).

3.4.11 Experimento 2. Identificação de alterações na expressão gênica hipotalâmica induzidas por múltiplos episódios de PHRP em animais após rehidratação (-R).

A hipótese levantada foi de que episódio único ou repetidos de PHRP alteram a expressão gênica hipotalâmica, modulando o incremento do apetite ao sódio, observado no Experimento 1a. Sendo assim, o objetivo deste experimento foi relacionar alterações sistêmicas e/ou alterações na expressão gênica hipotalâmica ao incremento do apetite ao sódio induzido pela repetição do protocolo PHRP.

Dois grupos de animais foram utilizados: ratos submetidos a um (1PHRP-R, n = 11) ou três episódios de PHRP (3PHRP-R, n = 11). Após o período de adaptação, a medida diária da ingestão espontânea de NaCl 0,3 M e água foi realizada por 25 dias. A medida diária durante os primeiros sete dias foi considerada ingestão basal. Após a medida da ingestão basal de NaCl 0,3 M e água, o grupo 3PHRP-R foi privado de água pela primeira vez no 7^o dia e as subseqüentes privações hídricas foram realizadas a cada sete dias. O grupo 1PHRP-R foi privado de água apenas uma vez no 25^o dia, simultaneamente à 3^a privação hídrica do grupo 3PHRP-R. O teste de apetite ao sódio foi realizado após a 1^a e 2^a PHRP no grupo 3PHRP-R,

como descrito no item 3.4.3. Imediatamente após o 3º (3PHRP-R) ou 1º RP (1PHRP-R), ambos os grupos foram sacrificados para determinação dos parâmetros sanguíneos e análise da expressão gênica hipotalâmica, uma vez que ambos os procedimentos requerem sacrifício por decapitação.

3.5 Resultados

3.5.1 Análise histológica

A dissecação do hipotálamo abrangeu as secções ântero-posteriores de número 49 a 82 de Paxinos e Watson (2005) (Figs. 1-3). O peso do tecido dissecado foi semelhante entre grupos tanto no Experimento 1a (CONT-H: $8,0 \pm 0,5$ mg, 1PHRP-H: $7,8 \pm 0,7$ mg e 3PHRP-H: $6,8 \pm 0,5$ mg) quanto no Experimento 2 (1PHRP-R: $6,5 \pm 0,5$ mg e 3PHRP-R: $7,1 \pm 0,4$ mg).

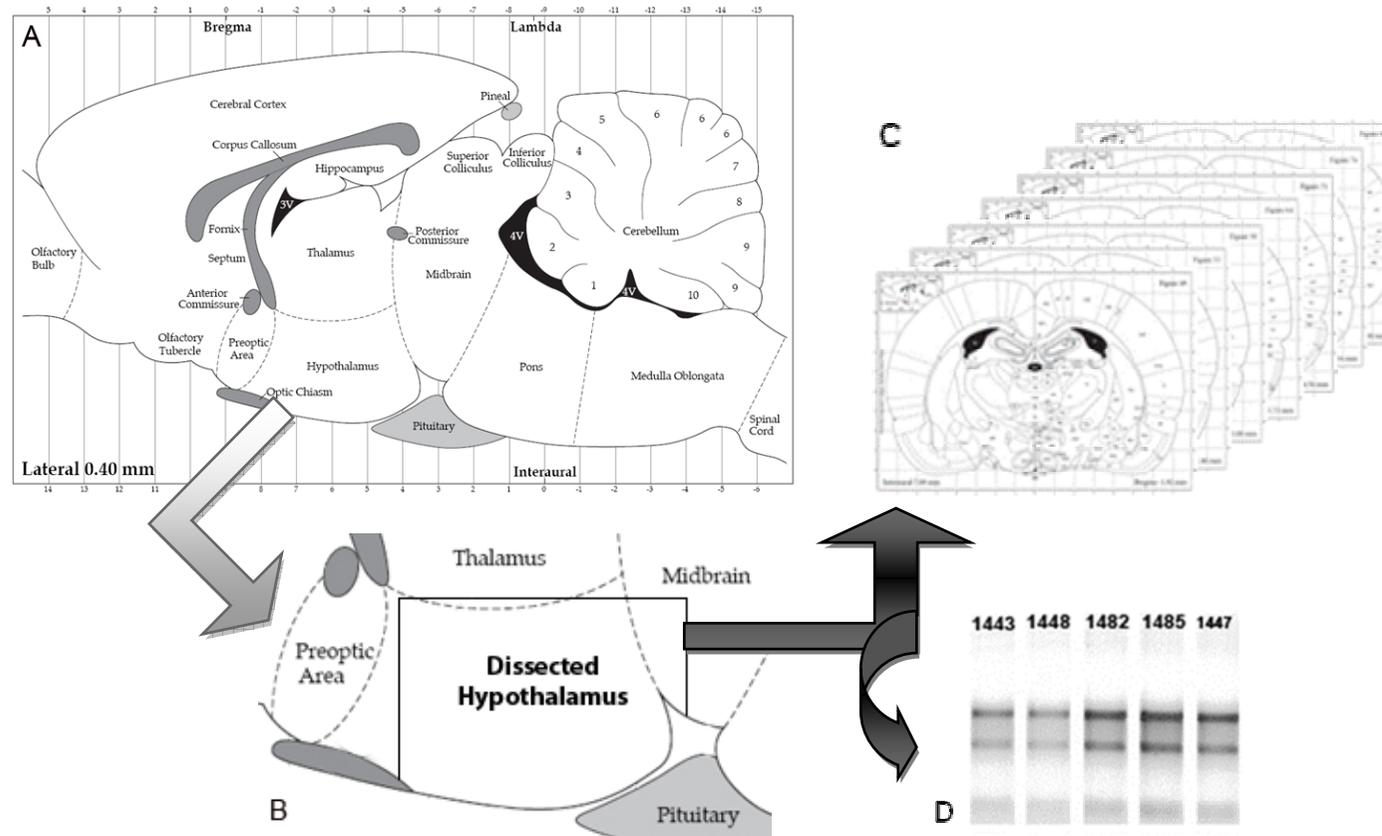


Figura 1 – (A) Diagrama esquemático de Paxinos e Watson (2005) mostrando secção transversal do encéfalo de rato e a localização do hipotálamo. (B) Limites laterais e superior (quadrado preto) da dissecção do hipotálamo. (C) Figuras seriais de número 49 a 82 do Paxinos e Watson (2005) mostrando o limite antero-posterior do hipotálamo dissecado. (D) Amostras de RNA total tratada com a enzima DNase e utilizadas para síntese de cDNA e análise da expressão gênica por qRT-PCR.

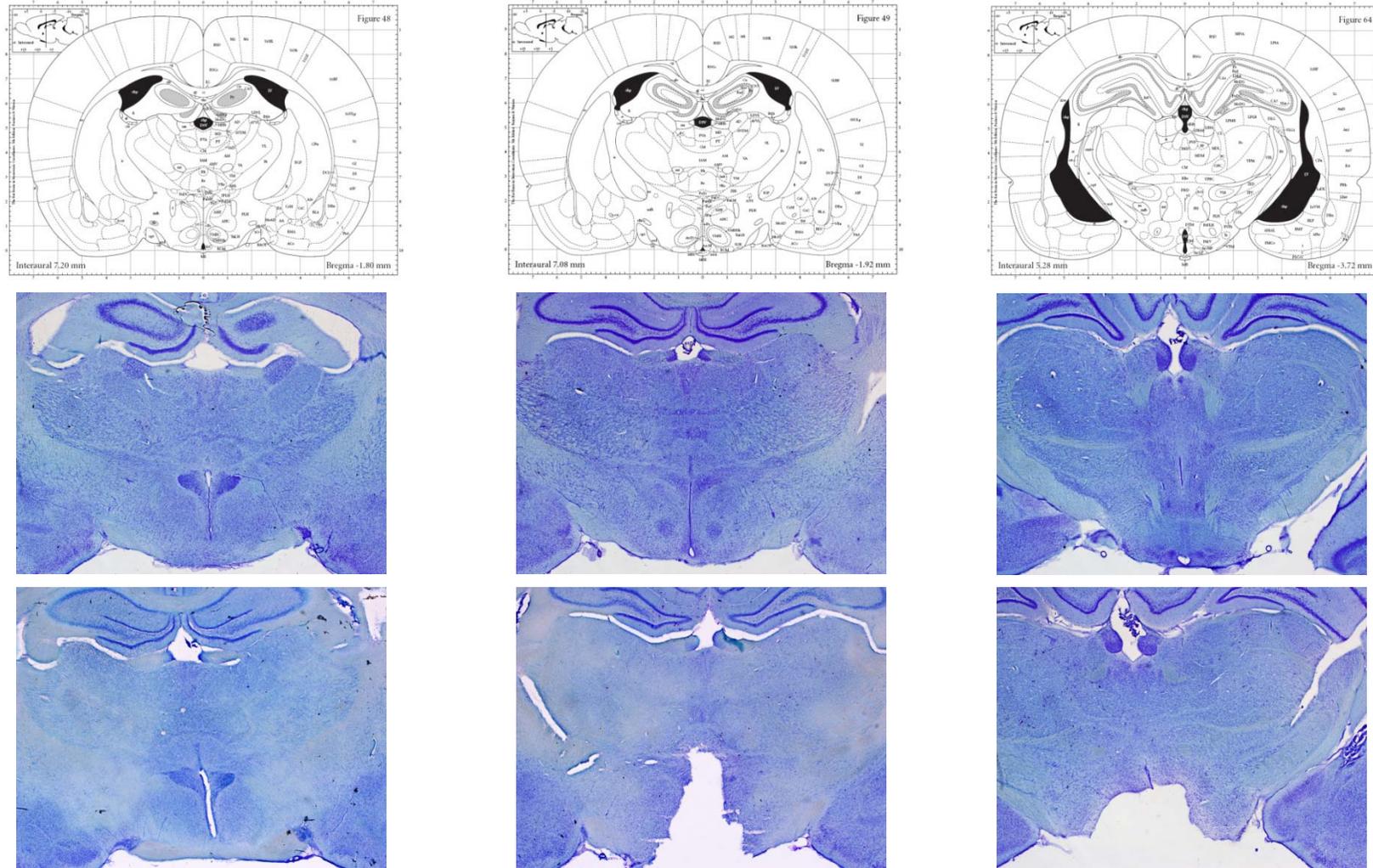


Figura 2 – Diagrama esquemático de Paxinos e Watson (2005) mostrando figuras de secções coronais de número 48 a 64 (1ª fileira), fotomicrografias de encéfalo intacto (2ª fileira) e representativas de um animal cujo hipotálamo fora dissecado (3ª fileira), mostrando os limites laterais e superior.

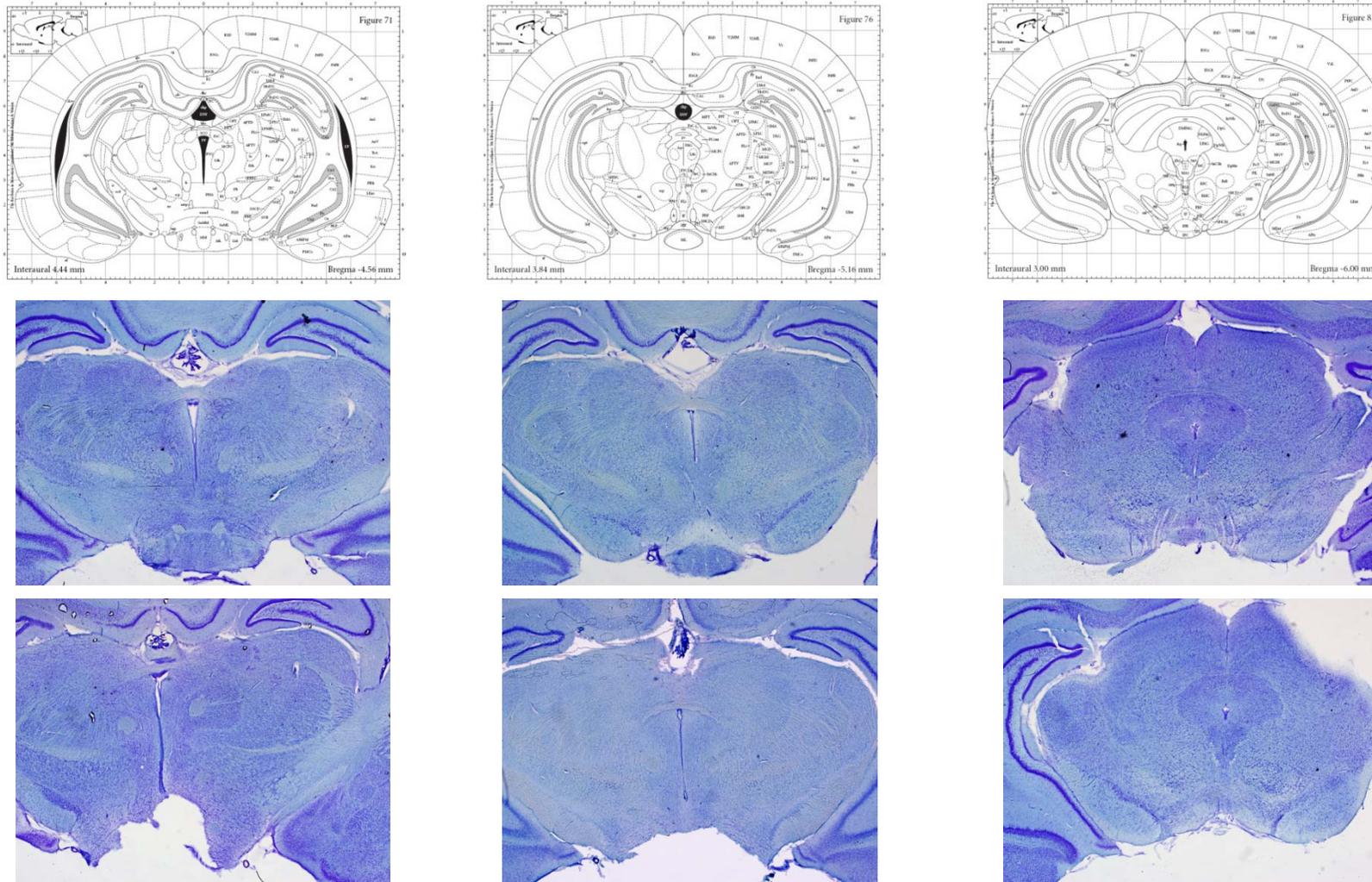


Figura 3 – Diagrama esquemático de Paxinos e Watson (2005) mostrando figuras de secções coronais de número 71 a 83 (1ª fileira), fotomicrografias de encéfalo intacto (2ª fileira) e representativas de um animal cujo hipotálamo fora dissecado (3ª fileira), mostrando os limites laterais e superior.

3.5.2 Experimento 1. Identificação de alterações na expressão gênica hipotalâmica induzidas por múltiplos episódios de PHRP e correlação com o incremento da ingestão espontânea de sódio.

3.5.2.1 Experimento 1a. Repetição do protocolo PHRP: incremento da ingestão de sódio e alteração gênica no hipotálamo de ratos hidratados.

3.5.2.1.1 Ingestão espontânea de solução de NaCl 0,3 M e água

Episódios repetidos de PHRP aumentaram a ingestão diária de NaCl 0,3 M do grupo 3PHRP-H da 2^a à 4^a semana, comparada com a ingestão basal e as respectivas semanas de ambos os grupos, CONT-H e 1PHRP-H (grupo, $F_{2,24}=11,5$; semana, $F_{3,72}=23,3$; grupo vs. semana, $F_{6,72}=6,5$, $P<0,05$) (Fig. 4A). A ingestão diária de NaCl 0,3 M do grupo 3PHRP-H na 3^a e 4^a semana foi maior do que a ingestão deste mesmo grupo na 2^a semana ($P<0,05$) (Fig. 4A). Um único episódio de PHRP foi suficiente para aumentar a ingestão diária de NaCl 0,3 M do grupo 1PHRP-H comparado com sua ingestão basal ($P<0,05$); no entanto, esta ingestão (4^a semana) não difere da ingestão deste mesmo grupo na semana anterior (3^a semana) (Fig. 4A). Um único ou repetidos episódios de PHRP não alteraram a ingestão diária de água, a qual foi semelhante entre os grupos (grupo, $F_{2,24}=0,2$; semana, $F_{3,72}=2,9$; grupo vs. semana, $F_{6,72}=1,8$) (Fig. 4B).

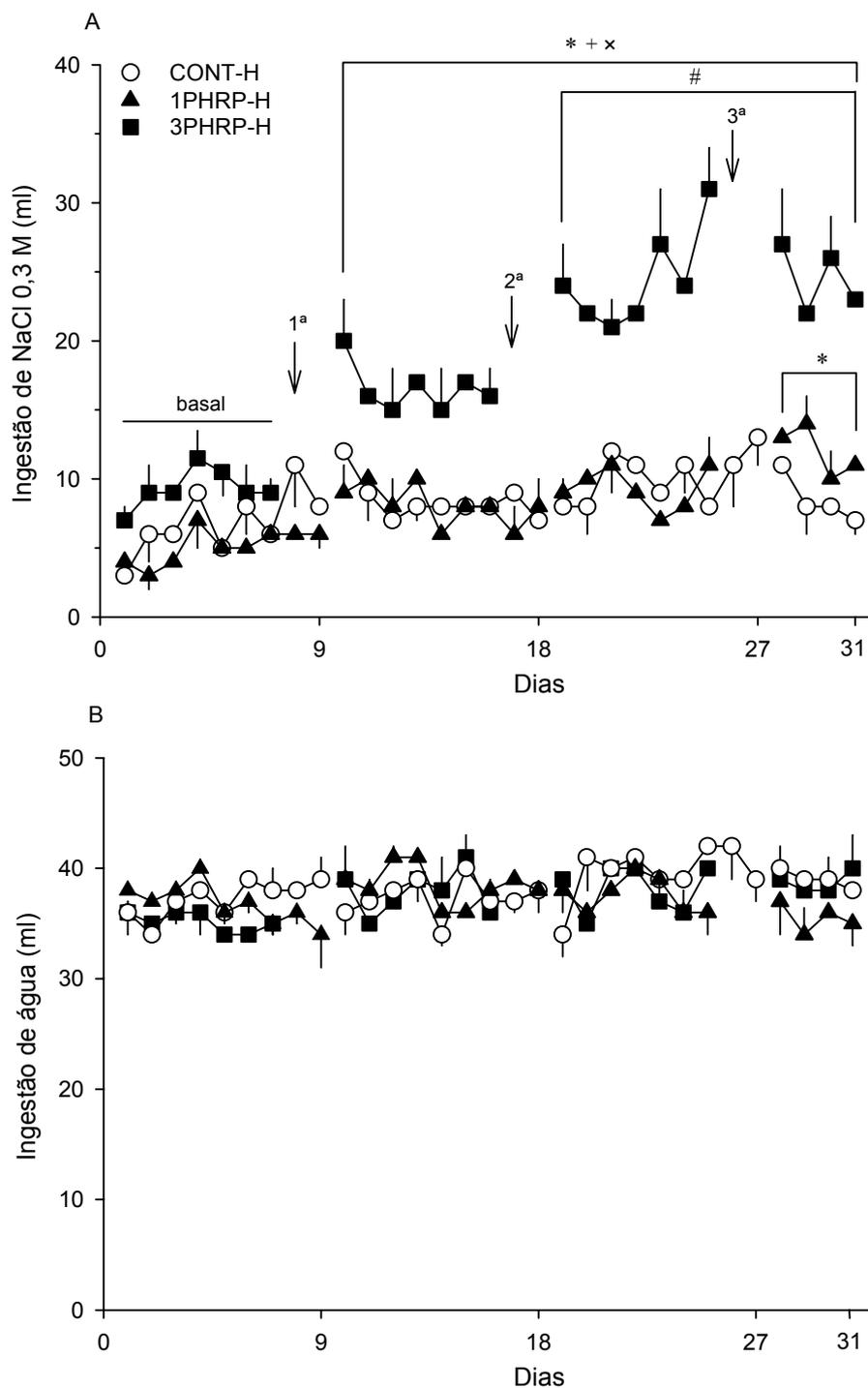


Figura 4 – Ingestão diária de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos do Experimento 1a submetidos a uma (1PHRP-H, triângulo preto), três (3PHRP-H, quadrado preto) ou nenhuma (CONT-H, círculo branco) privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP). * $P < 0,05$ vs. basal, # $P < 0,05$ vs. 2^a semana, + $P < 0,05$ vs. CONT-H, × $P < 0,05$ vs. 1PHRP-H, n = 9 por grupo.

3.5.2.1.2 Teste de sede e de apetite ao sódio

A ingestão de água foi a mesma durante o RP nos três testes de sede feitos pelo grupo 3PHRP-H ($F_{2,16}=2,1$, $P>0,05$) (Fig. 5). A quantidade de água ingerida no único teste de sede feito pelo grupo 1PHRP-H foi semelhante à quantidade de água ingerida nos três testes de sede do grupo 3PHRP-H (Fig. 5).

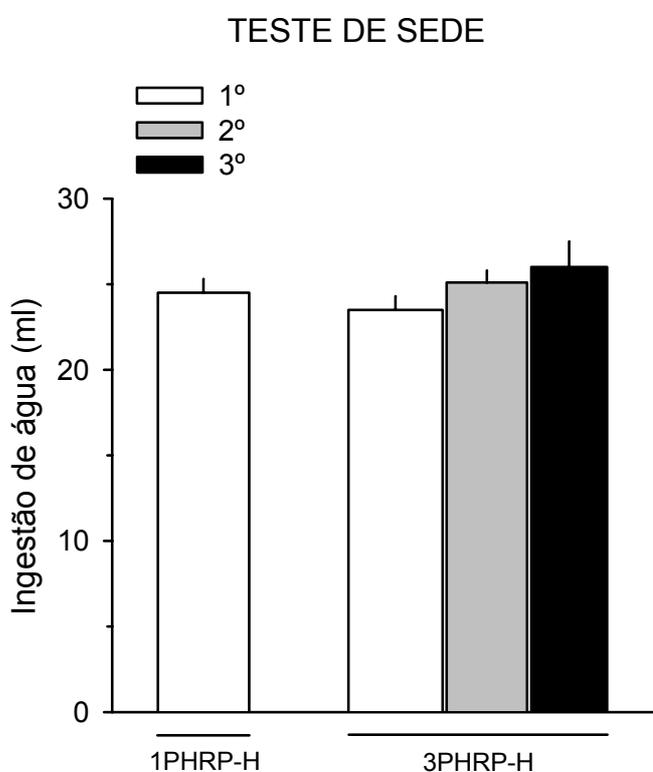


Figura 5 – Ingestão de água induzida por 36 h de privação hídrica, durante o 1º (barra branca), 2º (barra cinza) e 3º (barra preta) período de rehidratação parcial (RP), em ratos do Experimento 1a submetidos a uma (1PHRP-H) ou três (3PHRP-H) PHRP; n = 9 por grupo.

Episódios repetidos de PHRP aumentaram a ingestão induzida de NaCl 0,3 M aos 30, 60 e 120 min do 3º teste de apetite ao sódio do grupo 3PHRP-H comparado com o 1º teste do mesmo grupo e do grupo 1PHRP-H (3PHRP-H: teste, $F_{2,16}=9,5$; tempo, $F_{3,24}=2,4$, $P<0,05$; teste vs. tempo, $F_{6,48}=0,05$, $P>0,05$) (1PHRP-H: teste, $F_{1,64}=8,4$; tempo, $F_{3,64}=2,9$, $P<0,05$; teste vs. tempo, $F_{3,64}=0,07$, $P>0,05$) (Fig. 6A). A ingestão de água durante o teste de apetite ao sódio é secundária à de NaCl 0,3 M e está relacionada com a quantidade de solução hipertônica de NaCl ingerida. Por conseguinte, não surpreende o grupo 3PHRP-H ter ingerido mais água aos 30 e 60 min do 3º teste do apetite ao sódio comparado com o 1º teste do mesmo grupo e do grupo 1PHRP-H (3PHRP-H: teste, $F_{2,16}=3,7$; tempo, $F_{3,24}=19,5$, $P<0,05$; teste vs. tempo, $F_{6,48}=1,7$, $P>0,05$) (1PHRP-H: teste, $F_{1,64}=9,6$; tempo, $F_{3,64}=13,0$, $P<0,05$; teste vs. tempo, $F_{3,64}=0,5$, $P>0,05$) (Fig. 6B).

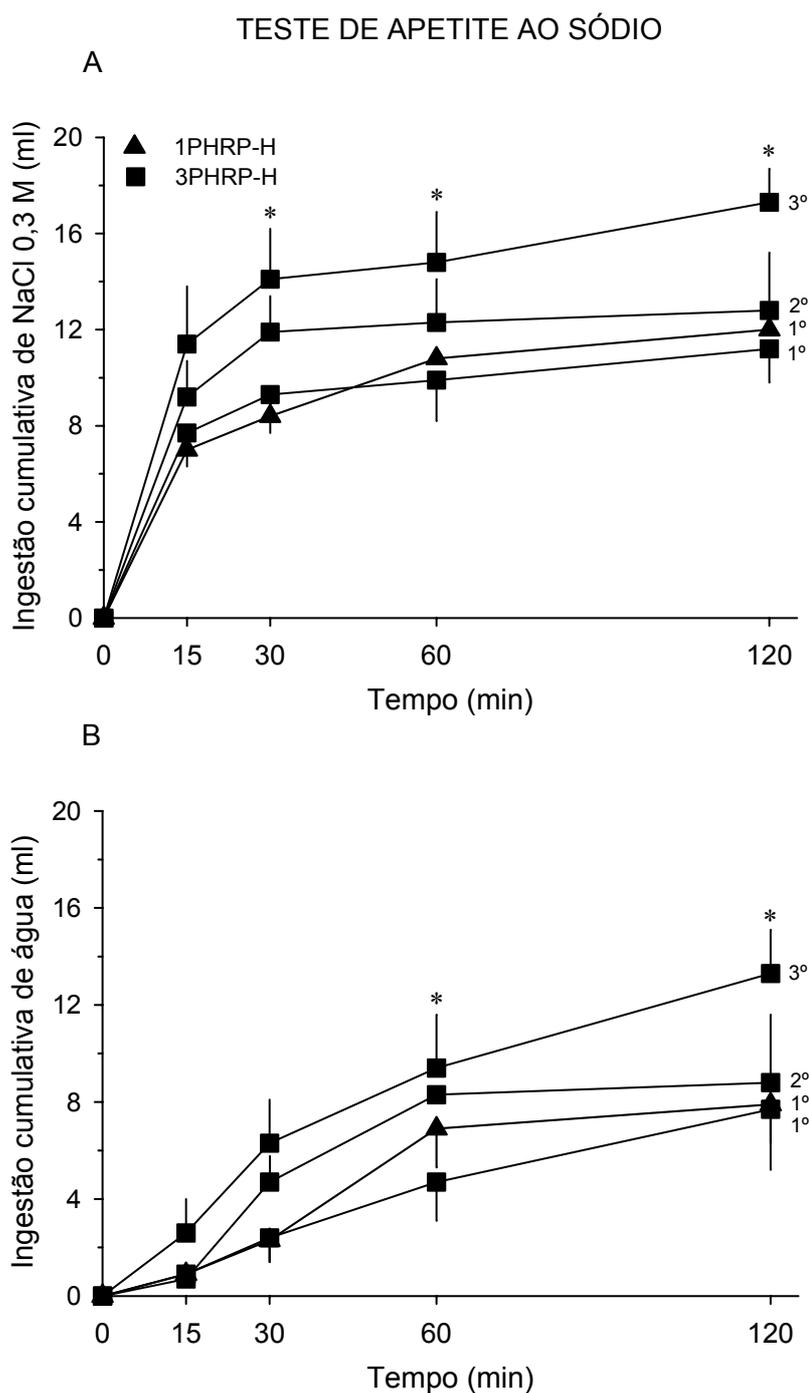


Figura 6 – Ingestão de NaCl 0,3 M (A) e água (B) induzida por PHRP, durante o teste de apetite ao sódio, em ratos do Experimento 1a submetidos a uma (1PHRP-H, triângulo) e três (3PHRP-H, círculo) PHRP. * $P < 0,05$ vs. 1º teste, $n = 9$ por grupo.

3.5.2.1.3 Parâmetros sanguíneos em animais sob hidratação

Os parâmetros sanguíneos (S[Na⁺], S[K⁺], StP e SOsmol) foram semelhantes em animais sob hidratação submetidos a um (1PHRP-H), três (3PHRP-H) ou nenhum (CONT-H) episódio de PHRP (Tabela 2).

Tabela 2 – Determinação dos parâmetros sanguíneos em grupos de animais do Experimento 1a (n = 9 por grupo). S[Na⁺], S[K⁺], StP: concentração sérica de sódio, potássio e proteína total, e SOsmol: osmolalidade sérica.

	S[Na ⁺] μEq	S[K ⁺] μEq	StP g%	SOsmol mOsmol/Kg
CONT-H	139 ± 1	6,5 ± 0,2	6,4 ± 0,1	308 ± 1
1PHRP-H	141 ± 1	6,6 ± 0,2	6,6 ± 0,1	309 ± 1
3PHRP-H	140 ± 1	6,9 ± 0,1	6,3 ± 0,1	310 ± 1

3.5.2.1.4 Expressão gênica do SRA hipotalâmico em animais sob hidratação

Os três grupos de animais (CONT-H, 1PHRP-H e 3PHRP-H) utilizados apresentaram semelhante quantidade de transcritos *Actb* e *Gapdh* no hipotálamo; portanto a quantidade de transcritos do SRA hipotalâmico foi determinada, relativamente a *Actb* e *Gapdh*, utilizando o aplet geNorm e Ct (ciclo de amplificação, no qual o acúmulo de fluorescência da amostra atingiu o limiar de detecção arbitrário) de cada amostra (Vandesompele et al., 2002).

Animais sob hidratação submetidos a um episódio de PHRP (1PHRP-H) aumentaram em 76% a quantidade hipotalâmica do transcrito *Agtr1a* comparado com o grupo CONT-H, mas esta quantidade não diferiu da do grupo 3PHRP-H ($F_{2,19}=3,8$, $P<0,05$) (Fig. 7). No entanto, a quantidade dos transcritos *Agt*, *Ren*, *Eca1*, *Eca2*, *Anpep*, *Agtrap*, *Agtr1* e *Apln* foram semelhantes entre os três grupos (Fig. 7). Os transcritos *Agtr1b* e *Agtr2* não foram detectados por qRT-PCR no hipotálamo de ratos nestas condições experimentais (bem como em: Lenkei et al., 1997; Fitzsimons, 1998 e Gasparo et al., 2000).

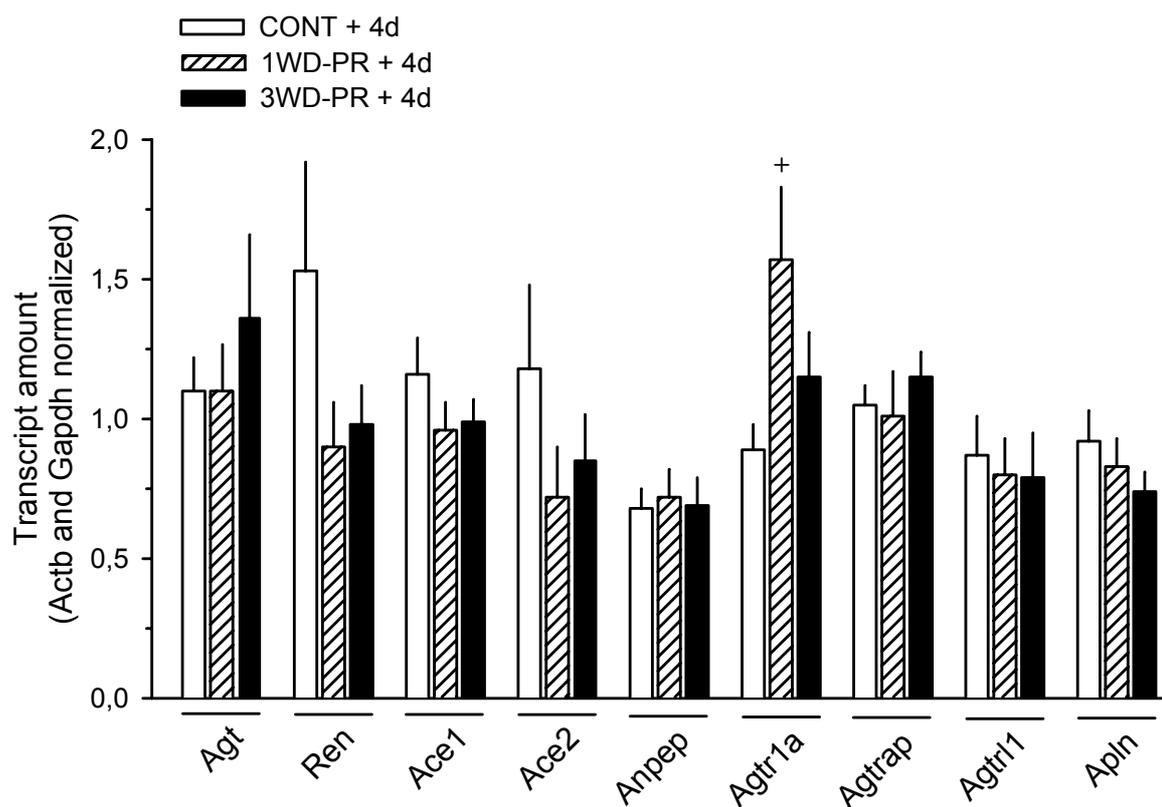


Figura 7 – Análise da expressão gênica do SRA hipotalâmico por transcrição reversa seguida de qRT-PCR em ratos sob hidratação (-H) (Experimento 1a) submetidos a uma (1PHRP-H, barra hachurada), três (3PHRP-H, barra preta), ou nenhuma (CONT-H, barra branca) PHRP. ⁺ P<0,05 vs. CONT-H, n = 6-12 por grupo e gene.

3.5.2.2 Experimento 1b. Repetição do protocolo PHRP: parâmetros urinários e ingestão de alimento.

Repetidos episódios de PHRP não alteraram os parâmetros urinários (UV, UNaV, UKV, UOsmol) determinados em animais hidratados (urina de 24 h da 3^a e 4^a semana), privados (urina de 36 h de PH) e reidratados (urina de 2 h após o RP) comparados com os respectivos parâmetros urinários do grupo 1PHRP (Tabela 3). A ingestão de ração durante as 24 h da 3^a e 4^a semana e 36 h de PH foi semelhante entre os grupos 1PHRP e 3PHRP (Tabela 3). Após as 2 h do teste de apetite ao sódio, o grupo 3PHRP excretou mais sódio na urina comparado ao grupo 1PHRP (teste “t” de Student, $P < 0,05$) (Tabela 3). No entanto, esta natriurese apresentada pelo grupo 3PHRP ocorreu após estes animais terem ingerido mais NaCl 0,3 M durante o 3^o teste de apetite ao sódio comparado com o 1^o teste do grupo 1PHRP, respectivamente: $13,1 \pm 1,5$ ml/2 h e $3,2 \pm 1,2$ ml/2 h (teste “t” de Student, $P < 0,05$) (Tabela 3). O UV, UKV e UOsmol foram semelhantes entre os grupos após o teste de apetite ao sódio (Tabela 3).

Tabela 3 – Determinação dos parâmetros urinários e medida da ingestão de ração em grupos de animais do Experimento 1b (1PHRP, n = 6 e 3PHRP, n = 10). UV: volume urinário, UNaV and UKV: quantidade total de sódio e potássio excretada e UOsmol: osmolalidade urinária. * P<0,05 vs. 1PHRP-H

	UV ml	UNaV μEq	UKV μEq	UOsmol mOsmol/Kg	Ração g
24 h da 3ª semana (animais hidratados)					
1PHRP	9,9 ± 1,1	1849 ± 257	551 ± 75	2418 ± 162	21,3 ± 0,9
3PHRP	14,6 ± 2,3	3788 ± 1028	973 ± 181	2094 ± 157	23,3 ± 1,2
36 h de privação hídrica (animais privados)					
1PHRP	4,8 ± 0,9	2052 ± 485	506 ± 67	6771 ± 1252	17,5 ± 0,7
3PHRP	4,9 ± 0,4	2336 ± 276	581 ± 125	4535 ± 1128	19,4 ± 0,9
2 h do teste de sede (animais reidratados)					
1PHRP	0,6 ± 0,3	34 ± 24	31 ± 16	336 ± 291	-
3PHRP	0,9 ± 0,2	20 ± 8	34 ± 11	429 ± 156	-
2 h do teste de apetite ao sódio					
1PHRP	1,9 ± 0,7	46 ± 20	59 ± 24	784 ± 292	-
3PHRP	3,1 ± 1,1	349 ± 174*	101 ± 20	701 ± 121	-
24 h da 4ª semana (animais hidratados)					
1PHRP	11,5 ± 1,2	2570 ± 486	721 ± 105	2412 ± 145	22,1 ± 0,7
3PHRP	14,7 ± 1,9	4031 ± 778	1013 ± 118	1924 ± 172	23,2 ± 0,8

3.5.3 Experimento 2. Identificação de alterações na expressão gênica hipotalâmica induzidas por múltiplos episódios de PHRP e correlação com incremento do apetite ao sódio.

3.5.3.1 Ingestão espontânea de solução de NaCl 0,3 M e água

Episódios repetidos de PHRP aumentaram a ingestão diária de NaCl 0,3 M do grupo 3PHRP-R na 2^a (19 ± 3 ml) e 3^a (21 ± 3 ml) semana comparada com a ingestão basal (12 ± 3 ml) (semana, $F_{2,40}=6,9$; semana vs. grupo, $F_{2,40}=49,6$, $P<0,05$, grupo, $F_{1,20}=11,5$). A ingestão diária de NaCl 0,3 M do grupo 1PHRP-R não diferiu entre semanas (12 ± 2 ml, média por semana) nem foi diferente das ingestões semanais do grupo 3PHRP-R. A ingestão diária de água foi semelhante entre os grupos e as semanas (34 ± 2 ml, média por semana e grupo).

3.5.3.2 Teste de sede e apetite ao sódio

A ingestão de água durante o RP não foi diferente entre as rehidratações no grupo 3PHRP-R ($23,4 \pm 0,7$ ml, média por rehidratação) e a quantidade de água ingerida no 1^o RP do grupo 1PHRP-R ($22,8 \pm 1,8$ ml) foi semelhante à quantidade de água ingerida nas três rehidratações do grupo 3PHRP-R.

A ingestão de sódio e água do grupo 3PHRP-R foi semelhante entre o 1^o e 2^o teste de apetite ao sódio, respectivamente: $12,5 \pm 1,4$ ml/2 h e $9,5 \pm 1,7$ ml/2 h, média por teste.

3.5.3.3 Parâmetros sanguíneos em animais após rehidratação

Os parâmetros sanguíneos (S[Na⁺], S[K⁺], StP e SOsmol) após a rehidratação foram semelhantes entre animais submetidos a um (1PHRP-R) ou três (3PHRP-R) episódios de PHRP (Tabela 4).

Tabela 4 – Determinação dos parâmetros sanguíneos em grupos de animais do Experimento 2 (n = 11 por grupo). S[Na⁺], S[K⁺], StP: concentração sérica de sódio, potássio e proteína total, e SOsmol: osmolalidade sérica.

	S[Na ⁺] μEq	S[K ⁺] μEq	StP g%	SOsmol mOsmol/Kg
1PHRP-R	132 ± 0	6,2 ± 0,1	6,6 ± 0,1	289 ± 1
3PHRP-R	131 ± 1	6,0 ± 0,2	6,4 ± 0,1	291 ± 2

3.5.3.4 Expressão gênica do SRA hipotalâmico em animais após rehidratação

Os dois grupos de animais (1PHRP-R e 3PHRP-R) utilizados também apresentaram semelhante quantidade de transcrito Actb e Gapdh no hipotálamo; portanto a quantidade de transcritos do SRA hipotalâmico foi determinada, relativamente a Actb e Gapdh, como descrito no item 3.5.2.1.4.

Após o 3º RP, animais submetidos a repetidos episódios de PHRP (3PHRP-R) aumentaram em 43%, 60%, 36% e 159% a quantidade dos transcritos Agt, Anpep, Agtrap e Agtr1, respectivamente, comparadas com o grupo 1PHRP-R (Agt; Anpep; Agtrap; Agtr1: teste “t” de Student, $P < 0,05$] (Fig. 8). No entanto, a quantidade dos transcritos Ren, Ace1, Ace2, Agtr1a e Apln foram semelhantes entre os dois grupos (Fig. 8). Semelhantemente ao ocorrido no Experimento 1, os transcritos Agtr1b e Agtr2 também não foram detectados por qRT-PCR nestas condições experimentais.

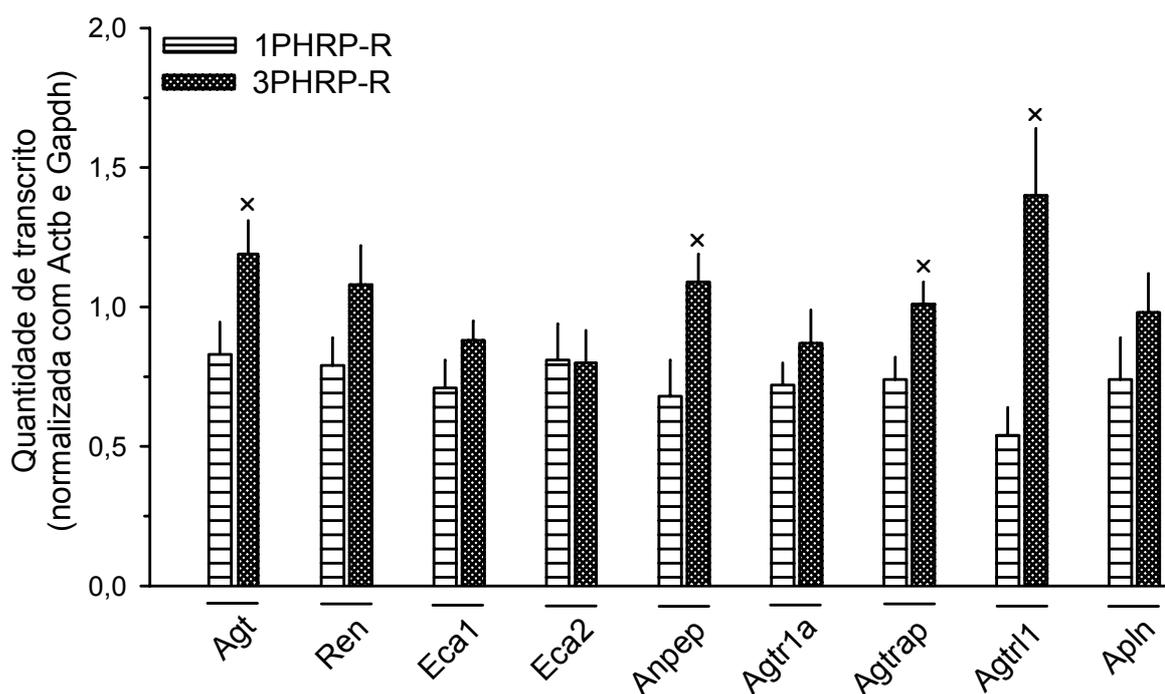


Figura 8 – Análise da expressão gênica do SRA hipotalâmico por transcrição reversa seguida de qRT-PCR em ratos após rehidratação (-R) (Experimento 2) submetidos a uma (1PHRP-R, barra hachurada horizontalmente) ou três (3PHRP-R, barra finamente hachurada) PHRP. * $P < 0,05$ vs. 1PHRP-R, $n = 8-10$ por grupo e gene.

3.6 Discussão

A repetição de PHRP incrementou ambas as formas de ingestão de sódio, espontânea e induzida e o incremento não está relacionado com alterações de parâmetros sanguíneos e excreção urinária. O incremento da ingestão espontânea de sódio não está relacionado a alterações na quantidade de transcritos hipotalâmicos relacionados ao SRA. No entanto, animais sob hidratação submetidos a apenas uma PHRP aumentaram a quantidade de transcrito Agtr1a no hipotálamo. O incremento do apetite ao sódio está relacionado a alterações na quantidade de transcritos Agt, Anpep, Agtrap e Agtr11.

Em 2002, Pereira et al. demonstraram que múltiplos episódios de PHRP incrementam a ingestão espontânea de NaCl hipertônico, mas não a ingestão induzida de sódio. Os resultados do presente trabalho demonstra que ambas as formas de ingestão de sódio são incrementadas por múltiplos episódios de PHRP e isto tem sido constantemente reproduzido em nosso laboratório pelos mesmos investigadores. Por conseguinte, o protocolo PHRP é um método natural de se induzir apetite ao sódio, pois não requer manipulação dos animais em demasia, nem utilização de técnicas invasivas e consiste numa ferramenta útil para a produção do incremento da ingestão de sódio e conseqüentemente, investigação de seus mecanismos.

Sinais que facilitam o apetite ao sódio, tais como hipovolemia e natriurese, foram semelhantes entre ratos submetidos ao primeiro ou terceiro episódio de PHRP imediatamente antes do teste do apetite ao sódio (Tabelas 2 (1PHRP-R vs. 3PHRP-R) e 3 (animais reidratados, 1PHRP vs. 3PHRP)). Este achado reforça a idéia de que o incremento da ingestão induzida de sódio se deve a uma adaptação comportamental a repetidos episódios de desidratação. Além disso, o incremento da ingestão espontânea de sódio também não está relacionado a alterações sistêmicas entre ratos sob hidratação submetidos a um ou três prévios PHRP (Tabelas 2 (1PHRP-H vs. 3PHRP-H) e 3 (animais hidratados, 1PHRP vs. 3PHRP)).

O incremento da ingestão espontânea não está associado a alterações na quantidade de transcritos hipotalâmicos relacionados com o SRA (Figura 7). Por outro lado, animais hidratados submetidos a um prévio episódio de PHRP (grupo 1PHRP-H) aumentaram a quantidade de transcrito Agtr1a no hipotálamo (Figura 7). Este resultado revela que um único episódio de PHRP, mas não múltiplos, é capaz de regular positivamente a transcrição de RNAm hipotalâmico que codifica o

receptor Agtr1a. De maneira oposta, ratos hidratados submetidos a três prévios episódios de PHRP não mostraram esta regulação positiva e isto pode se dever ao fato de que o peptídeo ANG II encefálico é capaz de inativar seus receptores Agtr1, estimulando sua fosforilação (Yang et al., 1997; Neves et al., 2000).

Da mesma maneira que repetidas exposições a drogas psicoestimulantes, tais como anfetamina e cocaína, aumentam a locomoção e o ato de se levantar, repetidas depleções de sódio aumentam o apetite ao sódio (Falk, 1966; Sakai et al., 1987; Stewart e Badiani, 1993; Pierce e Kalivas, 1997). Este fenômeno é chamado de sensibilização ou alterações de longo prazo da resposta comportamental motivada que ocorre após uma prévia exposição. A alteração de longo prazo na ingestão espontânea de sódio induzida por prévios episódios de PHRP é caracterizada pelo aumento do consumo da ingestão diária de cloreto de sódio hipertônico (Figura 4A). Ratos submetidos a prévios episódios de PHRP ingeriram mais NaCl 0,3 M na 3ª e 4ª semana do que eles ingeriram na 2ª semana (Figura 4A), semana posterior a 1ª depleção de sódio. Sendo assim, este resultado revela que repetidos episódios de PHRP, bem como diálise hiperoncótica, protocolo da furosemida e furosemida associada a baixa dose de captopril, sensibilizam a ingestão espontânea de sódio hipertônico (Frankmann et al., 1986; Sakai et al., 1989; Pereira et al., 2005a, 2005b).

O incremento do apetite ao sódio está associado a alterações na quantidade de transcritos Agt, Anpep, Agtrap e Agtr1 no hipotálamo (Figura 8). Este resultado sugere que animais sob rehidratação submetidos a prévios episódios de PHRP (grupo 3PHRP-R) apresentam aumentada atividade do SRA hipotalâmico (Figura 8). Camundongos transgênicos que expressam grande quantidade de Agt humano no encéfalo apresentam aumentada preferência por sódio (Morimoto et al., 2002);

portanto, sugere-se que o aumento dos níveis de RNAm hipotalâmico que codifica Agt, o pré-pró-precursor da ANG II, pode estar exercendo alguma função no incremento do apetite ao sódio. No entanto, a aumentada atividade do SRA ocorre com o substrato de entrada (Agt) e com a enzima de saída (Anpep) deste sistema; sendo assim, este resultado indica que a aumentada atividade do SRA hipotalâmico ocorre na via de sinalização que leva a degradação da ANG II. O aumento dos níveis de RNAm Agtrap no hipotálamo sugere que esta proteína transmembrana pode estar modulando a sinalização da ANG II em ratos sob rehidratação submetidos a prévias PHRP; devido ao fato do Agtrap interagir com o receptor Agtr1 inibindo a sinalização intracelular deflagrada pela ativação de receptores Agtr1a (Daviet et al., 1999; Lopez-Illasaca et al., 2003).

O receptor Agtr1, também chamado de receptor da apelina ou APJ, divide consideráveis semelhanças na seqüência de DNA com o receptor Agtr1 (O'Dowd et al., 1993). À parte a homologia de seqüências entre receptores Agtr1 e Agtr1, é sabido que o peptídeo ANG II não se acopla ao receptor Agtr1, o qual é acoplado pelo ligante endógeno apelina e pelos fragmentos sintéticos deste peptídeo, tais como apelina-13 e apelina-17 (Tatemoto et al., 1998; Katugampola et al., 2001; Kleinz et al., 2005). O RNAm e peptídeo para ambos, Agtr1 e apelina, estão amplamente distribuídos no encéfalo de ratos, particularmente nos núcleos supra-óptico (NSO) e paraventricular (NPV) do hipotálamo (De Mota et al., 2000; Hosoya et al., 2000; O'Carroll et al., 2000; Reaux et al., 2002). Trabalhos prévios também mostraram que a apelina tem papel no controle do equilíbrio hidro-eletrolítico, alimentação e regulação cardiovascular (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2001; Taheri et al., 2002; Kagiya et al., 2005; Tatemoto et al., 2001; Katugampola et al., 2001; Sunter et al., 2003).

Com relação ao controle do equilíbrio hidro-eletrolítico, a apelina-13 injetada intracerebroventricularmente reduz a ingestão de água induzida pela privação hídrica e intraperitonealmente aumenta a ingestão espontânea de água em ratos hidratados (Lee et al., 2000; Reaux et al., 2001; Taheri et al., 2002). Além disso, a privação hídrica induz expressão de RNAm que codifica receptores Agtr1 no NSO e NPV de ratos (O'Carroll e Lolait, 2003). O fato de que o RNAm que codifica Agtr1 está regulado positivamente no hipotálamo de ratos sob desidratação submetidos a prévios episódios de PHRP sugere que a apelina pode ter função no incremento do apetite ao sódio. Futuras investigações deveriam ser feitas para avaliar a expressão gênica da vasopressina hipotalâmica, bem como seus receptores, pois privação hídrica induz regulação cruzada entre apelina e vasopressina (Reaux-Le Goazigo et al., 2004).

Em suma, repetidos episódios de PHRP sensibilizam a ingestão espontânea e o apetite ao sódio. O incremento de ambas as formas de natriorexigênese não está associado com alterações de parâmetros sistêmicos e o incremento da ingestão espontânea de sódio não está associado com alterações gênicas relacionadas ao SRA hipotalâmico. Além disso, o incremento do apetite ao sódio está associado com aumento dos níveis hipotalâmicos de RNAm Agt, Anpep, Agtrap e Agtr1. Por conseguinte, os peptídeos hipotalâmicos ANG II e apelina podem exercer função no incremento do apetite ao sódio. Futuras investigações deveriam ser feitas para avaliar se estas alterações na quantidade de transcritos também ocorrem ao nível funcional protéico.

3.7 Referências

Allen AM, Zhuo J, Mendelsohn FAO (2000) Localization and function of angiotensin AT1 receptors. *American Journal of Hypertension* 13:31S-38S.

Anand BK, Brobeck JR (1951) Hypothalamic control of food intake in rats and cats. *Yale J Biol Med* 24:123-140.

Andersson B (1955) Observations on the water and electrolyte metabolism in the goat. *Acta Physiol Scand* 33(1):50-65.

Andersson B, McCann SM (1955) A further study of polydipsia evoked by hypothalamic stimulation in the goat. *Acta Physiol Scand* 33(4):333-346.

Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LL, Valença MM, McCann SM (2004) Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84(1):169-208.

Belova LA (2000) Angiotensin II-generating enzymes. *Biochemistry* 65(12):1337-1345.

Bennett JP Jr, Snyder SH (1980) Receptor binding interactions of the angiotensin II antagonist, 125I[sarcosine¹, leucine⁸] angiotensin II with mammalian brain and peripheral tissues. *Eur J Pharmacol* 67:11-25.

Bertelli DF, Araújo EP, Cesquini M, Stoppa GR, Gasparotto-Contessotto M, Toyama MH, Felix JV, Carvalheira JB, Michelini LC, Chiavegatto S, Boschero AC, Saad MJ,

Lopes-Cendes I, Velloso LA (2006) Phosphoinositide-specific inositol polyphosphate 5-phosphatase IV inhibits inositide trisphosphate accumulation in hypothalamus and regulates food intake and body weight. *Endocrinology* 147(11):5385-5399.

Bibancos T, Jardim DL, Aneas I, Chiavegatto S (2007) Social isolation and expression of serotonergic neurotransmission-related genes in several brain areas of male mice. *Genes Brain Behav* 6(6):529-539.

Black SL, Kucharczyk J, Mogenson GJ (1974) Disruption of drinking to intracranial angiotensin by a lateral hypothalamic lesion. *Pharmacol Biochem Behav* 2(4):515-522.

Bryant RW, Epstein AN, Fitzsimons JT, Fluharty SJ (1980) Arousal of a specific and persistent sodium appetite in the rat with continuous intracerebroventricular infusion of angiotensin II. *J Physiol* 301:365-382.

Bunnemann B, Fuxe K, Ganten D (1992) The brain renin-angiotensin system: localization and general significance. *J Cardiovasc Pharmacol* 9(6):S51-S62.

Burrell LM, Hohnston CI, Tikellis C, Cooper ME (2004) ACE2, a new regulator of the renin-angiotensin system. *Trends Endocrinol Metab* 15(4):166-169.

Campbell DJ (2003) The renin-angiotensin and the kallikrein-kinin systems. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35:784-791.

Chiavegatto S, Dawson VL, Mamounas LA, Koliatsos VE, Dawson TM, Nelson RJ (2001) Brain serotonin dysfunction accounts for aggression in male mice lacking neuronal nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 98(3):1277-1281.

Covian MR, Antunes-Rodrigues J (1963) Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. *Am J Physiol* 205:922-926.

Cox VC, Valenstein ES (1969) Effects of stimulation intensity on behavior elicited by hypothalamic stimulation. *J Comp Physiol Psychol* 69(4):730-733.

Daviet L, Lehtonen JYA, Tamura K, Griese DP, Horiuchi M, Dzau VJ (1999) Cloning and characterization of ATRAP, a novel protein that interacts with the angiotensin II type 1 receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 274(24):17058-17062.

Denton D (1984) In: *The hunger for salt: an anthropological, physiological and medical analysis*. New York: Springer-Verlag.

Denton DA, McKinley MJ, Weisinger RS (1996) Hypothalamic integration of body fluid regulation. *Proc Natl Acad Sci* 93:7397-7404.

De Gasparo M, Catt KJ, Inagami T, Wright JW, Unger T (2000) International union of pharmacology. XXIII. The angiotensin II receptors. *Pharmacol Rev* 52:415-472.

De Luca Jr LA, Xu Z, Schoorlemmer GH, Thunhorst RL, Beltz TG, Menani JV, Johnson AK (2002) Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. *Am J Physiol* 282:R552-R559.

De Luca Jr LA, Vendramini RC, Pereira DTB, Colombari DAS, David RB, de Paula PM, Menani JV (2007) Water deprivation and the double depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 40:707-712.

Deschepper CF, Bouhnik J, Ganong WF (1986) Colocalization of angiotensinogen and glial fibrillary acidic protein in astrocytes in rat brain. *Brain Res* 374(1):195-198.

Doward WV, Chalmers L (1975) Comparison of methods for calculation serum osmolality from chemical concentrations, and prognostic value of such calculations. *Clin Chem* 21:p190-194.

Epstein AN, Teitelbaum P (1964) Severe and persistent deficits in thirst produced by lateral hypothalamic damage. In: *Thirst in the regulation of body water* (Wayner MJ ed.), pp 395-406 Oxford: Pergamon Press.

Epstein AN (1991) Neurohormonal control of salt intake in the rat. *Brain Research Bulletin* 27:315-320.

Falk JL (1966) Serial sodium depletion and NaCl solution intake. *Physiol Behav* 1:75-77.

Fitzsimons JT (1998) Angiotensin, thirst, and sodium appetite. *Physiol Rev* 78:583-686.

Frankmann SP, Dorsa DM, Sakai RR, Simpson JB (1986) A single experience with hyperoncotic colloid dialysis persistently alters water and sodium intake. In: *The physiology of thirst and sodium appetite*, vol. 105 (Caro G, Epstein AN, Massi M, eds), pp 115-121 New York, London: Plenum Press.

Ganten D, Minnich JL, Granger P, Hayduk K, Brecht HM, Barbeau A, Boucher R, Genest J (1971) Angiotensin-forming enzyme in brain tissue. *Science* 173:64-65.

Ganong WF (1984) The brain renin-angiotensin system. *Ann Rev Physiol* 46:17-31.

Gouraud SS, Heesom K, Yao ST, Qiu J, Paton JF, Murphy D (2007) Dehydration-induced proteome changes in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology* 148(7):3041-3052.

Greer MA (1955) Suggestive evidence of a primary drinking center in hypothalamus of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 89(1):59-62.

Grossman SP (1990) Brain Mechanisms of thirst: anatomical considerations. In: *Thirst and sodium appetite: physiological basis*, vol. 1, pp 95-108 San Diego: Academic Press, INC.

Hilgenfeld U (1984) Angiotensinogen in rat cerebrospinal fluid. *Clinical and Experimental Hypertension* 6:1815-1824.

Hindmarch C, Yao S, Beighton G, Paton J, Murphy D (2006) A comprehensive description of the transcriptome of the hypothalamoneurohypophyseal system in euhydrated and dehydrated rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(5):1609-1614.

Hosoyo M, Kawamoto Y, Fukusomi S, Fujii R, Hobata Y, Binuma S, Kitada C, Honda S, Kurokawa T, Onda H, Nishimura O, Fujino M (2000) Molecular and functional characteristics of APJ. *The Journal of Biological Chemistry* 275(28):21061-21067.

Intebi AD, Flaxman MS, Ganong WF, Deschepper CF (1990) Angiotensinogen production by rat astroglial cells in vitro and in vivo. *Neuroscience* 34:545-554.

Kagiyama S, Fukuhara M, Matsumura K, Lin Y, Fujii K, Iida M (2005) Central and peripheral cardiovascular actions of apelin in conscious rat. *Regulatory Peptides* 125:55-59.

Katugampola SD, Maguire JJ, Matthewson SR, Davenport AP (2001) [¹²⁵I]-(Pyr¹)Apelin-13 is a novel radioligand for localizing the APJ orphan receptor in human and rat tissues with evidence for a vasoconstrictor role in man. *British Journal of Pharmacology* 132:1255-1260.

Kleiner SM (1999) Water: An essential but overlooked nutrient. *J Am Diet Assoc* 99:200-206.

Kleinz MJ, Davenport AP (2005) Emerging roles of apelin in biology and medicine. *Pharmacology & Therapeutics* 107:198-211.

Kramer JM, Plowey ED, Beatty JA, Little HR, Waldrop TG (2000) Hypothalamus, hypertension, and exercise. *Brain Research Bulletin* 53(1):77-85.

Lazartigues F, Feng Y, Lavoie JL (2007) The two fACEs of the tissue renin-angiotensin systems: implication in cardiovascular diseases. *Curr Pharm Des* 13(12):1231-1245.

Lebrun CJ, Blume A, Herdegen T, Seifert K, Bravos R, Unger T (1995) Angiotensin II induces a complex activation of transcription factors in the rat brain: expression of fos, jun and krox proteins. *Neuroscience* 65(1):93-99.

Lebrun CJ, Blume A, Herdegen T, Möllenhoff E, Unger T (1996) Complex activation of inducible transcription factors in the brain of normotensive and spontaneously hypertensive rats following central angiotensin II administration. *Reg Pep* 66:19-23.

Lee DK, Cheng R, Nguyen T, Fan T, Kariyawasam AP, Liu Y, Osmond DH, George SR, O'Dowd BF (1999) Characterization of apelin, the ligand for the APJ receptor. *Journal of Neurochemistry* 74:34-41.

Lenkei Z, Palkovits M, Corvol P, Llorens-Cortès C (1997) Expression of angiotensin type-1 (AT1) and type-2 (AT2) receptor mRNAs in the adult rat brain: a functional neuroanatomical review. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18:383-439.

Leshem M, Saadi A, Alem N, Hendi K (2008) Enhanced salt appetite, diet and drinking in traditional Bedouin women in the Negev. *Appetite* 50(1):71-82.

Lind RW, Swanson LW, Ganten D (1985) Organization of angiotensin II immunoreactive cells and fibers in the rat central nervous system. An immunohistochemical study. *Neuroendocrinology* 40(1):2-24.

Lippoldt A, Paul M, Fuxe K, Ganten D (1995) The brain renin-angiotensin system: molecular mechanisms of cell to cell interactions. *Clin Exp Hypertens* 17(1-2):251-266.

Lopez-Illasaca M, Liu X, Tamura K, Dzau VJ (2003) The angiotensin II type I receptor-associated protein, ATRAP, is a transmembrane protein and a modulator of angiotensin II signaling. *Molecular Biology of the Cell* 14:5038-5050.

Luft FC (2007) The renin-angiotensin and "drinking" behavior. *J Mol Med* 85:1043-1045.

Maas AHR, Kofstad J, Siggard-Andersen O (1983) Ionized calcium, sodium and potassium by ion selective electrodes. In: International Federation of clinical

chemistry workshop. Proceedings of the first meeting of the European Working Group on ion selective electrodes. Oslo Copenhagen: Private Press.

McKenzie JS, Denton DA (1974) Salt ingestion responses to diencephalic electrical stimulation in the unrestrained conscious sheep. *Brain Res* 70(3):449-466.

McKinley MJ, Denton DA, Nelson JF, Weisinger RS (1983) Dehydration induces sodium depletion in rats, rabbits, and sheep. *Am J Physiol* 245:R287-R292.

McKinley MJ, Allen AM, Mathai ML, May C, McAllen RM, Oldfield BJ, Weisinger RS (2001) Brain angiotensin and body fluid homeostasis. *Japanese Journal of Physiology* 51:281-289.

McKinley MJ, Albiston AL, Allen AM, Mathai ML, May CN, McAllen RM, Oldfield BJ, Mendelsohn FAO, Chai SY (2003) The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles. *Int J Biochem* 35(6):901-918.

Mendelsohn FA, Allen AM, Chai SY, McKinley MJ, Oldfield BJ, Paxinos G (1990) The brain angiotensin system. Insights from mapping its components. *Trends Endocrinol Metab* 1(4):189-198.

Miller NE (1960) Motivational effects of brain stimulation and drugs. *Fed Proc* 19:846-854.

Miyata S, Nakashima T, Kiyohara T (1994) Structural dynamics of neural plasticity in the supraoptic nucleus of the rat hypothalamus during dehydration and rehydration. *Brain Res Bull* 34(3):169-175.

Miyata S, Hatton GI (2002) Activity-related, dynamic neuron-glia interactions in the hypothalamo-neurohypophysial system. *Microscopy Research and Technique* 56:143-157.

Moffett RB, Bumpus FM, Husain A (1987) Cellular organization of the brain renin-angiotensin system. *Life Sci* 41(16):1867-1879.

Mogenson GJ, Stevenson JA (1967) Drinking induced by electrical stimulation of the lateral hypothalamus. *Exp Neurol* 17(2):119-127.

Mogenson GJ (1971) Stability and modification of consummatory behaviors elicited by electrical stimulation of the hypothalamus. *Physiol Behav* 6(3):255-260.

Moellenhoff E, Blume A, Culman J, Chatterjee B, Herdegen T, Lebrun CJ, Unger T (2001) Effect of repetitive icv injections of ANG II on c-Fos and AT(1)-receptor expression in the rat brain. *Am J Physiol* 280:R1095-R1104.

Montemurro DG, Stevenson JAF (1957) Adipsia produced by hypothalamic lesions. *Can J Biochem* 35:31-37.

Moraes JC, Amaral ME, Picardi PK, Calegari VC, Romanatto T, Bermúdez-Echeverry M, Chiavegatto S, Saad MJ, Velloso LA (2006) Inducible-NOS but not neuronal-NOS participate in the acute effect of TNF-alpha on hypothalamic insulin-dependent inhibition of food intake. *FEBS Lett* 580(19):4625-4631.

Morimoto S, Cassell MD, Sigmund CD (2002) Neuron-specific expression of human angiotensinogen in brain causes increased salt appetite. *Physiol Genomics* 9:113-120.

Na ES, Morris MJ, Johnson RF, Beltz TG, Johnson AK (2007) The neural substrates of enhanced salt appetite after repeated sodium depletions. *Brain Res* 1171:104-110.

Neves LAA, Santos RAS, Khosla MC, Milsted A (2000) Angiotensin-(1-7) regulates the levels of angiotensin II receptor subtype AT1 mRNA differentially in a strain-specific fashion. *Regulatory Peptides* 95:99-107.

Nováková A, Cort JH (1966) Hypothalamic regulation of spontaneous salt intake in the rat. *Am J Physiol* 211(4):919-925.

O'Carroll AM, Selbv TL, Palkovits M, Lolait SJ (2000) Distribution of mRNA encoding B78/apj, the rat homologue of the human APJ receptor, and its endogenous ligand apelin and peripheral tissues. *Biochim Biophys Acta* 1492(1):72-80.

O'Carroll AM, Lolait SJ (2003) Regulation of rat APJ receptor messenger ribonucleic acid expression in magnocellular neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei by osmotic stimuli. *Journal of Neuroendocrinology* 15:661-666.

O'Dowd BF, Heiber M, Chan A, Heng HH, Tsui LC, Kennedy JL, Shi X, Petronis A, George SR, Nguyen T (1993) A human gene that shows identity with the gene encoding the angiotensin receptor is located on chromosome 11. *Gene* 136(1-2):355-360.

Paxinos G, Watson C (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.

Phillips MI (1987) Functions of angiotensin in the central nervous system. *Ann Rev Physiol* 49:413-435.

Phillips MI, Speakman EA, Kimura B (1993) Levels of angiotensin and molecular biology of the tissue renin angiotensin systems. *Regul Pept* 43(1-2):1-20.

Pereira DTB, David RB, Menani JV, De Luca LA Jr (2002) Episodes of water deprivation enhance daily hypertonic NaCl intake in rats. *Braz J Med Biol Res* 35:465-468.

Pereira DTB, Menani JV, De Luca Jr. LA (2005a) Long-term changes in need-free sodium intake: a role for central angiotensin II. *Abstract of International Symposium*

of Neuroimmunoendocrinology, Neuroendocrine Network and Body Homeostasis, Ribeirão Preto, SP.

Pereira DTB, Menani JV, De Luca Jr LA (2005b) The Furo/Cap model and long-term changes in sodium intake. Abstract of XX FeSBE, Águas de Lindóia, SP.

Perlmutter LS, Tweedle CD, Hatton GI (1985) Neuronal/glia plasticity in the supraoptic dendritic zone in response to acute and chronic dehydration. *Brain Res* 361(1-2):225-232.

Pierce RC, Kalivas PW (1997) A circuitry model of the expression of behavioral sensitization to amphetamine-like psychostimulants. *Brain Res Brain Res Rev* 25(2):192-216.

Reaux A, De Mota N, Skultetyova I, Lenkei Z, El Messari S, Gallatz K, Corvol P, Palkovits M, Llorens-Cortès C (2001) Physiological role of a novel neuropeptide, apelin, and its receptor in the rat brain. *Journal of Neurochemistry* 77:1085-1096.

Reaux A, Gallatz M, Palkovits M, Llorens-Cortès C (2002) Distribution of apelin-synthesizing neurons in the adult rat brain. *Neuroscience* 113(3):653-662.

Reaux-Le Goazigo A, Morinville A, Burlet A, Llorens-Cortès C, Beaudet A (2004) Dehydration-induced cross-regulation of apelin and vasopressin immunoreactivity levels in magnocellular hypothalamic neurons. *Endocrinology* 145(9):4392-4400.

Reid IA, Ramsay DJ (1975) The effect of intracerebroventricular administration of renin on drinking and blood pressure. *Endocrinology* 97:536-542.

Roitman MF, Na E, Anderson G, Jones TA, Bernstein IL (2002) Induction of a salt appetite alters dendritic morphology in nucleus accumbens and sensitizes rats to amphetamine. *J Neurosci* 22:1-5.

Saad WA, Antunes-Rodrigues J, Gentil CG, Covian MR (1972) Interaction between hypothalamus, amygdala and septal area in the control of sodium chloride intake. *Physiol Behav* 9:629-636.

Saad WA, Camargo LAA, Silva-Netto CR, Antunes-Rodrigues J, Covian MR (1981) The control of sodium chloride intake: functional relationship between hypothalamic inhibitory areas and amygaloid complex stimulating areas. *Brain Res Bull* 6:197-202.

Salzet M, Deloffre L, Breton C, Vieau D, Schoofs L (2001) The angiotensin system elements in invertebrates. *Brain Research Reviews* 36:35-45.

Sakai RR, Fine WB, Epstein AN (1987) Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. *Behav Neurosci* 101(5):724-731.

Sakai RR, Frankmann SP, Fine WB, Epstein AN (1989) Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake of the rat. *Behav Neurosci* 103(1):186-192.

Sato MA, Yada MM, De Luca Jr LA (1996) Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. *Physiol Behav* 60(4):1099-1104.

Schulkin J (1991) Salt seeking behavior. In: *Sodium hunger*, vol. 1, pp 6-30
Cambridge: Cambridge University Press.

Sharman G, Ghorbel M, Leroux M, Beaucourt S, Wong L, Murphy D (2004) Deciphering the mechanisms of homeostatic plasticity in the hypothalamo-neurohypophyseal system – genomic and gene transfer strategies. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* 84:151-182.

Smith RW, McCann SM (1962) Alterations in food and water intake after hypothalamic lesions in the rat. *Am J Physiol* 203:366-370.

Stornetta RL, Hawelu-Johnson CL, Guyenet PG, Lynch KR (1988) Astrocytes synthesize angiotensinogen in brain. *Science* 242:1444-1446.

Stewart J, Badiani A (1993) Tolerance and sensitization to the behavioral effects of drugs. *Behav Pharmacol* 4(4):289-312.

Sunter D, Hewson AK, Dickson SL (2003) Intracerebroventricular injection of apelin-13 reduces food intake in the rat. *Neurosci Lett* 353(1):1-4.

Taheri S, Murphy K, Cohen M, Sujkovic E, Kennedy A, Dhillo W, Dakin C, Sajedi A, Ghatei M, Bloom S (2002) The effects of centrally administered apelin-13 on food intake, water intake and pituitary hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 291(5):1208-1212.

Takamata A, Mack GW, Gillen CM, Nadel ER (1994) Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement. *Am J Physiol* 266:R1493-R1502.

Tatemoto K, Hosoya M, Habata Y, Fujii R, Kakegawa T, Zou MX, Kawamata Y, Fukusumi S, Hinuma S, Kitada C, Kurokawa T, Onda H, Fujino M (1998) Isolation and characterization of a novel endogenous peptide ligand for the human APJ receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 251(2):471-476.

Tatemoto K, Takayama K, Zou MX, Kumaki I, Zhang W, Kumano K, Fujimiya M (2001) The novel peptide apelin lowers blood pressure via a nitric oxide-dependent mechanism. *Regul Pept* 99(2-3):87-92.

Theodosis DT, El Majdoubi M, Pierre K, Poulain DA (1998) Factors governing activity-dependent structural plasticity of the hypothalamoneurohypophysial system. *Cellular and Molecular Neurobiology* 18(2):285-298.

Tsigos C, Chrousos GP (2002) Hypothalamic-pituitary-adrenal axis, neuroendocrine factors and stress. *Journal of Psychosomatic Research* 53:865-871.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genomic Biol* 3(7):1-12.

Verbalis JG (2003) Disorders of body water homeostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* 17(4):471-503.

von Bohlen und Halbach O (2005) The renin-angiotensin system in the mammalian central nervous system. *Curr Protein Pept Sci* 6(4):355-371.

von Bohlen und Halbach O, Albrecht D (2006) The CNS renin-angiotensin system. *Cell Tissue Res* 326:599-616.

Wise RA (1968) Hypothalamic motivational systems: fixed or plastic neural circuits? *Science* 162(851):377-379.

Wise RA (1969) Plasticity of hypothalamic motivational systems. *Science* 165(896):929-930.

Weisinger RS, Denton DA, McKinley MJ, and Nelson JF (1985) Dehydration-induced sodium appetite in rats. *Physiol Behav* 34:45-50.

Wolf G (1964) Effect of dorsolateral hypothalamic lesions on sodium appetite elicited by desoxycorticosterone and by acute hyponatremia. *J Comp Physiol Psychol* 58:396-402.

Wolf G, Quartermain D (1967) Sodium chloride intake of adrenalectomized rats with lateral hypothalamic lesions. *Am J Physiol* 212(1):113-118.

Wright JW, Harding JW (1994) Brain angiotensin receptor subtypes in the control of physiological and behavioral responses. *Neurosci Biobehav Rev* 18(1):21-53.

Wright JW, Harding JW (1997) Important role for angiotensin III and IV in the brain renin-angiotensin system. *Brain Res Brain Res Rev* 25(1):96-124.

Wright JW, Harding JW (2004) The brain angiotensin system and extracellular matrix molecules in neural plasticity, learning, and memory. *Prog Neurobiol* 72(4):263-293.

Wright JW, Kramár EA, Meighan SE, Harding JW (2002a) Extracellular matrix molecules, long-term potentiation, memory consolidation and the brain angiotensin system. *Peptides* 23(1):221-246.

Wright JW, Reichert JR, Davis CJ, Harding JW (2002b) Neural plasticity and the brain renin-angiotensin system. *Neurosci Biobehav Rev* 26:529-552.

Wright JW, Yamamoto BJ, Harding JW (2008) Angiotensin receptor subtype mediated physiologies and behaviors: new discoveries and clinical targets. *Prog Neurobiol* 84(2):157-181.

Yang H, Lu D, Raizada MK (1997) Angiotensin II-induced phosphorylation of the AT1 receptor from rat brain neurons. *Hypertension* 30:351-357.

Yardley CP, Hilton SM (1986) The hypothalamic and brainstem areas from which the cardiovascular and behavioural components of the defence reaction are elicited in the rat. *J Auton Nerv Syst* 15:227-244.

4 Artigo #3 – Apetite ao sódio induzido por privação hídrica e imunorreatividade diferenciada ao c-Fos encefálico em ratos espontaneamente hipertensos

Daniela de T. B. Pereira¹, Regina Célia Vendramini², José V. Menani¹, Laurival A. De Luca Jr.^{1*}

¹Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia, UNESP - Universidade do Estado de São Paulo, Araraquara, São Paulo, Brasil.

²Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, São Paulo, Brasil.

*autor correspondente: L.A. De Luca Jr., Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade de Odontologia, UNESP - Universidade do Estado de São Paulo, Rua Humaitá, 1680, 14801-903, Araraquara, São Paulo, Brasil, telefone: +55 16 3301-6484, fax: +55 16 3301-6488, email: lucajr@foar.unesp.br

4.1 Agradecimentos

Os autores agradecem Silvana A. D. Malavolta pelo suporte de secretaria, Thais L. Borella, Richard B. David, Gregory A. Derderian, Silas P. Barbosa, Silvia Fógia e Reginaldo C. Queiróz pelo suporte técnico, e Ana Vítor de Oliveira pelo cuidado dos animais. Esta pesquisa recebeu apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Este artigo faz parte dos requisitos de Daniela de Toledo Borba Pereira (bolsista FAPESP #03/11268-2) para obtenção de seu título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelo convênio UFSCar/UNESP.

4.2 Resumo

Rato espontaneamente hipertenso (SHR) ingere “ad libitum” grande quantidade de NaCl em solução e esta exacerbada ingestão está relacionada ao aumento da atividade do sistema renina-angiotensina encefálico nestes animais. Ingestão de solução hipertônica de NaCl durante o teste de apetite ao sódio induzido pelo protocolo de privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP) também é dependente da ativação de receptores encefálicos de angiotensina II. O apetite ao sódio precede persistente hipovolemia, aumento da atividade de renina plasmática e expressão de c-Fos na lâmina terminal, especialmente no órgão subfornical, em ratos normotensos. No presente trabalho demonstrou-se que ratos da linhagem SHR ingere de seis a dez vezes mais solução de NaCl 0,3 M do que ratos das linhagens Wistar-Kyoto e Holtzman, respectivamente; durante o teste de apetite ao sódio que ocorre após PHRP. As respostas do SHR foram semelhantes as das linhagens normotensas com relação a concentração sérica de sódio, osmolalidade sérica, atividade de renina plasmática, ingestão de ração, balanço de sódio, excreção urinária e registro de parâmetros cardiovasculares. Ao término da PHRP, todas as linhagens analisadas apresentaram aumento do número de células expressando imunorreatividade ao c-Fos, quando comparadas aos seus respectivos estados hidratados, nas seguintes regiões encefálicas: órgão vascular da lâmina terminal, órgão subfornical (OSF), núcleo do trato solitário, área postrema, pré-locus coeruleus (pré-LC), núcleo pré-óptico mediano, núcleo supraquiasmático, núcleo central da amígdala, núcleo parabraquial e núcleo dorsal da rafe. No entanto, ao término da PHRP, os animais da linhagem SHR apresentaram maior expressão de c-Fos no OSF, pré-LC e núcleo do trato solitário caudal quando comparado com os

animais normotensos. Estes resultados sugerem que o aumento da atividade celular nestas áreas está associado com o exacerbado apetite ao sódio demonstrado pelo SHR.

Palavras-chave: desidratação, SHR, c-Fos, sede, apetite ao sódio.

4.3 Introdução

Desidratação moderada variando entre 1 a 2% de redução do volume sanguíneo está cronicamente presente em grande parte da população humana como resultado de vários fatores, incluindo desidratação voluntária, sabor da bebida, atividade física e uso de agentes diuréticos (Kleiner, 1999). A ingestão de sódio é um comportamento adaptativo à perda de água, como demonstrado, por exemplo, pelas pessoas que vivem em ambientes desérticos (Leshem et al., 2008), e por humanos e ratos mantidos em condições laboratoriais (Weisinger et al., 1985; Takamata et al., 1994; Sato et al., 1996; De Luca Jr. et al., 2002, 2007).

Ingestão de sódio elevada é, por conseguinte, uma adaptação à desidratação associada com ambiente escasso de sódio, estresse psíquico-social ou doença, devido a manutenção da capacidade de compensar a perda de volume e performance cardiovascular; no entanto, a elevada ingestão de sódio também é um comportamento não desejável quando associada com hipertensão patológica (Folkow, 1990; Epstein, 1991; Pereira et al., 2002; Fessler, 2003; De Luca Jr. et al., 2007).

Ratos normotensos das linhagens Sprague-Dawley ou Holtzman (HTZ) são modelos para o apetite ao sódio induzido por privação hídrica no protocolo privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP). Neste protocolo, o rato submetido à privação hídrica (PH) é permitido ingerir apenas água até saciar a sede durante o período de rehidratação parcial (RP). A seguir, este animal tem acesso a outra bureta contendo solução hipertônica de NaCl e a ingestão desta solução representa expressão do apetite ao sódio. Esta ingestão de sódio é precedida por balanço negativo de sódio, aumento dos níveis de angiotensina (ANG) II circulante, e ativação de receptores de

ANG II em circuitos encefálicos pré-estabelecidos, como por exemplo, na lâmina terminal (Sato et al., 1996; De Luca Jr. et al., 2002, 2007).

A expressão do gene c-Fos tem sido empregada com sucesso como marcador de atividade celular (neurônios e células da glia) e está associada às alterações do balanço hidro-eletrolítico resultantes de privação hídrica (Herrera e Robson, 1996; Gottlieb et al., 2006). Após a PHRP, é possível que o aumento da expressão de c-Fos na lâmina terminal, que ocorre no momento em que o animal inicia o teste do apetite ao sódio, reflita a atividade de células pertencentes à circuitos encefálicos que controlam o apetite ao sódio. A persistência de elevada atividade de renina plasmática (ARP), que ocorre simultaneamente ao aumento da atividade de células na lâmina terminal no início do teste do apetite ao sódio, pode estar indicando aumento na concentração de ANG II circulante; o qual permite que este peptídeo interaja com seus receptores, particularmente no órgão subfornical (OSF) (De Luca Jr. et al., 2002). A partir do OSF, sinais são aparentemente conduzidos para outras áreas relacionadas com o controle da ingestão de sódio. Por exemplo, infusão intravenosa de ANG II ativa áreas encefálicas, ativação mensurada por imunorreatividade ao c-Fos, que partem do OSF para o órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e hipotálamo (Rowland et al, 1995; McKinley et al., 2001). Além disso, lesão do OSF, OVLT ou núcleo pré-óptico mediano (MnPO) afeta a ingestão de NaCl hipertônico induzida pela ANG II (Fitts et al., 1990; De Luca Jr. et al., 1992; Morris et al., 2002).

Rato espontaneamente hipertenso (SHR), linhagem desenvolvida por Okamoto e Aoki (1963) susceptível a ocorrência espontânea de hipertensão, é um modelo animal para o estudo da hipertensão primária em humanos (Folkow, 1990). O SHR ingere diariamente mais NaCl do que ratos de linhagens normotensas, como

Holtzman (HTZ) e Wistar-Kyoto (WKY), sendo esta última geneticamente relacionada ao SHR (Catalanotto et al., 1972; McConnell e Henkin, 1973a, 1973b; Fregly, 1975; Mogenson e Morris, 1980; Bertino e Beauchamp, 1988). A exacerbada ingestão de NaCl pelo SHR é um comportamento que depende mais da hiperatividade do sistema renina-angiotensina (RAS) encefálico do que de alterações no balanço hidro-eletrolítico (Di Nicolantonio, 2004). O SHR também apresenta maior imureatividade ao c-Fos na lâmina terminal do que ratos da linhagem WKY, em resposta a ambas infusões de ANG II, sistêmica e central (Rowland et al., 1995; Lebrun et al., 1996). Então, é possível que o SHR apresente maior apetite ao sódio do que ratos de linhagens normotensas. Se isto ocorrer, pode-se prever que este maior apetite ao sódio pode estar associado ao aumento da expressão de c-Fos em áreas que facilitam circuitos encefálicos que controlam a ingestão de NaCl hipertônico. Devido ao fato de que a ingestão de sódio tem sido também relacionada com a desativação de áreas inibitórias, pode-se também prever que o SHR apresente expressão de c-Fos reduzida em áreas inibitórias, tais como núcleo parabraquial, núcleo paraventricular do hipotálamo e núcleo dorsal da raphe (Stricker e Verbalis, 1996; Cavalcante-Lima et al., 2005; David et al., 2008).

Portanto, o objetivo do presente trabalho foi investigar se ratos da linhagem SHR, comparados com ratos HTZ e WKY, apresentam diferente expressão de c-Fos encefálico e/ou apetite ao sódio associado com PHRP.

4.4 Procedimentos experimentais

4.4.1 Animais

Foram utilizados duzentos e trinta e seis ratos (280 – 320 g) das linhagens HTZ (n = 83), WKY (n = 79) e SHR (n = 95), criados no Biotério da Faculdade de Odontologia da UNESP de Araraquara, São Paulo, e com três meses de idade no início dos experimentos. Os animais foram alojados em gaiolas individuais de aço inoxidável em ambiente controlado: $23 \pm 2^\circ\text{C}$, $55 \pm 10\%$ umidade e ciclo claro-escuro de 12:12 h, com o início da fase clara às 7 h da manhã. Participaram dos experimentos apenas ratos da linhagem SHR com pressão arterial sistólica de 190 ± 10 mmHg. A pressão arterial sistólica foi mensurada através da técnica de pletismografia de cauda (Electro-Sphygmomanometer, Narco Bio-Systems) (Willians et al., 1939) em um sistema computadorizado (Codas/Dataq). Água e solução de NaCl 0,3 M ficaram disponíveis “ad libitum” em dois bebedouros de polipropileno colocados na parte da frente da gaiola, a não ser quando indicado o contrário. Os bebedouros com capacidade para 100 ml eram graduados a cada 1 ml e tampados com rolhas de borracha providas de bico de aço inoxidável. Ração granulada contendo 0,5 – 1,0% de sódio (Guabi, Paulínia, SP, Brazil) ficou disponível à vontade para consumo em um recipiente localizado na lateral de cada gaiola, a não ser quando indicado o contrário. Todos os experimentos foram iniciados, no mínimo, três dias após os animais terem sido adaptados às condições laboratoriais (período de adaptação). Os testes experimentais e as decapitações foram iniciados entre 8 e 10 h da manhã. Os protocolos foram aprovados pelo Comitê Ético Institucional de

Cuidados aos Animais (FOAr, UNESP) e as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) foram seguidas.

4.4.2 Solução

Solução hipertônica de cloreto de sódio (NaCl 0,3 M) foi feita a partir do respectivo sal (Labsynth, Diadema, SP, Brazil) dissolvido em água filtrada.

4.4.3 Histologia e imunohistoquímica

Animais destinados a imunohistoquímica foram submetidos a um episódio de PHRP após, no mínimo, cinco dias de adaptação. Imediatamente após a PH ou PHRP, os animais foram sacrificados com injeção intraperitoneal de tiopental sódico na dose de 8 mg/100 g de peso corporal (Cristália, Itapira, SP, Brazil). Controles hidratados (CONT) foram sacrificados da mesma maneira simultaneamente aos grupos PH e PHRP. Os grupos foram submetidos à perfusão transcardíaca com tampão fosfato salina (PBS) 0,1 M, pH 7,4 (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) seguida de 300 – 400 ml de paraformaldeído (PFA) 4% tamponado em PBS 0,1 M (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). Os encéfalos foram removidos do crânio, fixados em PFA 4% por 6 – 7 h e então, armazenados à 4°C em sacarose 30% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) tamponada em PBS 0,1 M. Secções coronais das áreas de interesse, de espessura de 50 µm, foram feitas utilizando-se um micrótomo de congelamento (Leica SM 2000R). Partes do encéfalo foram cortadas para localização das áreas de interesse e coradas com Giemsa. A análise da expressão de c-Fos foi focalizada na maior secção transversal de cada área. Os cortes destinados à análise da expressão

de c-Fos foram imersos por 1 h em solução aquosa com peróxido de hidrogênio 10% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e metanol 10% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil). A seguir, os cortes foram lavados em PBS 0,1 M e incubados sob agitação por 22 h à temperatura ambiente com o anticorpo primário anti-Fos (SC7202, Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). O anticorpo primário foi diluído (1:4000) em solução tamponada com PBS 0,1 M contendo soro bloqueador 4% (S1000, Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) e Triton X-100 3% (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Após a incubação com o anticorpo primário, os cortes foram lavados com PBS 0,1 M e a seguir, incubados com o anticorpo secundário biotinilado (HRP Vectastain, Elite ABC Kit, Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) tamponado em PBS 0,1 M, na proporção de 1:400; permanecendo sob agitação por 1 h à temperatura ambiente. A revelação da peroxidase foi detectada utilizando-se solução tamponada em PBS 0,1 M com peróxido de hidrogênio 30% (H1009, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) e hidrocloreto de diaminobenzidina 0,04% (D5637, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA); a qual resulta em composto insolúvel de coloração castanha. Finalmente, os cortes foram montados em lâmina gelatinizada, secos por 3 – 4 dias à temperatura ambiente, desidratados com álcool etílico (Labsynth, Diadema, SP, Brasil), clareados com xilol (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) e cobertos por lamínulas fixadas com Permount (SP15-500, Fisher Scientific, Hampton, NH, USA).

De acordo com Paxinos e Watson (2005), as áreas de interesse para detecção da expressão de c-Fos foram as seguintes: lâmina terminal (OSF, OVLT, MnPO dorsal e ventral); núcleos hipotalâmicos (supraquiasmático (NSC), supra-óptico (NSO), paraventricular (NPV) magnocelular e parvocelular); núcleo central da amígdala (NCeA); núcleo parabraquial lateral (NPBL) e medial (NPBM); pré-LC;

núcleo dorsal da rafe (NDR); área postrema (AP); e núcleo do trato solitário (NTS) caudal (cNTS), adjacente à área postrema (apNTS) e intermediário (iNTS).

As áreas de interesse para contagem de células c-Fos positivas foram localizadas no aumento de 10 X de um microscópio (BX 50, Olympus) e as fotomicrografias foram capturadas por uma câmera (DP10, Olympus) conectada a um computador, utilizando-se o software Image Pro-Plus 4.1.0.0 (Media Cybernetics, Inc., Bethesda, MD, USA).

A contagem de células c-Fos positivas foi realizada com o auxílio do software Image Pro-Plus e os resultados foram expressos como média do número de células com expressão positiva para c-Fos por 10^{-3} mm². Áreas bilaterais (NSQ, NSO, NPBL, NPBM, apNTS e iNTS) foram contadas em ambos hemisférios cerebrais, mas a fotomicrografia representativa destas áreas retrata apenas um dos hemisférios.

4.4.4 Protocolo PHRP e teste de apetite ao sódio

Os animais foram privados de água e NaCl 0,3 M, com livre acesso à ração, por 24 h (privação hídrica, PH). Logo após, a ração foi removida do recipiente lateral das gaiolas e uma bureta de vidro (provida de bico de aço inoxidável e graduada a cada 0,1 ml) contendo água foi oferecida aos animais por 2 h (período de rehidratação parcial, RP). A ingestão de água foi mensurada aos 60 e 120 min (teste de sede). Ingestão de água até saciar-se durante o RP resulta em diluição do líquido corporal e recuperação parcial do volume extracelular com aumento da ARP (De Luca Jr. et al., 2002). Após o RP, uma segunda bureta de vidro (provida de bico de aço inoxidável e graduada a cada 0,1 ml) contendo solução de NaCl 0,3 M foi

oferecida, e as ingestões de NaCl 0,3 M e água foram mensuradas aos 15, 30, 60 e 120 min (teste de apetite ao sódio).

4.4.5 Parâmetros sanguíneos e urinários

Amostras de sangue troncular foram coletadas imediatamente após a decapitação de animais privados de água por 24 h (PH), privados de água por 24 h e reidratados parcialmente por 2 h (PHRP), e hidratados (CONT). As amostras foram coletadas em tubos contendo gel separador (SST, Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) e centrifugadas a 2500 rpm por 10 min à temperatura ambiente para obtenção de soro. A concentração sérica de sódio e potássio foi determinada em eletrodo íon-específico (ISE AVL 9180, Medical Instruments) por potenciometria (Maas et al., 1983). Proteína total sérica foi determinada em refratômetro (Atago), e a osmolalidade sérica em osmômetro (Digimatic 3D2, Advanced Instruments) por diminuição do ponto de congelamento (Doward e Chalmers, 1975).

Amostras de sangue troncular dos mesmos animais também foram coletadas em tubos pré-refrigerados (4°C) contendo EDTA (2 mg/ml de sangue) (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) e centrifugadas a 3000 rpm por 30 min à 4°C para obtenção de plasma, no qual ARP foi determinada por radioimunoensaio (Renin-Maia[®] kit, Serono Diagnostics S.A., Coinsins, Switzerland).

Amostras de urina foram coletadas em tubos de polipropileno graduados a cada 0,1 ml, no qual o volume urinário (UV) foi mensurado. Osmolalidade (UOsmol) e concentração de sódio e potássio urinária foram determinadas como descrito anteriormente. A quantidade total de sódio (UNaV) e potássio (UKV) excretados na urina foram inferidas pelo produto do UV pela concentração de cada íon na urina.

4.4.6 Parâmetros cardiovasculares

Os animais foram anestesiados com uma solução contendo ketamina (80 mg/kg de peso corporal) (União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) (União Química, Embu-Guaçu, SP, Brasil). Esta solução foi injetada na dose de 0.12 ml/100 g de peso corporal, por rato, para indução de anestesia. Um cateter foi inserido na artéria femoral esquerda e a outra extremidade do mesmo seguiu pelo espaço subcutâneo, sendo exteriorizada no dorso do animal e atada neste ponto. O cateter foi gentilmente conectado a um transdutor de pressão (P-1000B Narco) acoplado a um sistema de registro computadorizado (Narcotrace 40, Narco Bio-System). Pressão arterial média (PAM) foi registrada diretamente da aorta abdominal em animais não anestesiados e a frequência cardíaca (FC) foi registrada a partir do sinal de pulso da pressão arterial.

Dois dias após o período de adaptação, os animais (Experimento 2a) foram removidos de gaiolas metabólicas para caixas plásticas de polipropileno para o registro da PAM e FC em animais hidratados. O registro da PAM e respectiva FC foram considerados para análise após o registro basal, ou seja, quando a PAM permaneceu a mesma por pelo menos 5 min de registro contínuo. A seguir, os animais foram retornados para as gaiolas metabólicas, aonde permaneceram pelas próximas 24 h com apenas ração disponível, ou seja, privados de água e NaCl 0,3 M. Após a PH, cada animal foi colocado novamente em uma caixa plástica para o registro da PAM e FC em animais privados.

4.4.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Análise de variância (ANOVA) de um ou dois fatores com medidas repetidas ou não-repetidas foi realizada nos resultados para comparar expressão de c-Fos, ingestão cumulativa, excreção urinária e parâmetros sanguíneos entre linhagens (um fator) ou entre linhagens e tempo ou tratamento (dois fatores). A significância das interações foi testada, posteriormente à ANOVA, com o emprego do teste Student Newman Keuls. Teste “t” de Student foi utilizado para avaliar a significância das interações entre duas linhagens. O nível de significância foi fixado em $P < 0,05$ para ambos os testes.

4.4.8 Experimento 1. Expressão de c-Fos em ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR submetidos ao protocolo PHRP.

Imunohistoquímica foi verificada em três grupos: ratos hidratados (CONT), ou submetidos à privação hídrica (PH) ou privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP) das três linhagens, totalizando nove grupos ($n = 6-11$ animais por grupo). A expressão de c-Fos foi analisada nas áreas de interesse mencionadas anteriormente, em cada um dos nove grupos.

4.4.9 Experimento 2. Apetite ao sódio induzido por privação hídrica em SHR.

4.4.9.1 Experimento 2a. Comparação entre as linhagens HTZ, WKY e SHR.

Um grupo de animais (n = 12-19 por linhagem) foi submetido à PHRP, e a seguir, teste de apetite ao sódio. Em alguns destes animais (n = 7 por linhagem) registraram-se os parâmetros cardiovasculares (PAM e FC) e determinou-se os parâmetros urinários após 24 h de PH.

Noutro grupo de animais (n = 18-27 por linhagem), os parâmetros sanguíneos foram determinados nos três grupos: CONT, PH ou PHRP e nas três linhagens, totalizando nove grupos.

4.4.9.2 Experimento 2b. Comparação entre as linhagens HTZ e SHR.

Este experimento foi realizado para avaliar o balanço de sódio antes do teste de apetite ao sódio. Animais das linhagens HTZ (n = 7) e SHR (n = 7) foram colocados em gaiolas metabólicas e após o período de adaptação, ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M, água e ração em pó, coleta de urina de 24 h e determinação dos parâmetros urinários foram realizados por três dias consecutivos. No terceiro dia, massagem pélvica foi realizada para evitar retenção de urina, e todos os animais, de ambas as linhagens, foram privados de água e NaCl 0,3 M (PH) por 24 h. Após a PH, massagem pélvica foi novamente realizada, urina de 24 h foi coletada, os parâmetros urinários determinados, e a ração em pó foi removida e sua ingestão quantificada. A seguir, os animais foram reidratados parcialmente por 2 h, a ingestão de água e o UV foram mensurados, e os parâmetros urinários determinados em ambas linhagens. O balanço de sódio foi calculado para as seguintes condições: CONT, PH e PHRP em HTZ e SHR.

4.5 Resultados

4.5.1 Experimento 1. Protocolo PHRP: análise da expressão de c-Fos das linhagens HTZ, WKY e SHR.

A principal diferença entre linhagens referente a imunorreatividade à proteína Fos (Fos-ir) (células c-Fos positivas/ 10^{-3} mm²) ocorreu ao término da PHRP, ou seja, antes do teste de apetite ao sódio. Neste momento, ratos da linhagem SHR apresentaram maior Fos-ir no OSF, pré-LC e cNTS comparados àqueles das linhagens WKY e HTZ (OSF: linhagem, $F_{2,80}=4,4$, grupo, $F_{2,72}=37,2$, linhagem vs. grupo, $F_{4,72}=33,7$, $P<0,05$; pré-LC: linhagem, $F_{2,79}=5,4$, grupo, $F_{2,71}=21,6$, linhagem vs. grupo, $F_{4,71}=6,3$, $P<0,05$; cNTS: linhagem, $F_{2,79}=4,6$, grupo, $F_{2,71}=16,9$, linhagem vs. grupo, $F_{4,71}=3,8$; $P<0,05$) (Figs. 1 e 2).

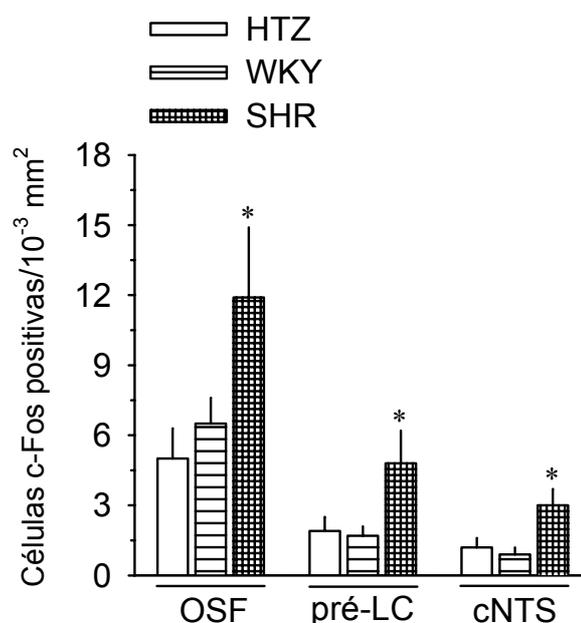
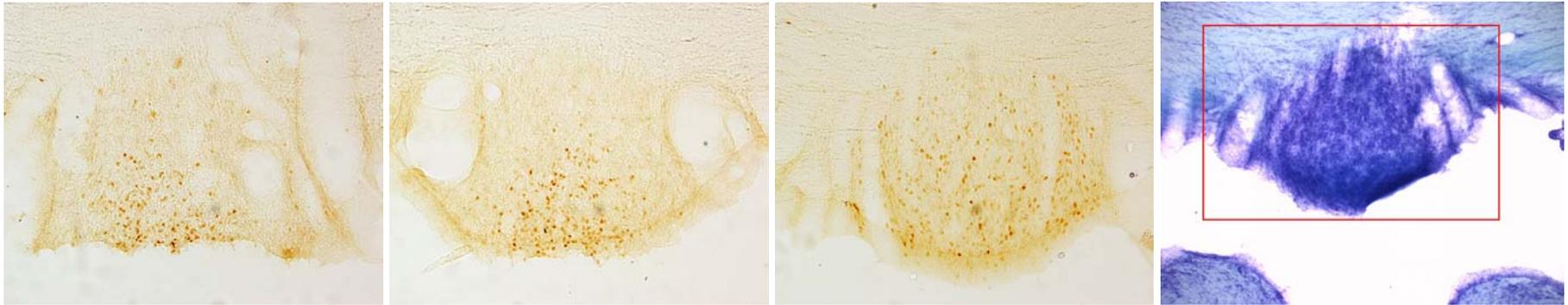
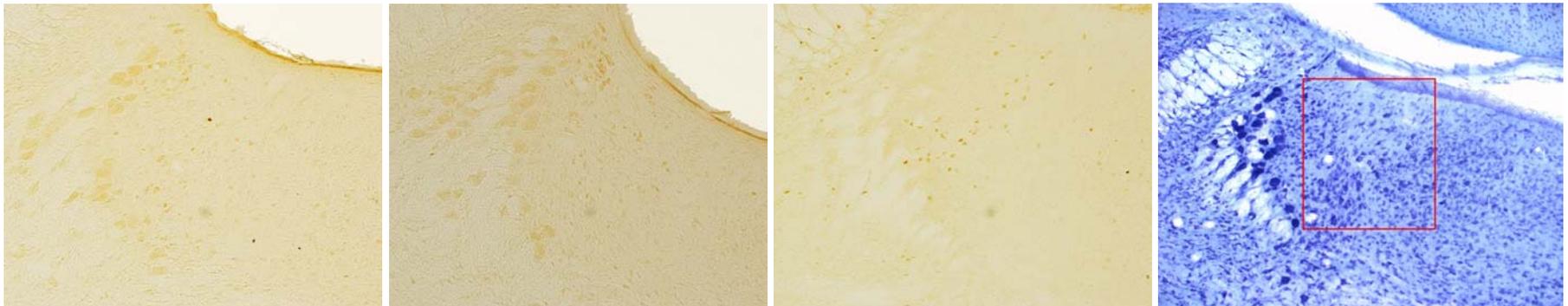


Figura 1. Imunohistoquímica para expressão de c-Fos em células do OSF, pré-LC e cNTS de ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR ao término da PHRP. * $P<0,05$ vs. HTZ e WKY, $n = 7-11$ por área e linhagem.

OSF



pré-LC



cNTS

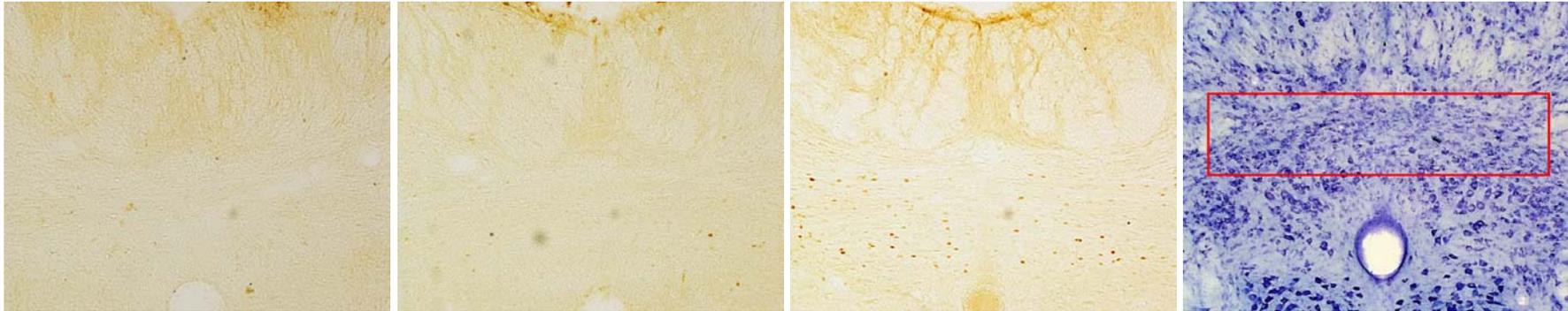


Figura 2. Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de ratos das linhagens HTZ (a esquerda), WKY (ao centro) e SHR (a direita) correspondentes aos resultados da Figura 1, mostrando expressão representativa de c-Fos no OSF (1ª fileira), pré-LC (2ª fileira), e cNTS (3ª fileira) ao término da PHRP. Cada fotomicrografia a extrema direita indica a área encefálica em questão corada com Giemsa que corresponde à respectiva secção coronal da área seleccionada para a análise da expressão de c-Fos.

A PH induziu aumento da Fos-ir na lâmina terminal (OSF, OVLT, MnPO) de todas as linhagens comparadas aos seus respectivos grupos CONT (animais hidratados) (OVLT: grupo, $F_{2,69}=83,7$, $P<0,05$, linhagem, $F_{2,77}=0,3$, linhagem vs. grupo, $F_{4,69}=0,9$; MnPO dorsal: grupo, $F_{2,68}=21,4$, $P<0,05$, linhagem, $F_{2,76}=1,5$, linhagem vs. grupo, $F_{4,68}=0,4$; MnPO ventral: grupo, $F_{2,70}=43,5$, $P<0,05$, linhagem, $F_{2,78}=0,6$, linhagem vs. grupo, $F_{4,70}=0,1$) (Figs. 3 e 4). No OSF, o aumento de Fos-ir induzido pela PH foi acentuado pela PHRP nas três linhagens ($P<0,05$) (Fig. 3A), no entanto o maior incremento foi observado em ratos da linhagem SHR ($P<0,05$) (Figs. 1 e 2). A PHRP não alterou a Fos-ir no OVLT de SHR e HTZ e também no MnPO das três linhagens comparados aos seus respectivos grupos PH (Figs. 3B, 3C e 3D). No entanto, houve aumento da expressão de c-Fos na linhagem WKY após a PHRP comparado com WKY PH ($P<0,05$) (Fig. 3B).

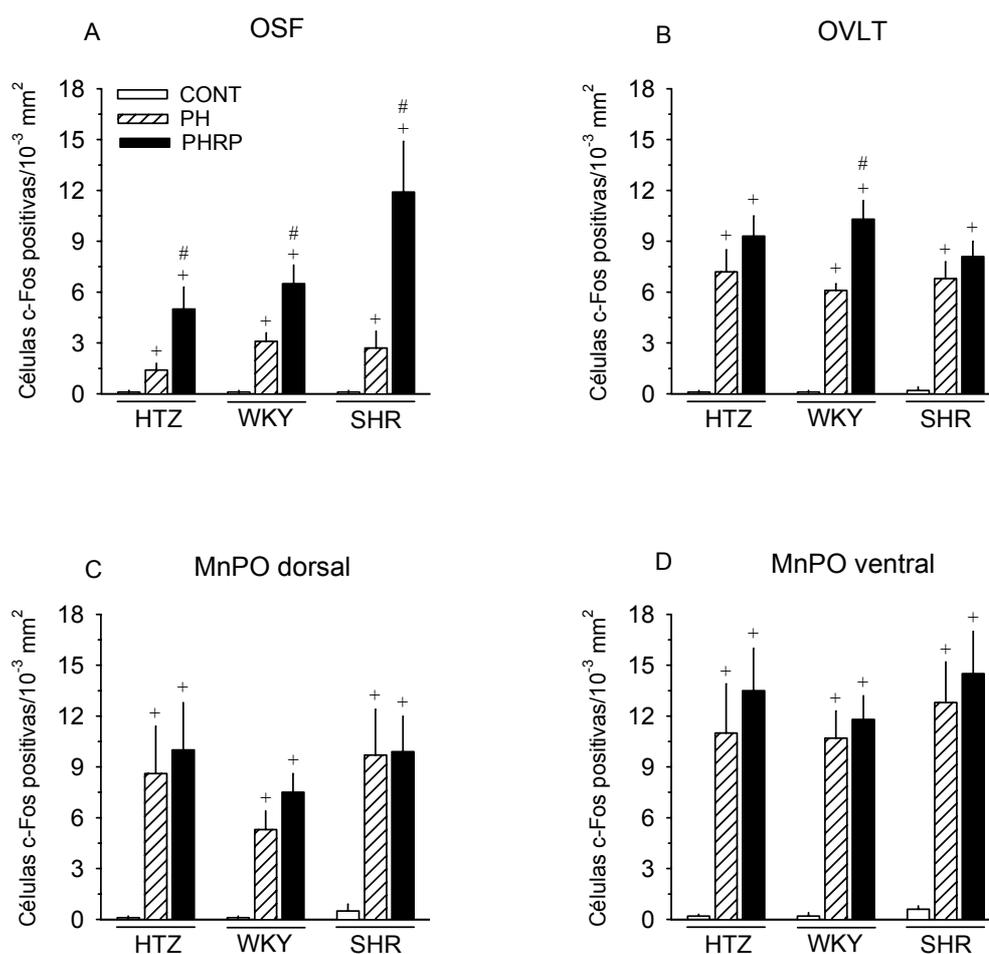
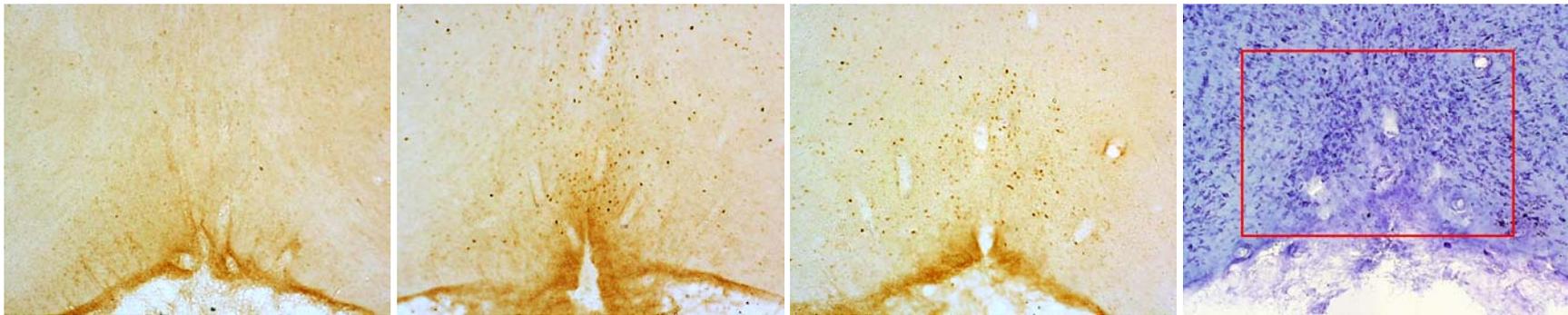


Figura 3. Imunohistoquímica para expressão de c-Fos em células do OSF (A), OVLT (B), MnPO dorsal (C) e ventral (D) de ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR hidratados (CONT), ou submetidos à privação hídrica (PH) ou privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP). + P < 0,05 vs. CONT, # P < 0,05 vs. PH, n = 7-11 por linhagem e grupo.

OSF



OVL



MnPO dorsal



MnPO ventral

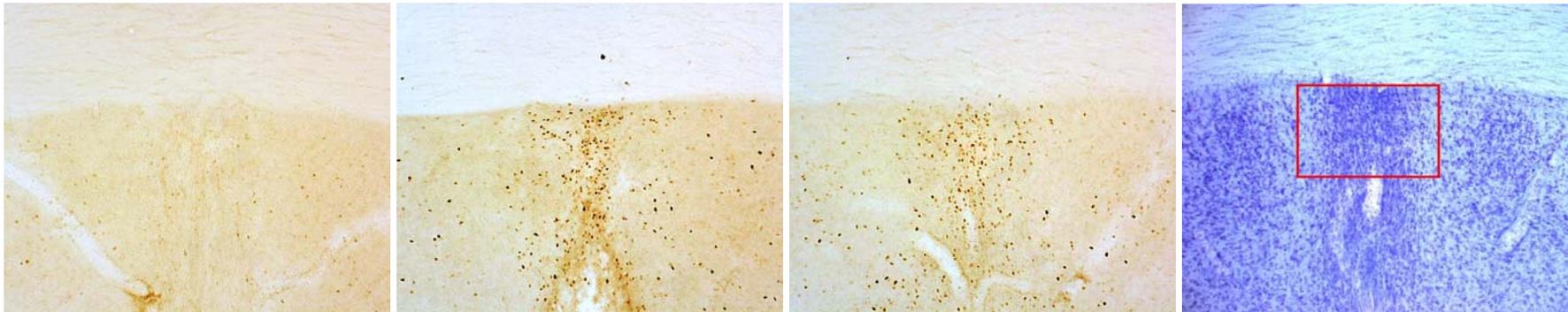


Figura 4. Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de ratos correspondentes aos resultados da Figura 3, mostrando expressão representativa de c-Fos no OSF (1^a fileira), OVLT (2^a fileira), e MnPO dorsal (3^a fileira) e ventral (4^a fileira) de ratos da linhagem SHR CONT (a esquerda), ou submetidos à PH (ao centro) ou PHRP (a direita). Cada fotomicrografia a extrema direita indica a área encefálica em questão corada com Giemsa que corresponde à respectiva secção coronal da área seleccionada para a análise da expressão de c-Fos.

Privação hídrica induziu aumento da Fos-ir nas subdivisões parvo e magnocelulares do NPV de ratos das linhagens HTZ e SHR quando comparados com seus respectivos grupos CONT (PVN parvocelular: linhagem, $F_{2,78}=7,1$, grupo, $F_{2,70}=6,8$, linhagem vs. grupo, $F_{4,70}=3,6$, $P<0,05$; PVN magnocelular: linhagem, $F_{2,78}=9,7$, grupo, $F_{2,70}=11,3$, linhagem vs. grupo, $F_{4,70}=4,5$; $P<0,05$) (Figs. 5A, 5B e 6). A PHRP reduziu a Fos-ir na subdivisão magnocelular, fazendo com que a expressão de c-Fos retornasse ao nível controle em ratos da linhagem HTZ e SHR ($P<0,05$) (Fig. 5B), e na linhagem SHR, a PHRP reduziu a Fos-ir, da mesma maneira, na subdivisão parvocelular ($P<0,05$) (Fig. 5A). No entanto, em ratos da linhagem WKY a PH não alterou a Fos-ir em ambas as subdivisões do NPV quando comparado às linhagens HTZ e SHR (Figs. 5A e 5B); além disso, um pequeno aumento da Fos-ir no NPV parvocelular foi induzido pela PHRP nesta mesma linhagem ($P<0,05$) (Fig. 5A). A PH induziu aumento da Fos-ir no NSO de todas as linhagens e este aumento foi mais pronunciado nos ratos das linhagens HTZ e SHR (linhagem, $F_{2,76}=8,7$, grupo, $F_{2,68}=45,1$, linhagem vs. grupo, $F_{4,68}=70,1$; $P<0,05$) (Figs. 5C e 6). No entanto, a PHRP reverteu o aumento da expressão de c-Fos induzido pela PH ao nível controle nas três linhagens ($P<0,05$) (Fig. 5C). No NSQ, a PH não alterou Fos-ir, mas a PHRP aumentou da expressão de c-Fos em ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR (grupo, $F_{2,58}=28,5$, $P<0,05$, linhagem, $F_{2,66}=0,1$, linhagem vs. grupo, $F_{4,58}=0,5$) (Figs. 5D e 6).

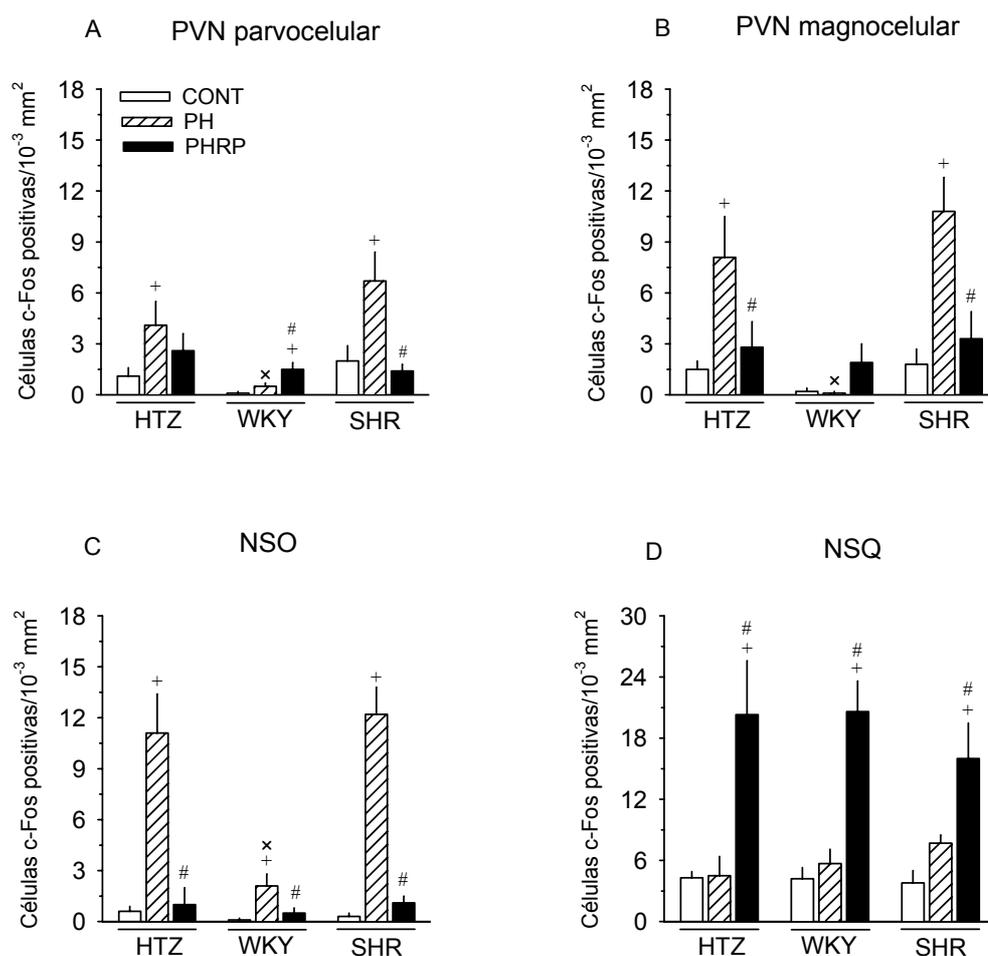
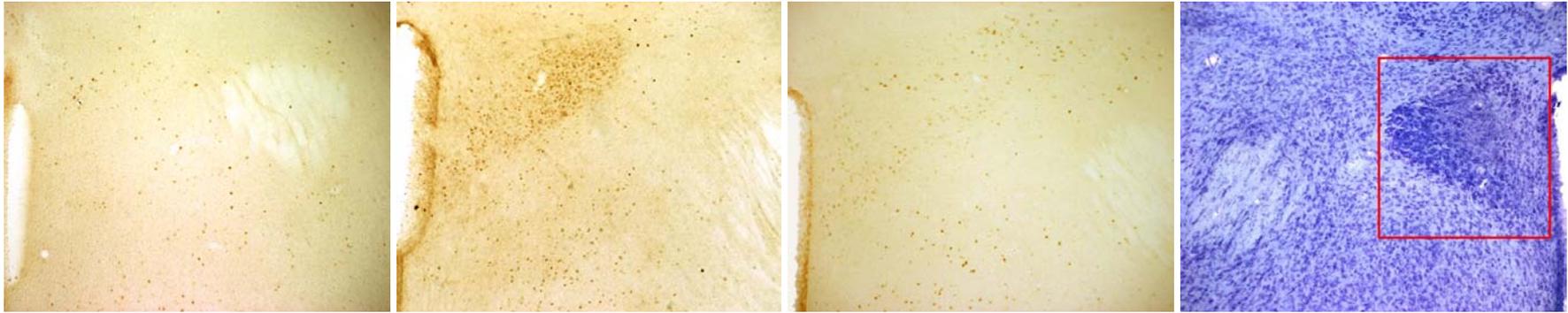
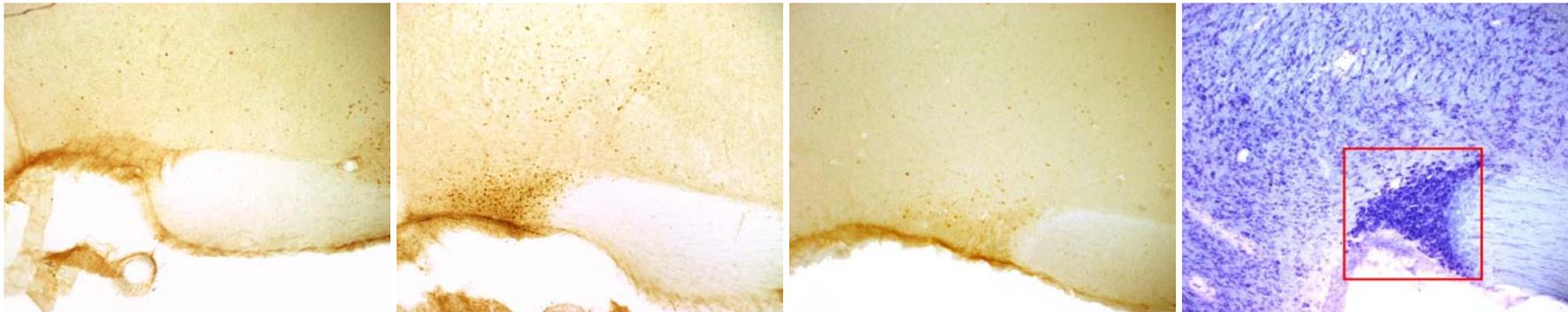


Figura 5. Imunohistoquímica para expressão de c-Fos em células do NPV parvocelular (A) e magnocelular (B), NSO (C) e NSQ (D) de ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR hidratados (CONT), ou submetidos à privação hídrica (PH) ou privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP). + P < 0,05 vs. CONT, # P < 0,05 vs. PH, × P < 0,05 vs. HTZ e SHR, n = 6-11 por linhagem e grupo.

NPV



NSO



NSQ

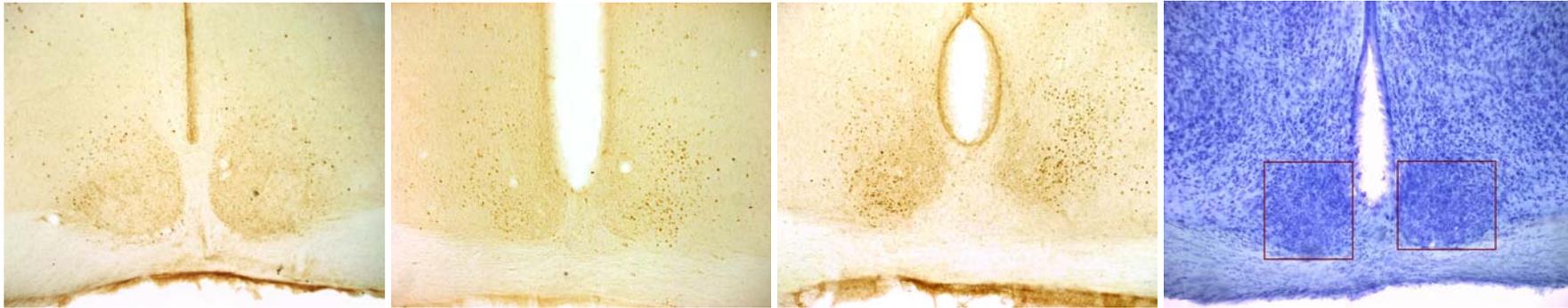


Figura 6. Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de ratos correspondentes aos resultados da Figura 5, mostrando expressão representativa de c-Fos no NPV (1^a fileira), NSO (2^a fileira), e NSQ (3^a fileira) de ratos da linhagem HTZ CONT (a esquerda), ou submetidos à PH (ao centro) ou PHRP (a direita). Cada fotomicrografia a extrema direita indica a área encefálica em questão corada com Giemsa que corresponde à respectiva secção coronal da área selecionada para a análise da expressão de c-Fos.

A PH não alterou a Fos-ir no NCeA, NPBL e NPBM das três linhagens comparadas aos seus respectivos grupos CONT (Fig. 7). A PHRP induziu aumento da Fos-ir no NCeA de todas as linhagens comparadas aos seus respectivos grupos CONT e PH ($P < 0,05$) (Fig. 7A); exceto SHR, cuja expressão de c-Fos no NCeA foi semelhante entre os grupos SHR PH e PHRP (linhagem, $F_{2,76}=6,2$, grupo, $F_{2,68}=28,3$, linhagem vs. grupo, $F_{4,68}=16,8$; $P < 0,05$) (Fig. 8). A expressão de c-Fos no NCeA de ratos da linhagem SHR após PH foi maior do que a das linhagens HTZ e WKY ($P < 0,05$) (Fig. 7A). No NPBL, a PHRP aumentou a Fos-ir em todas as três linhagens (Fig. 8) comparados com seus respectivos grupos CONT e PH (grupo, $F_{2,71}=22,7$, $P < 0,05$, linhagem, $F_{2,79}=1,8$, linhagem vs. grupo, $F_{4,71}=0,5$) (Fig. 7B). No NPBM, a PHRP induziu aumento da Fos-ir apenas nos ratos da linhagem SHR quando comparado com seu respectivo grupo CONT (linhagem, $F_{2,79}=4,6$, grupo, $F_{2,71}=6,4$, $P < 0,05$, linhagem vs. grupo, $F_{4,71}=0,3$) (Figs. 7C e 8).

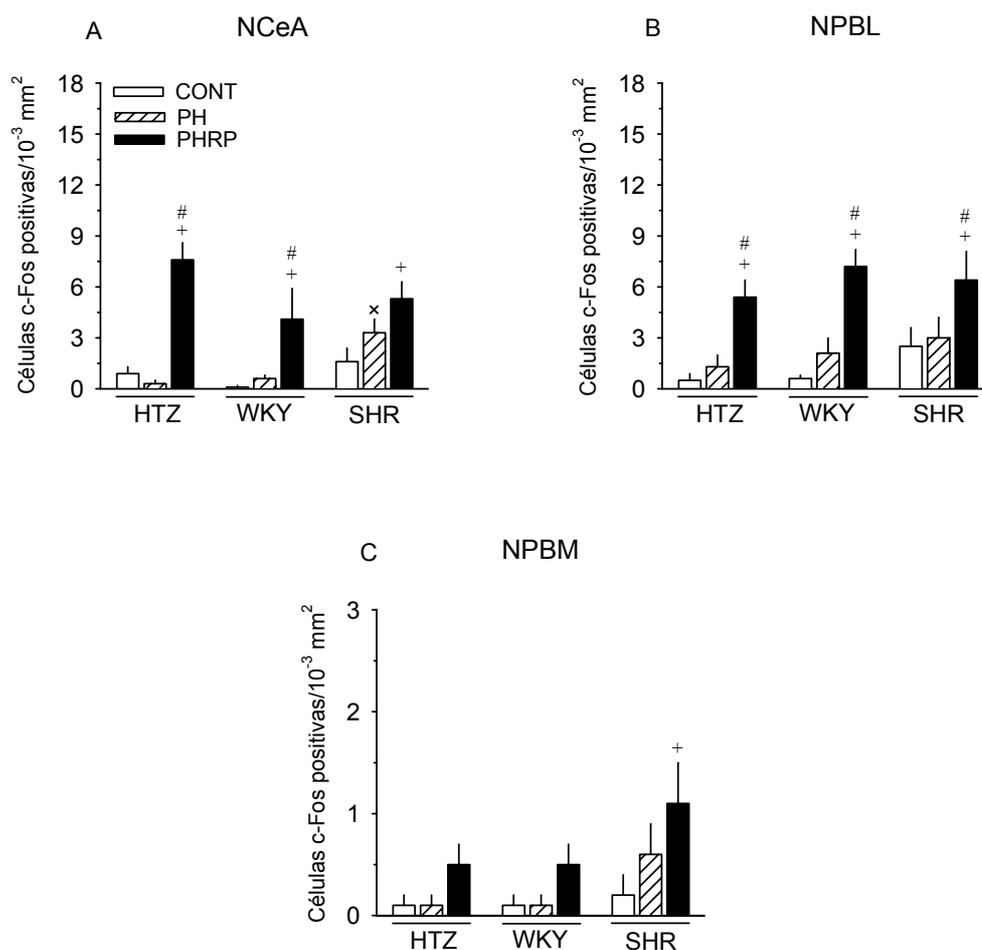


Figura 7. Imunohistoquímica para expressão de c-Fos em células do NCeA (A), NPBL (B) e NPBM (C) de ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR hidratados (CONT), ou submetidos à privação hídrica (PH) ou privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP). ⁺ P<0,05 vs. CONT, [#] P<0,05 vs. PH, ^x P<0,05 vs. HTZ e SHR, n = 6-11 por linhagem e grupo.

NCeA



NPBL e NPBM

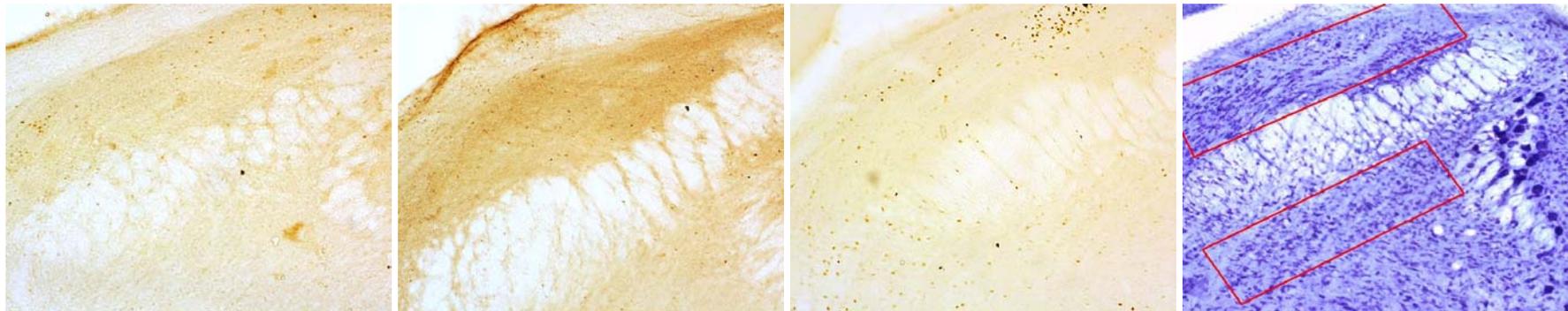


Figura 8. Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de ratos correspondentes aos resultados da Figura 7, mostrando expressão representativa de c-Fos no NCeA (1ª fileira), e NPBL e NPBM (2ª fileira) de ratos da linhagem SHR CONT (a esquerda), ou submetidos à PH (ao centro) ou PHRP (a direita). Cada fotomicrografia a extrema direita indica a área encefálica em questão corada com Giemsa que corresponde à respectiva secção coronal da área selecionada para a análise da expressão de c-Fos.

A expressão de c-Fos no NTS de todas as linhagens não foi alterada pela PH (Fig. 9). A PHRP aumentou a Fos-ir no NTS das três linhagens ($P < 0,05$) (Fig. 10), exceto no cNTS de ratos da linhagem WKY (apNTS: grupo, $F_{2,58}=28,9$, linhagem vs. grupo, $F_{4,58}=2,6$, $P < 0,05$, linhagem, $F_{2,66}=2,4$; iNTS: linhagem, $F_{2,64}=4,2$, grupo, $F_{2,56}=43,9$, $P < 0,05$, linhagem vs. grupo, $F_{4,56}=0,7$; $P < 0,05$) (Fig. 9). Considerando as subdivisões do NTS, a PHRP aumentou a Fos-ir no apNTS e iNTS de todas as linhagens comparadas com seus respectivos grupos CONT e PH ($P < 0,05$) (Figs. 9B e 9C). A PHRP também aumentou a Fos-ir no cNTS dos ratos das linhagens HTZ e SHR ($P < 0,05$) (Figs. 9A e 10), e este aumento foi mais pronunciado na linhagem SHR ($P < 0,05$) (Figs. 1 e 2). Entretanto, a PHRP não alterou a expressão de c-Fos no cNTS de ratos da linhagem WKY (Fig. 9A). O grupo SHR hidratado (CONT) também apresentou maior expressão de c-Fos no iNTS comparado ao grupo WKY na mesma condição ($P < 0,05$) (Fig. 9C).

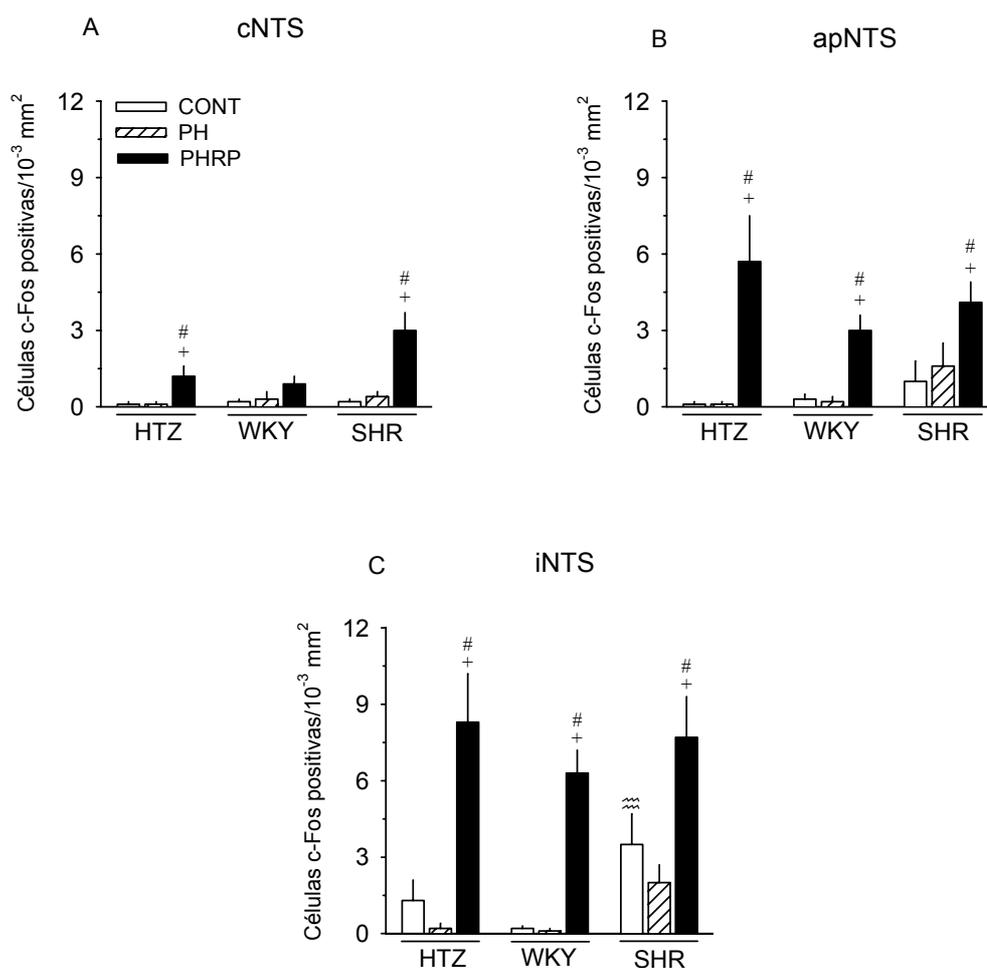
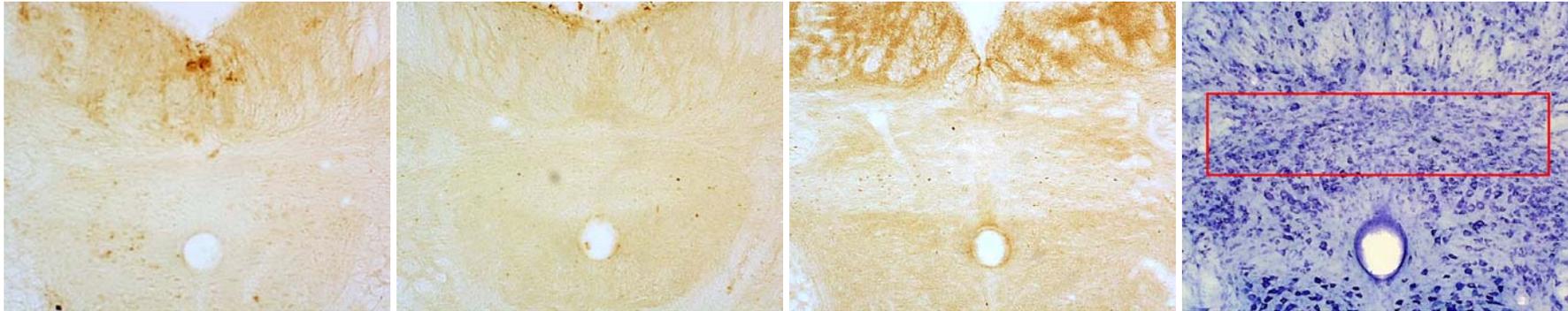
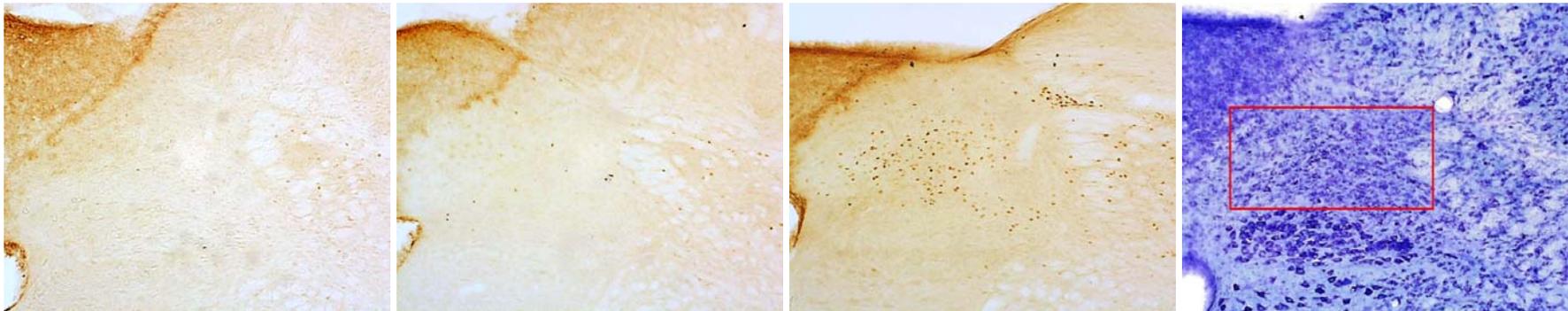


Figura 9. Imunohistoquímica para expressão de c-Fos em células do cNTS (A), apNTS (B) e iNTS (C) de ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR hidratados (CONT), ou submetidos à privação hídrica (PH) ou privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP). + $P < 0,05$ vs. CONT, # $P < 0,05$ vs. PH, ≏ $P < 0,05$ vs. WKY, $n = 6-11$ por linhagem e grupo.

cNTS



apNTS



iNTS

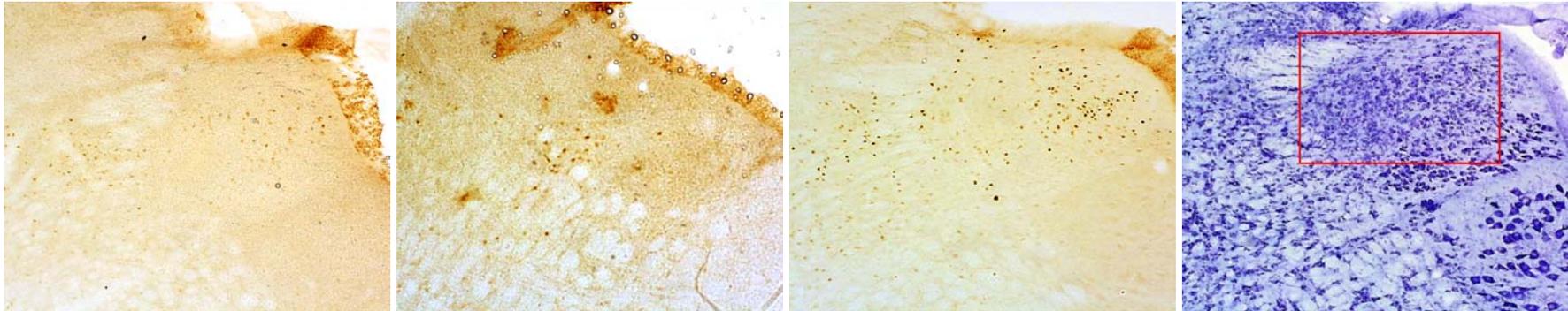


Figura 10. Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de ratos correspondentes aos resultados da Figura 9, mostrando expressão representativa de c-Fos no cNTS (1^a fileira), apNTS (2^a fileira), e iNTS (3^a fileira) de ratos da linhagem SHR CONT (a esquerda), ou submetidos à PH (ao centro) ou PHRP (a direita). Cada fotomicrografia a extrema direita indica a área encefálica em questão corada com Giemsa que corresponde à respectiva secção coronal da área selecionada para a análise da expressão de c-Fos.

A PH não alterou a Fos-ir no pré-LC, AP e NDR de todas as linhagens (Fig. 11). A PHRP induziu Fos-ir no pré-LC, AP e NDR de ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR (Fig. 12) comparadas com seus respectivos grupos CONT e PH ($P < 0,05$) (Fig. 11), com exceção da expressão de c-Fos no NDR dos ratos da linhagem SHR que foi aumentada pela PHRP quando comparada apenas ao seu respectivo grupo PH (AP: grupo, $F_{2,56}=39,4$, $P < 0,05$, linhagem, $F_{2,64}=2,5$, linhagem vs. grupo, $F_{4,56}=0,6$; NDR: grupo, $F_{2,64}=12,9$, $P < 0,05$, linhagem, $F_{2,72}=1,0$, linhagem vs. grupo, $F_{4,64}=0,08$) (Figs. 11 e 12). A Fos-ir no pré-LC induzida pela PHRP foi maior nos ratos da linhagem SHR do que nos das demais linhagens ($P < 0,05$) (Figs. 1 e 2).

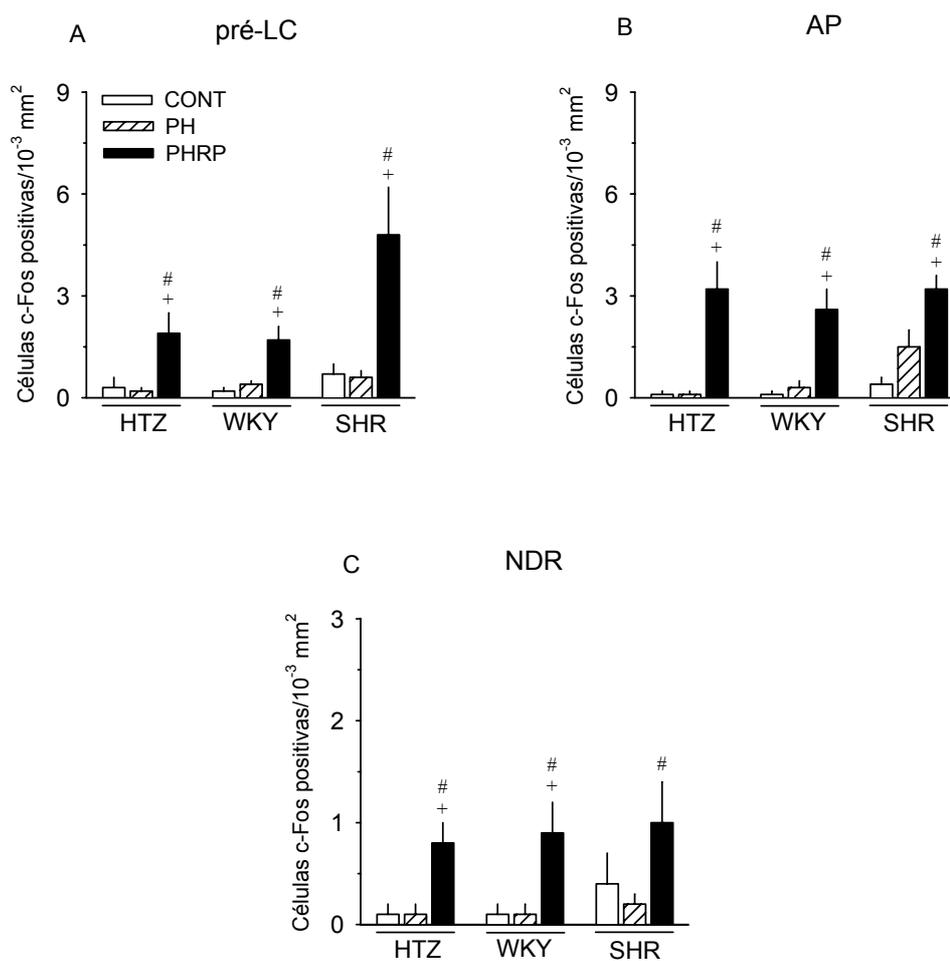
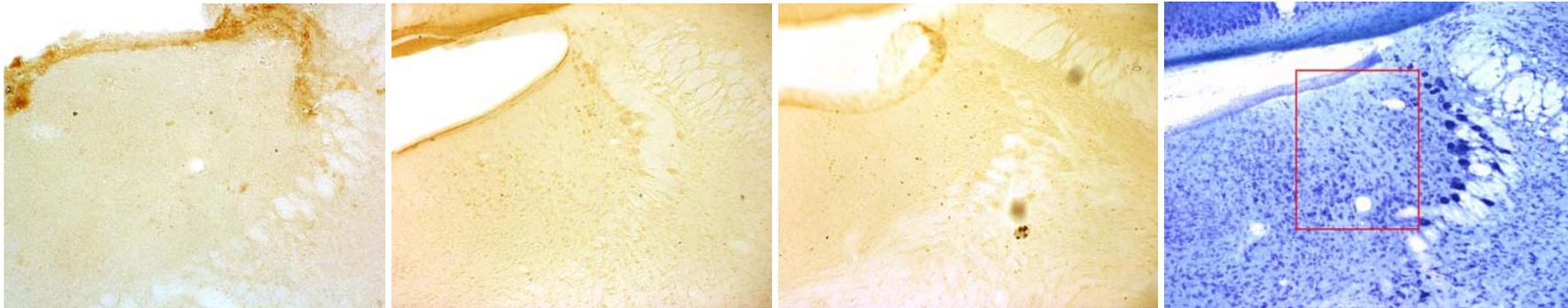
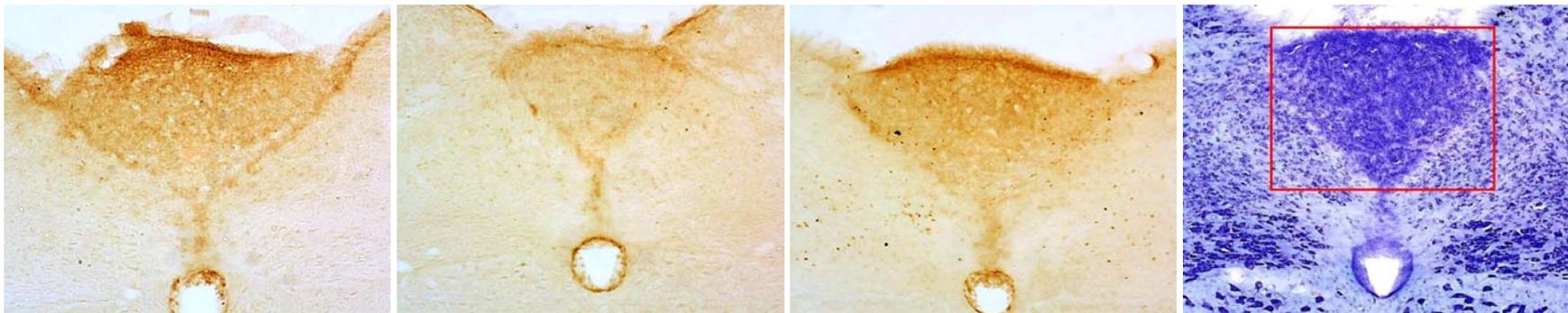


Figura 11. Imunohistoquímica para expressão de c-Fos em células do pré-LC (A), AP (B) e NDR (C) de ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR hidratados (CONT), ou submetidos à privação hídrica (PH) ou privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP).
 + P < 0,05 vs. CONT, # P < 0,05 vs. PH, n = 6-11 por linhagem e grupo.

pré-LC



AP



NDR

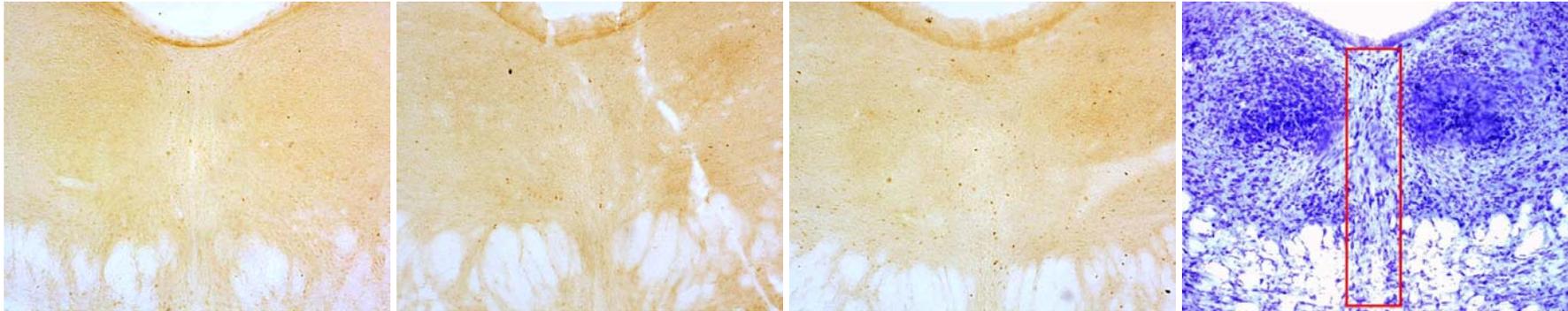


Figura 12. Fotomicrografias de secções coronais do encéfalo de ratos correspondentes aos resultados da Figura 11, mostrando expressão representativa de c-Fos no pré-LC (1^a fileira), AP (2^a fileira), e NDR (3^a fileira) de ratos da linhagem SHR CONT (a esquerda), ou submetidos à PH (ao centro) ou PHRP (a direita). Cada fotomicrografia a extrema direita indica a área encefálica em questão corada com Giemsa que corresponde à respectiva secção coronal da área seleccionada para a análise da expressão de c-Fos.

4.5.2 Experimento 2. Apetite ao sódio induzido por privação hídrica em SHR.

4.5.2.1 Experimento 2a. Comparações entre as linhagens HTZ, WKY e SHR.

4.5.2.1.1 Desempenho das linhagens durante o teste de sede e apetite ao sódio.

Ratos da linhagem SHR ingeriram 20% menos água durante o PR comparados aos das linhagens HTZ e WKY (linhagem, $F_{2,92}=7,0$, $P<0,05$, tempo, $F_{2,97}=0,1$, linhagem vs. tempo, $F_{2,92}=0,04$) (Fig. 13). Ao longo do teste de apetite ao sódio (15, 30, 60 e 120 min), ratos da linhagem SHR ingeriram 10 vezes mais NaCl 0,3 M do que ratos da linhagem HTZ e 6 vezes mais do que WKY (linhagem, $F_{2,184}=106,3$, tempo, $F_{3,195}=4,1$, linhagem vs. tempo, $F_{6,184}=2,4$; $P<0,05$) (Fig. 14A). A ingestão de água, secundária à de NaCl 0,3 M, aos 60 e 120 min do teste de apetite ao sódio também foi maior nos ratos da linhagem SHR do que naqueles das linhagens HTZ e WKY (linhagem, $F_{2,184}=43,6$, tempo, $F_{2,195}=9,1$, linhagem vs. tempo, $F_{2,184}=7,3$; $P<0,05$) (Fig. 14B).

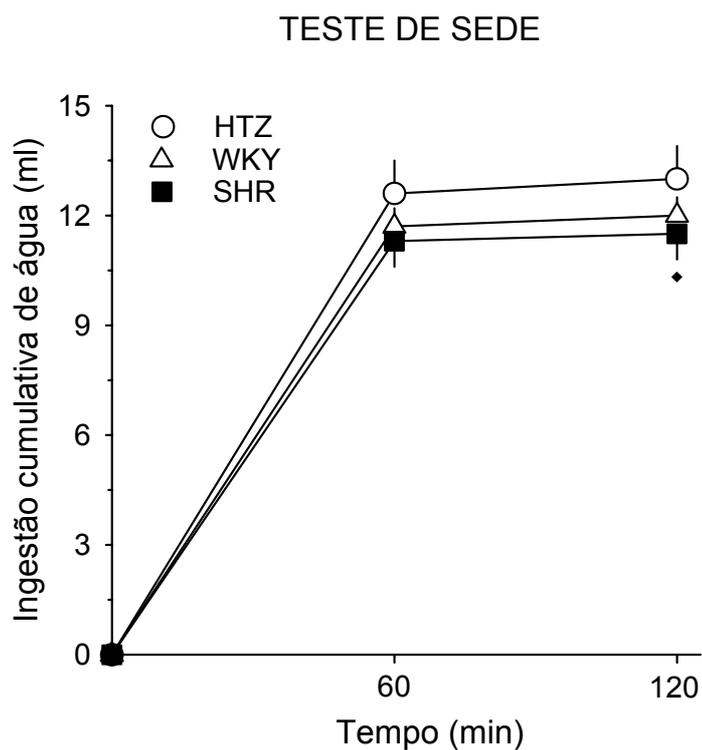


Figura 13. Ingestão cumulativa de água em ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR, durante teste de sede (período de rehidatação parcial) que ocorreu após 24 h de privação hídrica e antecedeu o teste do apetite ao sódio. ♦ $P < 0,05$ vs. HTZ, $n = 12-19$ por linhagem.

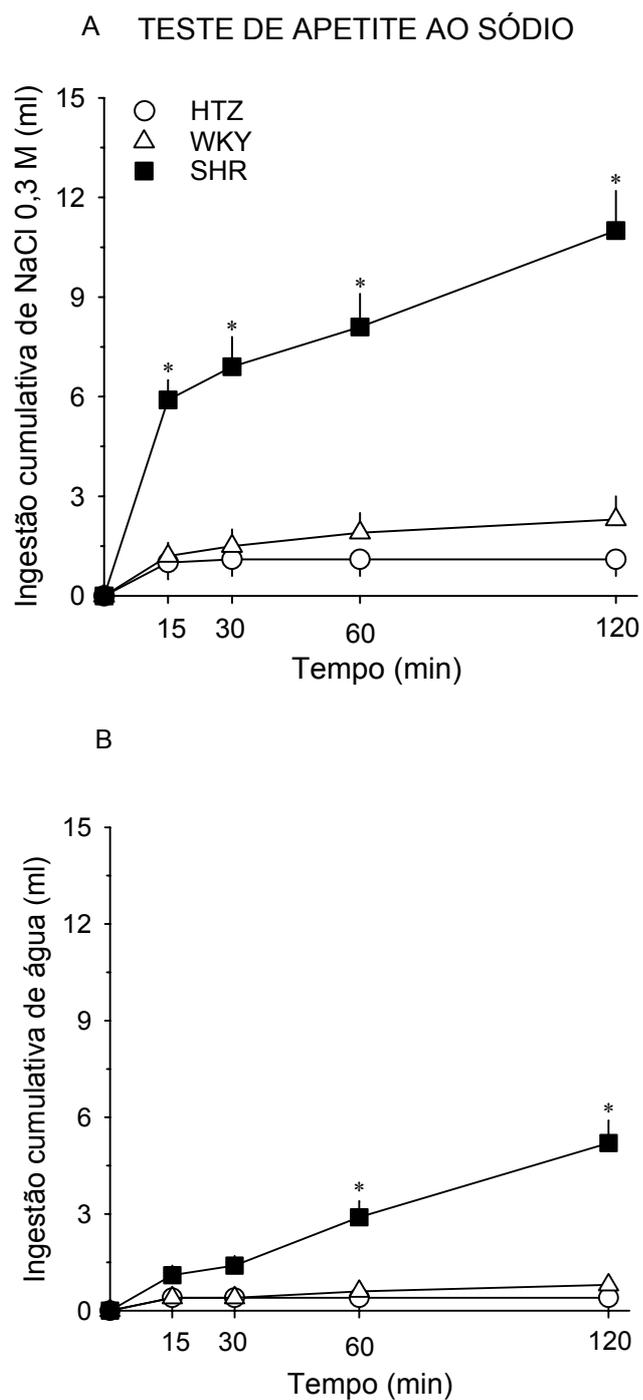


Figura 14. Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B) em ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR durante o teste de apetite ao sódio que ocorreu logo após PHRP (mesmos animais da Figura 13). * $P < 0,05$ vs. HTZ e WKY, $n = 12-19$ por linhagem.

4.5.2.1.2 Determinação dos parâmetros sanguíneos.

Em todas as linhagens, a PH induziu hipernatremia ($S[Na^+]$), hiperproteinemia ($S[tP]$), hiperosmolalidade ($SOsmol$) e aumento da ARP ($S[Na^+]$: grupo, $F_{2,69}=101,8$, linhagem vs. grupo, $F_{4,69}=4,0$, $P<0,05$, linhagem, $F_{2,77}=0,4$; $S[tP]$: linhagem, $F_{2,77}=28,4$, grupo, $F_{2,69}=58,2$, $P<0,05$, linhagem vs. grupo, $F_{4,69}=0,8$; $SOsmol$: grupo, $F_{2,81}=48,8$, linhagem vs. grupo, $F_{4,81}=6,1$, $P<0,05$, linhagem, $F_{2,88}=2,9$; ARP: linhagem, $F_{2,62}=6,0$, grupo, $F_{2,36}=54,9$, linhagem vs. grupo, $F_{4,36}=4,5$; $P<0,05$) (Tabela 1). O principal achado na determinação de parâmetros sanguíneos deu-se antes do teste do apetite ao sódio. Nas três linhagens, a PHRP induziu hiponatremia, hiposmolalidade e hiperproteinemia. Além disso, a PHRP aumentou ainda mais a elevada ARP, induzida pela PH, nos ratos das linhagens HTZ e WKY, mas não nos da linhagem SHR ($P<0,05$) (Tabela 1). A calemia ($S[K^+]$) não foi alterada pela PH ou PHRP em todas as linhagens (linhagem, $F_{2,77}=5,8$, $P<0,05$, grupo, $F_{2,69}=1,4$, linhagem vs. grupo, $F_{4,69}=0,4$) (Tabela 1).

No estado hidratado (CONT), ratos da linhagem SHR apresentaram hipercalemia comparados aos da linhagem HTZ ($P<0,05$) (Tabela 1). A PH induziu maior $SOsmol$ em ratos das linhagens SHR e HTZ comparados ao WKY, e maior ARP em SHR comparado ao HTZ ($P<0,05$) (Tabela 1). Após a PHRP, ratos da linhagem SHR apresentaram maior $SOsmol$ comparados aos da linhagem HTZ, e maior ARP foi apresentada pelos ratos da linhagem WKY comparada às linhagens HTZ e SHR ($P<0,05$) (Tabela 1). Os ratos da linhagem WKY demonstraram hiperproteinemia quando comparado com os das linhagens HTZ e SHR, nos três grupos: CONT, PH e PHRP ($P<0,05$) (Tabela 1).

Tabela 1. Determinação de parâmetros sanguíneos em ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR hidratados (CONT), ou submetidos à privação hídrica (PH) ou privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP). Concentração sérica de sódio (S[Na⁺]), potássio (S[K⁺]) e proteína total (S[tP]), e atividade de renina plasmática (ARP).

Linhagem	Grupo	S[Na ⁺] mEq/l	S[K ⁺] mEq/l	Osmolalidade mOsmol/Kg	S[tP] g%	ARP ng/ml/h
HTZ	CONT	139 ± 0	6,0 ± 0,2	292 ± 1	6,2 ± 0,1 [△]	0,7 ± 0,1
HTZ	PH	144 ± 1 ⁺	6,3 ± 0,4	304 ± 2 ^{+ △}	7,3 ± 0,0 ^{+ △}	1,3 ± 0,2 ⁺
HTZ	PHRP	133 ± 1 ^{+ #}	6,7 ± 0,2	282 ± 1 ^{+ #}	6,6 ± 0,1 ^{+ # △}	2,2 ± 0,2 ^{+ # △}
WKY	CONT	139 ± 1	6,7 ± 0,2	292 ± 2	6,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1
WKY	PH	143 ± 0 ⁺	6,6 ± 0,2	293 ± 2 ⁺	7,9 ± 0,1 ⁺	2,0 ± 0,3 ⁺
WKY	PHRP	136 ± 1 ^{+ #}	6,7 ± 0,3	284 ± 1 ^{+ #}	7,3 ± 0,1 ^{+ #}	3,6 ± 0,4 ^{+ #}
SHR	CONT	139 ± 0	7,0 ± 0,4 [♦]	292 ± 1	6,2 ± 0,1 [△]	0,3 ± 0,1 [△]
SHR	PH	143 ± 1 ⁺	6,9 ± 0,3	299 ± 2 ^{+ △}	7,2 ± 0,1 ^{+ △}	2,6 ± 0,3 ^{+ ♦}
SHR	PHRP	136 ± 0 ^{+ #}	7,4 ± 0,2	288 ± 1 ^{+ ♦}	6,9 ± 0,1 ^{+ # △}	2,5 ± 0,4 ^{+ △}

⁺ p<0,05 vs. CONT e [#] p< 0,05 vs. PH, ambos da mesma linhagem

[♦] p<0,05 vs. HTZ e [△] p<0,05 vs. WKY, ambos do mesmo grupo

n = 6-9 por grupo

4.5.2.1.3 Respostas cardiovasculares e excreção urinária induzidas pela desidratação.

Não se observou diferença na PAM e FC entre animais hidratados e privados por 24 h nas três linhagens (Tabela 2). No estado hidratado e privado, a PAM de ratos da linhagem SHR foi maior do que ambas as linhagens normotensas, e a FC da linhagem WKY foi menor do que nas linhagens HTZ e SHR (PAM: linhagem, $F_{2,18}=51,1$, linhagem vs. grupo, $F_{2,18}=7,1$, $P<0,05$, grupo, $F_{2,41}=0,02$; FC: linhagem, $F_{2,18}=4,3$, $P<0,05$, grupo, $F_{1,41}=1,2$, linhagem vs. grupo, $F_{2,18}=0,3$) (Tabela 2).

Após as 24 h de PH, não se observou diferença no UV, UOsmol e UNaV entre as três linhagens (Fig. 15). No entanto, ratos privados das linhagens WKY e SHR apresentaram menor UKV do que os privados da linhagem HTZ ($F_{2,20}=6,8$; $P<0,05$) (Fig. 15).

Tabela 2. Pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) de ratos das linhagens HTZ, WKY e SHR hidratados (CONT) e submetidos à privação hídrica (PH).

Linhagem	PAM _{CONT}	PAM _{PH}	Δ PAM _{PH-CONT}	FC _{CONT}	FC _{PH}	Δ FC _{PH-CONT}
HTZ	120 \pm 3	125 \pm 3	3 \pm 4	428 \pm 138 ^{Δ}	438 \pm 14 ^{Δ}	3 \pm 10
WKY	103 \pm 2	115 \pm 5	4 \pm 7	371 \pm 8	378 \pm 17	5 \pm 13
SHR	188 \pm 10 ^{\diamond} Δ	170 \pm 8 ^{\diamond} Δ	-13 \pm 4	420 \pm 21 ^{Δ}	444 \pm 14 ^{Δ}	18 \pm 16

^{\diamond} p<0,05 vs. HTZ e ^{Δ} p<0,05 vs. WKY,
n = 7 por linhagem

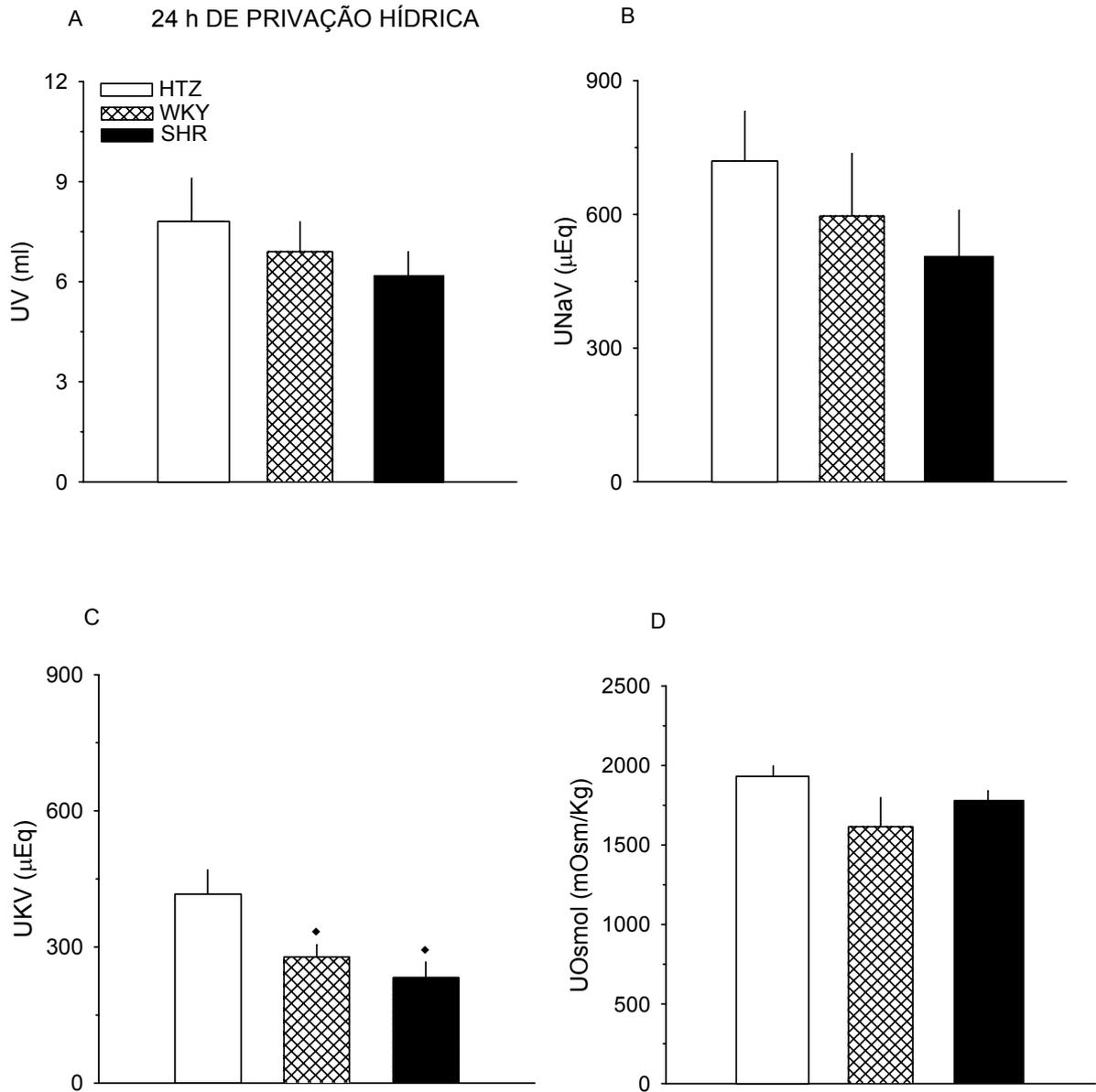


Figura 15. Determinação de parâmetros urinários: UV (A), UNaV (B), UKV (C) e UOsmol (D) em ratos das linhagens HTZ (barra branca), WKY (barra achurada) e SHR (barra preta) submetidos à privação hídrica. ♦ $P < 0,05$ vs. HTZ, $n = 7$ por linhagem.

4.5.2.2 Experimento 2b. Comparação entre as linhagens HTZ e SHR.

A ingestão diária de solução de NaCl 0,3 M foi 5 vezes maior em ratos da linhagem SHR comparada à dos ratos da linhagem HTZ (teste “t” de Student; $P < 0,05$) (Tabela 3). A ingestão diária de água e ração dos ratos da linhagem SHR foi, respectivamente, 37% e 12% menor do que ratos da linhagem HTZ (água e ração: teste “t” de Student; $P < 0,05$) (Tabela 3). Sob hidratação, ratos da linhagem SHR apresentaram diurese, natriurese e menor UOsmol e UKV comparados aos ratos da linhagem HTZ (UV, UNaV, UOsmol e UKV: teste “t” de Student; $P < 0,05$) (Tabela 3). O balanço de sódio (perda de sódio pela urina menos a quantidade de sódio ingerida em solução e/ou ração) (Na Bal) em animais hidratados foi mais positivo em ratos da linhagem SHR comparado aos da linhagem HTZ (teste “t” não-pareado; $P < 0,05$) (Tabela 3).

A PH reduziu a ingestão de ração em ambas as linhagens e ratos da linhagem SHR ingeriram 27% menos ração do que os da linhagem HTZ (linhagem, $F_{1,14}=14,8$, grupo, $F_{1,14}=424,0$, $P < 0,05$, linhagem vs. grupo, $F_{1,14}=0,6$) (Tabela 3). A PH também reduziu UV, UNaV e UKV e por conseguinte, aumentou UOsmol nas linhagens SHR e HTZ comparadas aos seus respectivos grupos CONT (UV: linhagem, $F_{1,14}=11,1$, grupo, $F_{1,14}=42,6$, linhagem vs. grupo, $F_{1,14}=16,7$, $P < 0,05$; UNaV: linhagem, $F_{1,14}=43,9$, grupo, $F_{1,14}=5,7$, linhagem vs. grupo, $F_{1,14}=5,7$, $P < 0,05$; UKV: linhagem, $F_{1,14}=10,3$, grupo, $F_{1,14}=58,7$, linhagem vs. grupo, $F_{1,14}=21,2$, $P < 0,05$; UOsmol: linhagem, $F_{1,14}=3,6$, grupo, $F_{1,14}=149,3$, linhagem vs. grupo, $F_{1,14}=14,2$, $P < 0,05$) (Tabela 3). Após a PH, o UV, UOsmol e UNaV foram semelhantes entre as duas linhagens (Tabela 3). No entanto, o grupo SHR PH apresentou menor UKV comparado ao grupo HTZ PH, resultado semelhante ao do

Experimento 2a (teste “t” de Student; $P < 0,05$) (Tabela 3). Após 24 h de privação hídrica, o Na Bal entre as linhagens SHR e HTZ foi semelhante (Tabela 3).

A ingestão de água, UV, UOsmol, UNaV e UKV, após a PHRP, foram semelhantes entre as linhagens (Tabela 3). No momento em que os animais iniciariam o teste do apetite ao sódio, o Na Bal foi semelhante entre as linhagens SHR e HTZ (Tabela 3).

Tabela 3. Medida da ingestão de NaCl 0,3 M, água e ração, e determinação dos parâmetros urinários de ratos das linhagens HTZ e SHR hidratados (CON), e submetidos a privação hídrica (PH) e privação hídrica-rehidratação parcial (PHRP). Volume (UV) e osmolalidade (UOsmol) urinária, quantidade total de sódio (UNaV) e potássio (UKV) excretada na urina, e balanço de sódio (Na Bal).

Linhagem	Grupo	Água (ml)	NaCl 0,3 M (ml)	Ração (g)	UV (ml)	UNaV (μ Eq)	UKV (μ Eq)	UOsmol (mOsmol/Kg)	Na Bal (μ Eq)
HTZ	CONT	35 \pm 1	7 \pm 2	24,2 \pm 0,6	8,7 \pm 1,5	1888 \pm 35	691 \pm 116	2756 \pm 252	2178 \pm 482
SHR	CONT	22 \pm 1 [♦]	35 \pm 4 [♦]	21,3 \pm 0,9 [♦]	22,5 \pm 3,4 [♦]	8666 \pm 1063 [♦]	1624 \pm 207 [♦]	1801 \pm 113 [♦]	3944 \pm 626 [♦]
HTZ	PH	-	-	13,5 \pm 0,6 ⁺	4,3 \pm 0,4 ⁺	1173 \pm 85 ⁺	341 \pm 37 ⁺	3783 \pm 224 ⁺	-18 \pm 100
SHR	PH	-	-	9,8 \pm 0,5 ^{♦+}	3,3 \pm 0,5 ⁺	1002 \pm 136 ⁺	216 \pm 23 ^{♦+}	3739 \pm 196 ⁺	-163 \pm 114
HTZ	PHRP	12,5 \pm 0,9	-	-	1,8 \pm 0,5	25 \pm 14	86 \pm 27	658 \pm 136	-44 \pm 93
SHR	PHRP	9,4 \pm 1,2	-	-	1,2 \pm 0,3	13 \pm 2	50 \pm 9	819 \pm 133	-117 \pm 115

[♦]p<0,05 vs. HTZ do mesmo grupo e ⁺p<0,05 vs. CONT da mesma linhagem

n = 7 por linhagem

4.6 Discussão

Animais da linhagem SHR mostraram exacerbada ingestão de solução de NaCl 0,3 M comparados com as linhagens normotensas, HTZ e WKY, no teste de apetite ao sódio induzido por PHRP. Após a PHRP, os animais da linhagem SHR também apresentaram maior número de células imunorreativas à proteína Fos no OSF, pré-LC e cNTS comparados com as demais linhagens e foi a única linhagem na qual a PHRP induziu aumento da expressão de c-Fos no NPBM comparado com seu respectivo estado hidratado. Sinais que facilitam a expressão do apetite ao sódio, tais como hipovolemia, elevada ARP e aumento da excreção de sódio urinário, não estavam acentuados na linhagem SHR. A PH não alterou a pressão arterial ou frequência cardíaca nas três linhagens. O aumento da expressão de c-Fos induzido pela PHRP sugere que a hiperatividade de células em importantes áreas encefálicas está associada à exacerbada ingestão de NaCl hipertônico exibida pelos animais da linhagem SHR durante o teste de apetite ao sódio.

À parte a expressão diferencial de c-Fos no OSF, cNTS, pré-LC e NPBM do SHR, a PHRP induziu um padrão semelhante na expressão de c-Fos encefálico em todas as linhagens, sem nenhuma discriminação entre áreas facilitatórias ou inibitórias. Com algumas exceções às linhagens SHR e WKY, todas as linhagens mostraram um aumento na expressão de c-Fos, ao término da PHRP, na lâmina terminal (OSF, OVLT e MnPO), NTS, pré-LC, NCeA, NPBL, NSQ, AP e NDR. Esta imunorreatividade aumentada sugere que a atividade celular estava aumentada nestas áreas encefálicas quando os animais iniciaram o teste de apetite ao sódio. Contrastando com o aumento generalizado, a expressão de c-Fos induzida pela PH

foi revertida aos níveis controles pela ingestão de água, após o PR, no NPV (magnocelular e parvocelular) e NSO de animais das linhagens HTZ e SHR.

Esperava-se que a lâmina terminal dos animais da linhagem SHR expressasse maior Fos-ir em resposta ao protocolo PHRP, devido ao papel desempenhado por esta área no controle angiotensinérgico do apetite ao sódio (Fitts et al., 1990; De Luca Jr. et al., 1992; Morris et al., 2002) e ao fato de que ANG II exógena induz maior Fos-ir nesta linhagem comparada aos animais da linhagem WKY (Rowland et al., 1995; Lebrun et al., 1996). No entanto, como as estruturas da lâmina terminal aparentam trabalhar em uníssono e o OSF envia aferências descendentes ao OVLT e MnPO (Rowland et al., 1995; Johnson and Thunhorst, 1997; McKinley et al., 2001), esperava-se aumento da expressão de c-Fos no OSF acompanhado de aumento da Fos-ir nas outras duas áreas. Isto não foi o que realmente aconteceu, e a expressão de c-Fos no OSF, OVLT e MnPO aumentou em todas as linhagens após a PH e manteve-se aumentada após a ingestão de água comparada ao estado hidratado. No entanto, após a ingestão de água, o OSF dos grupos PHRP apresentou maior aumento da expressão de c-Fos comparado ao dos grupos PH; e como se esperava, este segundo aumento foi maior nos animais da linhagem SHR comparado com os das linhagens normotensas.

Sendo assim, parece que a expressão de c-Fos ou ativação de células no OSF segue dois passos durante a PHRP: um primeiro passo na presença de elevada quantidade de ANG II circulante e hiperosmolalidade, sinais que ativam c-Fos durante a privação hídrica (para revisão, Gottlieb et al., 2006) e um segundo passo, após a PHRP, como maior número de células ativadas na presença de persistente aumento de ANG II e diluído líquido extracelular. Esta atividade aumentada no OSF antes do teste de apetite ao sódio é consistente com a

expressão de c-Fos no OSF induzida pela ANG II; a qual exerce papel no controle do apetite ao sódio e medeia o apetite ao sódio induzido pela privação hídrica, através de receptores centrais de ANG II (Rowland et al., 1994; Sato et al., 1996; Morris et al., 2002). Não sabemos a que atribuir o aumento do número de células ativas no OSF, mas certamente não foi a remoção da hiperosmolalidade, pela ingestão de água durante o RP per si, pois como esperado (De Luca Jr. et al., 2002; Gottlieb et al., 2006), exatamente o oposto aconteceu no NSO e NPV. Independentemente do mecanismo, parece que este segundo passo relacionado ao maior número de células ativas também pode induzir a subsequente ingestão de sódio no teste de apetite ao sódio. Por conseguinte, maior número de células ativadas no OSF após a PHRP foi previsto em um animal, cuja atividade do SRA encefálico é maior (Di Nicolantonio et al., 1982, 2004), que apresentasse maior apetite ao sódio, precisamente o que aconteceu com a linhagem SHR.

Após a PHRP, todas as linhagens também apresentaram aumento generalizado da expressão de c-Fos no NTS, exceção feita para o cNTS de animais da linhagem WKY. Este aumento de c-Fos concorda com resultados prévios de Gottlieb et al. (2006), mas ao contrário do que fora previamente observado, a privação de água per si não induziu expressão de c-Fos no NTS, o que pode estar relacionado com o reduzido período de privação hídrica utilizado no presente trabalho. Como os animais da linhagem SHR têm maior sensibilidade à depleção de volume (Folkow, 1990; Colombari et al., 2001), também se esperava que a privação de água induzisse maior expressão de c-Fos no NTS desta linhagem, particularmente no iNTS, mas isto não ocorreu. O aumento generalizado da expressão de c-Fos em resposta a ingestão de água durante o RP pode refletir a ativação de aferências cardiovasculares ao NTS. Esta ativação pode ser resultante

do restabelecimento parcial do líquido extracelular, responsável por encerrar a ingestão de água durante o RP, como previsto pela hipótese cardiovascular da saciedade (Johnson and Thunhorst, 1997; Schreihofer et al., 1999; De Luca Jr. et al, 2002). De acordo com esta hipótese, a ativação diferencial no cNTS de animais da linhagem SHR poderia explicar a pequena redução na ingestão de água que esta linhagem apresentou durante o RP; no entanto, animais da linhagem WKY comportaram-se da mesma maneira sem nenhum aumento de c-Fos no cNTS. Por outro lado, a maior expressão de c-Fos no cNTS de animais da linhagem SHR, talvez modulada pela ANG II (Chan et al., 2002), pode estar associada ao maior apetite ao sódio, assim como a ativação diferencial de células positivas ao Fos no OSF. Entretanto, devido a semelhante ingestão de sódio pelas linhagens normotensas, embora eles apresentem expressão diferencial de c-Fos, sugere-se que a ativação do cNTS não é essencial para a ingestão de sódio. Se a ativação de um subnúcleo em particular do NTS explica ou não diferenças na ingestão de sódio entre linhagens, a maior ativação deste núcleo, particularmente nas porções intermediária e adjacente à área postrema, antes do teste de apetite ao sódio, é consistente com o papel atribuído à este núcleo no controle do apetite ao sódio (Geerling e Loewy, 2007; Shekhtman et al., 2007).

Após a PHRP, todas as linhagens também mostraram aumento da expressão de c-Fos no pré-LC; no entanto, a PH não induziu expressão de c-Fos em nenhuma linhagem. Esta área tem recebido maior atenção por pertencer ao circuito que conecta o NTS às regiões encefálicas anteriores envolvidas com recompensa, tal como o núcleo accumbens, e por exercer controle sob o apetite ao sódio (Geerling and Loewy, 2007; Shekhtman et al., 2007). O circuito NTS-accumbens supostamente influencia o apetite ao sódio através de neurônios sensitivos a

aldosterona, cuja liberação é induzida por desidratação extracelular. Sendo assim, não podemos extrapolar que nossos resultados estejam ativando esta via, pois os níveis de aldosterona não estão elevados na privação hídrica, ou seja, quando hiperosmolaridade acompanha desidratação extracelular (Ramsay et al., 1988; Schneider, 1990). Por outro lado, esta mesma via poderia estar mediando outro mecanismo que age no NTS e produz apetite ao sódio, como a ANG II (Paton et al., 2008). Por conseguinte, sugere-se que o aumento da expressão de c-Fos no pré-LC de todas as linhagens antecede a ingestão de sódio no teste de apetite ao sódio, e particularmente o aumento da Fos-ir antecede a exacerbada ingestão de sódio exibida pelos animais da linhagem SHR.

O aumento da expressão de c-Fos no NTS, NPBL e NCeA de todas as linhagens é consistente com a sugestão de que um principal complexo neural que conecta áreas encefálicas posteriores às anteriores controla o sabor e o apetite ao sódio (Johnson et al., 1999; Norgren et al., 2006; Geerling and Loewy, 2007). O NPBM, principal área gustatória deste complexo neuronal, de animais da linhagem SHR apresentou aumento da Fos-ir após PHRP comparado com o seu estado hidratado. É relevante o fato de que este aumento da atividade do NPBM não foi induzido pelo estímulo gustatório ao sabor, particularmente ao sabor salgado. De acordo com a proposta de remoção de pistas de retroalimentação negativa (Flynn et al., 2003), o resultado sugere que a atividade no NPBM pode antecipar a facilitação do estímulo gustatório durante o teste do apetite ao sódio.

Todas as linhagens apresentaram aumento da expressão de c-Fos no NCeA e NPBL após PHRP comparadas com seus respectivos estados hidratado e privado. O NCeA pertence ao circuito facilitatório da ingestão de sódio (Galaverna et al., 1992; Johnson et al., 1999); portanto, aumento da expressão de c-Fos neste núcleo

era previsto para a ingestão de sódio no teste de apetite ao sódio. No entanto, como a ingestão de ração é reduzida durante a privação hídrica e então, liberada pela ingestão de água (Watts, 2001; De Luca Jr. et al, 2002), o aumento da atividade do NCEA poderia também estar antecipando a ingestão de alimento, como isto tem sido demonstrado durante comportamento predatório no rato (Comoli et al., 2005). O NPBL pertence ao circuito inibitório da ingestão de sódio (Johnson e Thunhorst, 1997; David et al., 2008), sendo assim, diferentemente do NCEA, um aumento da expressão de c-Fos após a PHRP não era esperado. Esta contradição pode ser estendida ao NDR devido as suas semelhantes funções inibitórias e conexões com o NPBL (Cavalcante-Lima et al., 2005) e AP, a qual também pertence ao circuito inibitório da ingestão de sódio (Edwards et al., 1993). O aumento da expressão de c-Fos em áreas inibitórias, antes da ingestão de solução hipertônica de NaCl que ocorre após PHRP, não está claro. Talvez isto corresponda a um componente facilitatório, ainda não conhecido, que possivelmente interaja com o NCEA para antecipar a atividade inibitória sob a ingestão de sódio ou para controlar outras funções relacionada com a rehidratação.

Qualquer que seja o mecanismo relacionado com o aumento da atividade de áreas encefálicas inibitórias, antes da ingestão de sódio, o mesmo terá que ser conciliado com recentes resultados, nos quais o aumento do consumo de NaCl hipertônico em animais SHR privados de água está associado a reduzida resposta às vias de retroalimentação negativa, que controlam a taxa de lambida (Flynn et al., 2003). Com relação a este fato, é de interesse lembrar o que acontece com a expressão de c-Fos em ratos normotensos que ingerem sódio. Após privação hídrica, rehidratação com NaCl 0,15 M induz pequeno aumento da expressão de c-Fos no NTS e NPBL comparada com rehidratação com água, ambos em relação aos

estados hidratado e privado (Gottlieb et al., 2006). No entanto, rehidratação com ambos os líquidos, água e NaCl 0,15 M, induz semelhante aumento na expressão de c-Fos comparada com o induzido pela privação (Gottlieb et al., 2006). Estes resultados também contradizem a função inibitória destes núcleos, mas eles não são conclusivos, pois a ingestão de NaCl isotônico em animais privados de água pode estar relacionada com a eliminação da sede, ao invés do apetite ao sódio. No entanto, aumento da expressão de c-Fos também ocorre nestas áreas encefálicas, NTS e NPBL, quando ratos depletados de apenas sódio, os quais não estão com sede, ingerem soluções de NaCl (Godino et al., 2007). Por conseguinte, futuros trabalhos, utilizando-se o protocolo PHRP, com o intuito de investigar como estas áreas encefálicas se comportam em resposta a ingestão de sódio, poderão confirmar as funções inibitórias exercidas pelo NTS e NPBL no apetite ao sódio.

O aumento semelhante da expressão de c-Fos no NSQ de todas as linhagens, em resposta a PHRP, comparado com seus respectivos estados privados e hidratado, sugere que a atividade celular deste núcleo também antecede o apetite ao sódio. Este núcleo está relacionado com o controle circadiano das funções motoras de comportamentos ingestivos (Watts, 2001) e como episódios de privação hídrica incrementam a ingestão diária de sódio (Pereira et al., 2002), especula-se que a ativação do NSQ pela rehidratação, de alguma forma, reflete a ativação de mecanismos de plasticidade neural que irão reforçar a ingestão de sódio em certos períodos do dia.

Era esperado que a ingestão de água durante o RP revertesse o aumento da expressão de c-Fos induzido pela PH no NPV e NSO de animais das linhagens HTZ e SHR (De Luca Jr. et al., 2002; Gottlieb et al., 2006), e esta reversão contrasta com o aumento generalizado da expressão de c-Fos obtido em outras áreas encefálicas

após PHRP. Além disso, a expressão de c-Fos foi nula nos animais da linhagem WKY comparada com os da linhagem HTZ, mas ambas as linhagens mostraram semelhante ingestão de sódio. Este resultado sugere que a atividade celular destes núcleos não prevê a ingestão de sódio que ocorre após PHRP. Por outro lado, a pequena expressão de c-Fos no NPV e NSO de animais da linhagem WKY é consistente com a resposta reduzida desta linhagem à administração exógena de ANG II (Rowland, 1995). Note também, que tanto infusão de ANG II quanto de solução hiperosmótica de NaCl induz expressão de c-Fos no NPV e NSO (Rowland et al., 1994; Johnson e Thunhorst, 1997; McKinley et al., 2001). No entanto, a reversão completa da expressão de c-Fos nestes núcleos, induzida pela ingestão de água durante o RP, sugere que a remoção do estímulo natural hiperosmótico é suficiente para inativar estas células apesar da presença de elevada ARP.

Os resultados do presente trabalho indicam que o aumento da atividade celular em importantes áreas encefálicas pertencentes aos circuitos neurais que controlam o apetite ao sódio está associado à exacerbada ingestão induzida de sódio exibida pelos animais da linhagem SHR. Este aumento diferencial da atividade celular em áreas facilitatórias, induzido pela PHRP nos animais da linhagem SHR, fornece um substrato neural para o melhor entendimento dos mecanismos do apetite ao sódio nesta linhagem.

4.7 Referências

Bertino M, Beauchamp GK (1988) The spontaneously hypertensive rat's preference for salted foods. *Physiol Behav* 44(3):285-289.

Catalanotto F, Schechter PJ, Henkin RI (1972) Preference for NaCl in the spontaneously hypertensive rat. *Life Sciences* 11(Part I):557-564.

Cavalcante-Lima HR, Lima HR, Costa-e-Sousa RH, Olivares EL, Cedraz-Mercez PL, Reis RO, Badauê-Passos D Jr, De-Lucca W Jr, de Medeiros MA, Côrtes WS, Reis LC (2005) Dipsogenic stimulation in ibotenic DRN-lesioned rats induces concomitant sodium appetite. *Neurosci Lett* 374:5-10.

Chan SH, Chao YM, Tseng CJ, Chan JY (2002) Down-regulation of basal Fos expression at nucleus tractus solitarius underlies restoration of baroreflex response after antihypertensive treatment in spontaneously hypertensive rats. *Neuroscience* 112:113-120.

Colombari E, Sato MA, Cravo SL, Bergamaschi CT, Campos RR Jr, Lopes OU (2001) Role of the medulla oblongata in hypertension. *Hypertension* 38:549-554.

Comoli E, Ribeiro-Barbosa ER, Negrão N, Goto M, Canteras N (2005) Functional mapping of the prosencephalic systems involved in organizing predatory behavior in rats. *Neuroscience* 130:1055-1067.

David RB, Menani JV, De Luca LA Jr (2008) Serotonergic receptor blockade in the lateral parabrachial nucleus: different effects on hypertonic and isotonic NaCl intake. *Brain Res* 1187:137-145.

De Luca LA Jr, Galaverna O, Schulkin J, Yao SZ, Epstein AN (1992) The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. *Brain Res Bull* 28:73-87.

De Luca LA Jr, Xu Z, Schoorlemmer GH, Thunhorst RL, Beltz TG, Menani JV, Johnson AK (2002) Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. *Am J Physiol* 282:R552-R559.

De Luca LA Jr, Vendramini RC, Pereira DTB, Colombari DSA, David RB, de Paula PM, Menani JV (2007) Water deprivation and the double-depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. *Braz J Med Biol Res* 40:707-712.

Di Nicolantonio R, Hutchinson JS, Mendelsohn FA (1982) Exaggerated salt appetite of spontaneously hypertensive rats is decreased by central angiotensin-converting enzyme blockade. *Nature* 298:846-848.

Di Nicolantonio R, Kren V, Zidek V, Pravenec M (2004) Salt preference of congenic strains derived from the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Behav* 80:617-622.

Doward WV, Chalmers L (1975) Comparison of methods for calculation serum osmolality from chemical concentrations, and prognostic value of such calculations. Clin Chem 21:p190-194.

Edwards GL, Beltz TG, Power JD, Johnson AK (1993) Rapid-onset "need-free" sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. Am J Physiol 264:R1242-R1247.

Epstein AN (1991) Neurohormonal control of salt intake in the rat. Brain Res Bull 27:315-320.

Fessler DM (2003) An evolutionary explanation of the plasticity of salt preferences: prophylaxis against sudden dehydration. Med Hypotheses 61:412-415.

Flynn FW, Culver B, Newton SV (2003) Salt intake by normotensive and spontaneously hypertensive rats: two-bottle and lick rate analyses. Physiol Behav 78:689-696.

Fitts DA, Tjepkes DS, Bright RO (1990) Salt appetite and lesions of the ventral part of the ventral median preoptic nucleus. Behav Neurosci 104:818-827.

Folkow B (1990) Salt and hypertension. News Physiol Sci 5:220-224.

Fregly MJ (1975) NaCl intake and preference threshold of spontaneously hypertensive rats. PSEBM 149:915-920.

Galaverna OG, De Luca Jr. LA, Schulkin J, Yao SZ, Epstein AN (1992) Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res Bull* 28: 89-98.

Godino A, De Luca Jr LA, Antunes-Rodrigues J, Vivas L (2007) Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers? *Am J Physiol* 293:R1027-R1036.

Geerling JC, Loewy AD (2007) Sodium deprivation and salt intake activate separate neuronal subpopulations in the nucleus of the solitary tract and the parabrachial complex. *J Comp Neurol* 504(4):379-403.

Gottlieb HB, Ji LL, Jones H, Penny ML, Fleming T, Cunningham JT (2006) Differential effects of water and saline intake on water deprivation-induced c-Fos staining in the rat. *Am J Physiol* 290:R1251-R1261.

Herrera DG, Robertson HA (1996) Activation of c-fos in the brain. *Prog Neurobiol* 50:83-107.

Johnson AK, Thunhorst RL (1997) The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. *Front Neuroendocrinol* 18:292-353.

Johnson AK, de Olmos J, Pastuskovas CV, Zardetto-Smith AM, Vivas L (1999) The extended amygdala and salt appetite. *Ann N Y Acad Sci.* 877:258-280.

Kleiner SM (1999) Water: An essential but overlooked nutrient. *J Am Diet Assoc* 99:200-206.

Lebrun CJ, Blume A, Herdegen T, Möllenhoff E, Unger T (1996) Complex activation of inducible transcription factors in the brain of normotensive and spontaneously hypertensive rats following central angiotensin II administration. *Regul Pept* 66:19-23.

Leshem M, Saadi A, Alem N, Hendi K (2008) Enhanced salt appetite, diet and drinking in traditional Bedouin women in the Negev. *Appetite* 50:71-82.

Maas AHR, Kofstad J, Siggard-Andersen O (1983) Ionized calcium, sodium and potassium by ion selective electrodes. In: International Federation of clinical chemistry workshop. Proceedings of the first meeting of the European Working Group on ion selective electrodes. Oslo Copenhagen: Private Press.

McConnell SD, Henkin RI (1973a) Increased preference for Na⁺ and K⁺ salts in spontaneously hypertensive (SH) rats. *PSEBM* 143:185-188.

McConnell SD, Henkin RI (1973b) NaCl preference in spontaneously hypertensive rats: age and blood pressure effects. *PSEBM* 225:624-627.

McKinley, M.J, Allen AM, May, CN, McAllen BJ, Oldfield BJ, Sly D, Mendelsohn FAO (2001) Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular and body fluid homeostasis. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 28: 990-992.

Mogenson GJ, Morris P (1980) Increased salt appetite precedes the onset of arterial hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Appetite* 1:167-171.

Morris MJ, Wilson WL, Starbuck EM, Fitts DA (2002) Forebrain circumventricular organs mediate salt appetite induced by intravenous angiotensin II in rats. *Brain Res* 949:42-50.

Norgren R, Hajnal A, Mungamdee SS (2006) Gustatory reward and the nucleus accumbens. *Physiol Behav* 89:531-535.

Okamoto K, Aoki K (1963) Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Japanese Circulation Journal* 27:282-293.

Paton JF, Wang S, Polson JW, Kasparov S (2008) Signalling across the blood brain barrier by angiotensin II: novel implications for neurogenic hypertension. *J Mol Med* 86(6):705-710.

Paxinos G, Watson C (2005) *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press.

Pereira DTB, David RB, Menani JV, De Luca LA Jr (2002) Episodes of water deprivation enhance daily hypertonic NaCl intake in rats. *Braz J Med Biol Res* 35:465-468.

Ramsay DJ, Thrasher TN, Bie P (1988) Endocrine components of body fluid homeostasis. *Comp Biochem Physiol A* 90:777-780.

Rowland NE, Li BH, Rozelle AK, Fregly MJ, Garcia M, Smith GC (1994) Localization of changes in immediate early genes in brain in relation to hydromineral balance: intravenous angiotensin II. *Brain Res Bull* 33:427-36.

Rowland NE, Li BH, Fregly MJ, Smith GC (1995) Fos induced in brain of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II and co-localization with AT-1 receptors. *Brain Res* 675:127-134.

Sato MA, Yada MM, De Luca LA Jr (1996) Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. *Physiol Behav* 60:1099-1104.

Schneider EG (1990) In water deprivation, osmolality becomes important determinant of aldosterone secretion. *News Physiol Sci* 5:197-201.

Schreihof AM, Anderson BK, Schiltz JC, Xu L, Sved AF, Stricker EM (1999) Thirst and salt appetite elicited by hypovolemia in rats with chronic lesions of the nucleus of the solitary tract. *Am J Physiol* 276(1 Pt 2):R251-R258.

Shekhtman E, Geerling JC, Loewy AD (2007) Aldosterone-sensitive neurons of the nucleus of the solitary tract: multisynaptic pathway to the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 501:274-289.

Stricker EM, Verbalis JG (1996) Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *Regul Pept* 66:83-85.

Takamata A, Mack GW, Gillen CM, Nadel ER (1994) Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement. *Am J Physiol* 266:R1493-R1502.

Watts AG (2001) Neuropeptides and the integration of motor responses to dehydration. *Ann Rev Neurosci* 24:357-384.

Weisinger RS, Denton DA, McKinley MJ, Nelson JF (1985) Dehydration-induced sodium appetite in rats. *Physiol Behav* 34:45-50.

Willians JP, Harrison TR, Grollman A (1939) A simple method for determining the systolic blood pressure of unanesthetized rat. *J Clin Invest* 18:373-376.

Wright JW, Harding JW (1992) Regulatory role of brain angiotensins in the control of physiological and behavioral responses. *Brain Res Rev* 17:227-262.