

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

**GAVAGEM DE NaCl HIPERTÔNICO INDUZ**  
**INGESTÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO**

JULIANA CONSTANCIO



CONVÊNIO UFSCar/UNESP



2009

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

**GAVAGEM DE NaCl HIPERTÔNICO INDUZ**  
**INGESTÃO DE BICARBONATO DE SÓDIO**

**JULIANA CONSTANCIO**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

**CONVÊNIO UFSCar/UNESP**

2009

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

C757gn

Constancio, Juliana.

Gavagem de NaCl hipertônico induz ingestão de bicarbonato de sódio / Juliana Constancio. -- São Carlos : UFSCar, 2010.

62 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2009.

1. Fisiologia. 2. Bicarbonato de sódio. 3. Desidratação celular. 4. Preferência mineral. 5. Ingestão de água. I. Título.

CDD: 612 (20<sup>a</sup>)

Universidade Federal de São Carlos  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas  
Convênio UFSCar/UNESP

Defesa de Dissertação de Juliana Constancio

Prof. Dr. Laurival Antonio De Luca Jr.....



Profa. Dra. Monica Akemi Sato.....



Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari.....



## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Dr. Laurival A. De Luca Jr., pela oportunidade de desenvolver este trabalho, bem como pelo auxílio, conselhos e ensinamentos dedicados desde a minha iniciação científica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas (PPGCF), convênio UFSCar/UNESP, pelo auxílio na realização do meu mestrado.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 06/58829-7), pela bolsa concedida.

Aos demais professores do departamento, pelas sugestões enriquecedoras no decorrer de todos esses anos e por estarem disponíveis a ajudar sempre.

A todos os amigos e funcionários do laboratório de Fisiologia, por toda amizade, paciência, força e também pelo apoio técnico para o desenvolvimento desta dissertação.

Aos meus pais e meus irmãos, por toda paciência, carinho e amor incondicional que sempre me trouxe coragem para continuar. Por serem minha base e minha referência.

Ao meu querido e amado Paulo, por estar ao meu lado sempre, me aconselhando e incentivando. Obrigada por todo amor, carinho, paciência, e compreensão.

A todos que contribuíram meus sinceros agradecimentos.

A Deus por mais uma realização...

## RESUMO

A literatura mostra que a gavagem de NaCl 2 M, um método para se induzir desidratação celular, induz ingestão de água e de NaCl 0,15 M em teste de dupla escolha. Entretanto, o NaCl hipertônico é também conhecido como um irritante gástrico, que aparentemente rompe as barreiras de proteção da mucosa gástrica. Portanto, o presente trabalho foi realizado para testar a hipótese de que a gavagem de NaCl 2 M produz ingestão mineral como uma resposta a irritação gástrica. Se a irritação gástrica for um fator importante para induzir ingestão de solução mineral, então podemos prever que: 1) protetor mecânico de mucosa inibe a ingestão de solução mineral induzida pela gavagem de NaCl e 2) outros irritantes, como etanol e o ácido acético, devem induzir ingestão de solução mineral da mesma maneira que o NaCl. Em experimentos preliminares com ratos Holtzman adultos, a gavagem de NaCl 2 M induziu ingestão de quantidades apreciáveis de solução de NaHCO<sub>3</sub> e KCl em teste de cinco bebedouros (água, KCl 0,01 M, CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M, NaCl 0,15 M), mostrando que o efeito não é seletivo para ingestão de NaCl. Nos experimentos subseqüentes, os animais tiveram acesso à água destilada e às duas soluções minerais de preferência (KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M) para ingestão. A ingestão dessas soluções não foi inibida por agentes protetores da mucosa gástrica, como hidróxido de alumínio, ou o próprio NaHCO<sub>3</sub>, combinados à gavagem de NaCl 2 M. Irritantes não-sódicos (etanol 50% ou ácido acético 0,6 N) não foram capazes de induzir ingestão de qualquer mineral. Além disso, apenas o etanol - único irritante agressivo da mucosa conforme determinado por inspeção macroscópica - induziu ingestão de caulim (silicato de alumínio hidratado), um mineral que protege o rato do mal-estar induzido por toxemia. Injeção intracerebroventricular de losartan, um antagonista de receptor de angiotensina II, inibiu de forma dose-dependente, a

ingestão de líquidos induzida por gavagem de NaCl. Os resultados sugerem que a ingestão de  $\text{NaHCO}_3$  desencadeada por gavagem de NaCl 2 M: a) ocorre em resposta a desidratação celular, e não por mal-estar gástrico; b) é mediada pela angiotensina II.

**Palavras Chave:** bicarbonato, desidratação, preferência, auto-medicação, sede, NaCl hipertônico, gavagem.

## ABSTRACT

The literature shows that gavage of 2 M NaCl, a method to induce cell dehydration, induces water and 0.15 M NaCl intake in a two-bottle test. However, the hypertonic NaCl is also known as a mild gastric irritant, which possibly erodes the protective barriers of the gastric mucosa. Therefore, the present work tested the hypothesis that gavage of 2 M NaCl induces mineral intake as a response to gastric irritation. If the gastric irritation is an important factor to induce mineral solution intake, then we can predict that 1) mechanical protectors of the gastric mucosa inhibits the mineral solution intake induced by gavage of NaCl and 2) other irritants such as ethanol and acetic acid, should induce mineral solution intake as the gavage of NaCl did. In previous experiments with adult male Holtzman rats, gavage of 2 M NaCl induced ingestion of appreciable quantities of NaHCO<sub>3</sub> and KCl solutions in a five-bottle test (water, 0.01 M KCl, 0.05 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.15 M NaHCO<sub>3</sub>, 0.15 M NaCl), showing that the effect is not selective for NaCl intake. In subsequent experiments, the animals had access to water and the two preferred mineral solutions (0.01 M KCl and 0.15 M NaHCO<sub>3</sub>) for ingestion. The ingestion of these solutions was not inhibited by the protective agents of the gastric mucosa, such as aluminum hydroxide, or the NaHCO<sub>3</sub>, combined with gavage of 2 M NaCl. Non-sodic irritants (50% ethanol or 0.6 N acetic acid) were not able to induce any mineral intake. Furthermore, ethanol - determined by macroscopic inspection as the sole aggressive irritant of the gastric mucosa - induced kaolin (hydrated aluminum silicate) intake, a mineral that protects the rat against toxemia-induced malaise. Losartan, an angiotensin II receptor antagonist, injected intracerebroventricularly, inhibited in a dose-response manner the fluid intake induced by gavage of NaCl. The results suggest that NaHCO<sub>3</sub> intake

induced by gavage of hypertonic NaCl: a) is consistent to cell dehydration rather than to a gastric irritation and b) is mediated by angiotensin II.

**Keywords:** bicarbonate, dehydration, preference, self-medication, thirst, hypertonic NaCl, gavage.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M, CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M e NaCl 0,15 M) em teste de cinco bebedouros por ratos que receberam gavagem de NaCl 2 M ou H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (2 ml). NaCl hipertônico induziu apenas ingestão de KCl e NaHCO<sub>3</sub> em comparação com o tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. # p < 0,05 vs. H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, CaCl<sub>2</sub> e NaCl no mesmo grupo; \* p < 0,05 vs. Respeetivo fluido do grupo controle. O número de ratos está representado em parênteses.....37
- Figura 2.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M) em teste de três bebedouros por ratos que receberam gavagem de NaCl 2 M (2 ml) precedida (uma hora antes) por gavagem de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> ou Al(OH)<sub>3</sub> 2 g/kg peso corporal. O terceiro grupo de ratos recebeu uma única gavagem de NaCl 2 M mais NaHCO<sub>3</sub> (0,05 g/2 ml – 0,3 M). # p < 0,05 vs. outros líquidos do mesmo grupo. O número de ratos está representado em parênteses.....41
- Figura 3.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M) foi medida em ratos tratados com gavagem de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> combinada com NaCl 2 M ou irritantes não sódicos (etanol 50% ou ácido acético 0,6 N). Somente gavagem de NaCl induziu ingestão de soluções minerais. \* p < 0,05 vs. respectivo fluido nos outros tratamentos. O número de ratos está representado em parênteses.....43

**Figura 4.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M) foi medida em ratos tratados com gavagem de NaCl 2M combinada (uma hora depois) com H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, etanol 50% ou NaCl 2 M (A) ou com H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> ou ácido acético 0,6 N (B). \* p < 0,05 vs. respectivo fluido nos outros tratamentos e & p < 0,05 vs. respectivo fluido do tratamento NaCl – etanol. O número de animais está representado em parênteses.....45

**Figura 5.** Ingestão de caulim (esquerda) e de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> - direita) foram medidas em ratos tratados com gavagem de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> prévia (uma hora antes) a gavagem de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> ou NaCl 2 M. Não houve diferença na ingestão de caulim entre o grupo teste e controle. # p < 0,05 vs. ingestão de água do grupo controle (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> – H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). O número de ratos está representado em parênteses.....47

**Figura 6.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) e de caulim foi medida em ratos tratados com gavagem de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, ácido acético 0,6 N ou etanol 50%. Não houve diferença na ingestão de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> entre os grupos # p < 0,05 vs. ingestão de caulim do grupo controle (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>). O número de ratos está representado em parênteses.....49

**Figura 7.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) e de soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M and NaHCO<sub>3</sub>0,15 M) em teste de três bebedouros por ratos que receberam injeção icv de salina ou angiotensina II (ANG II; 50 ng) precedida por salina ou losartan 50 nmol (antagonista de ANG II). \* p < 0,05 vs. outros líquidos do mesmo tratamento; # p < 0,05 vs. respectivo

fluido nos outros tratamentos. O número de ratos está representado em parênteses.....51

**Figura 8.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M) em um teste de três bebedouros por ratos que estavam com desidratação celular induzida por gavagem de NaCl hipertônico prévia a injeção icv de: salina (NaCl 0,15 M) ou losartan (50, 100 ou 200 nmol). \* p < 0,05 vs. outros líquidos do mesmo tratamento; # p < 0,05 vs. respectivo fluido do tratamento salina e Los 50. O número de ratos está representado em parênteses.....53

**Tabela 1** – Coloração da mucosa gástrica de ratos em cinco tratamentos diferentes (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>/NaCl 2 M, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>/etanol 50%, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>/ácido acético 0,6 N e Al(OH)<sub>3</sub> 2 g/kg).....39

## LISTA DE ABREVIATURAS

$\text{Al(OH)}_3$  = hidróxido de alumínio

ANG II = angiotensina II

ANOVA = análise de variância

$\text{CaCl}_2$  = cloreto de cálcio

CNPq = Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COBEA = Colégio Brasileiro de Experimentação Ambiental

E.P.M. = erro padrão da média

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

FOAr = Faculdade de Odontologia de Araraquara

g = grama

h = hora

$\text{H}_2\text{Od}$  = água destilada

icv = intracerebroventricular

ig = intragástrico

ip = intraperitoneal

iv = intravenoso

KCl = cloreto de potássio

kg = quilograma

LOS = losartan

mm = milímetro

mM = milimolar

M = molar

mg = miligrama

ml = mililitro

N = normal

NaCl = cloreto de sódio

NaHCO<sub>3</sub> = bicarbonato de sódio

ng = nanograma

nmol = nanomol

p.c. = peso corporal

UFSCar = Universidade Federal de São Carlos

UNESP = Universidade Estadual Paulista

VL = ventrículo lateral

vs. = versus

μl = microlitro

μm = micrômetro

% = por cento

°C = grau Celsius

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução</b> .....	17
<b>2. Objetivos</b> .....	21
<b>3. Materiais e métodos</b> .....	22
3.1 Animais.....	22
3.2 Sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico (gavagem de NaCl).....	23
3.3 Soluções minerais.....	23
3.4 Caulim.....	23
3.5 Drogas.....	24
3.6 Triagem.....	24
3.7 Cirurgia.....	25
3.8 Injeções centrais.....	26
3.9 Histologia.....	26
3.10 Análise estatística.....	26
<b>4. Protocolos experimentais</b> .....	28
Experimento 1. Preferência por soluções minerais no teste de cinco bebedouros.....	28
Experimento 2. Ação de protetores da mucosa gástrica na ingestão mineral.....	29
Experimento 2a. Aspectos da mucosa gástrica em resposta a gavagem de NaCl hipertônico.....	29

Experimento 2b. Combinação de protetores da mucosa com gavagem de NaCl.....	30
Experimento 3. Irritantes gástricos não-sódicos e ingestão de soluções minerais.....	30
Experimento 3a. Efeitos da gavagem de etanol ou de ácido acético na ingestão de soluções minerais.....	30
Experimento 3b. Irritantes não-sódicos e depressão do comportamento ingestivo.....	31
Experimento 4. Efeito dos irritantes na ingestão de caulim.....	32
Experimento 4a. Gavagem de NaCl e ingestão de caulim.....	32
Experimento 4b. Gavagem de etanol ou ácido acético e ingestão de caulim.....	33
Experimento 5. Efeito da injeção intracerebroventricular (icv) de losartan (LOS), antagonista de receptor AT1 de ANG II, na ingestão mineral induzida por gavagem de NaCl.....	33
Experimento 5a. Efeito da injeção icv de LOS na ingestão mineral induzida por injeção icv de ANG II.....	33
Experimento 5b. Efeito da injeção icv de LOS na ingestão de soluções minerais induzida pela gavagem de NaCl.....	34
<b>5. Resultados.....</b>	<b>36</b>
Experimento 1. Preferência por soluções minerais no teste de cinco bebedouros.....	36

Experimento 2. Ação de protetores da mucosa gástrica na ingestão mineral.....	38
Experimento 2a. Aspectos da mucosa gástrica em resposta a gavagem de NaCl hipertônico.....	38
Experimento 2b. Combinação de protetores da mucosa com gavagem de NaCl.....	40
Experimento 3. Irritantes gástricos não-sódicos e ingestão de soluções minerais.....	42
Experimento 3a. Efeitos da gavagem de etanol ou de ácido acético na ingestão de soluções minerais.....	42
Experimento 3b. Irritantes não-sódicos e depressão do comportamento ingestivo.....	44
Experimento 4. Efeito dos irritantes na ingestão de caulim.....	46
Experimento 4a. Gavagem de NaCl e ingestão de caulim.....	46
Experimento 4b. Gavagem de etanol ou ácido acético e ingestão de caulim.....	48
Experimento 5. Efeito da injeção intracerebroventricular (icv) de losartan (LOS), antagonista de receptor AT1 de ANG II, na ingestão mineral induzida por gavagem de NaCl.....	50
Experimento 5a. Efeito da injeção icv de LOS na ingestão mineral induzida por injeção icv de ANG II.....	50

Experimento 5b. Efeito da injeção icv de LOS na ingestão de soluções minerais induzida pela gavagem de NaCl.....	52
<b>6. Discussão.....</b>	<b>54</b>
<b>7. Conclusões.....</b>	<b>57</b>
<b>8. Referências.....</b>	<b>58</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Em mamíferos, o equilíbrio hidro-eletrolítico e um balanço adequado entre o ganho (ingestão) e a perda (excreção) de água e sódio são mantidos por mecanismos de controle eficazes que detectam e restauram a volemia e a osmolalidade sempre que estes apresentarem desvios. Um dos solutos mais efetivos para aumentar a concentração osmótica é o íon sódio devido a sua grande quantidade no líquido extracelular e sua característica impermeante (Antunes-Rodrigues et al., 2005; De Luca Jr. et al., 2005).

O sistema nervoso central (SNC) detecta alterações da volemia, osmolalidade e concentração de sódio plasmático, através de aferências vagais e glossofaríngeas provenientes de receptores viscerais (osmo-sódio receptores hepáticos ou renais, barorreceptores renais ou cardiovasculares) e de fatores humorais circulando no sangue, no líquido cefalorraquidiano, ou ambos. Em resposta à ativação de receptores centrais e periféricos específicos para cada fator, o SNC é assim capaz de estimular diferentes tipos de sede (intra e extracelular) e o apetite ao sódio, além de estimular mecanismos neuroendócrinos (sistema renina-angiotensina-aldosterona, vasopressina, ocitocina, peptídeo natriurético atrial) relacionados à conservação de água e sódio (Johnson e Thunhorst, 1997).

Existem dois tipos principais de desidratação: celular e extracelular. A desidratação celular (hiperosmótica) ocorre quando há redução do volume das células devido à difusão de água do meio intracelular para o extracelular em resposta a um aumento da pressão osmótica efetiva do líquido extracelular. Esse aumento pode ser ocasionado por aumento da concentração de solutos

osmoticamente ativos. Já a desidratação extracelular (hipovolêmica) ocorre quando há redução do volume do líquido extracelular como em situações de hemorragia, diarreia, vômito e depleção de sódio. Este tipo de desidratação promove perda conjunta de água e de sódio e é, portanto, acompanhada de comportamento apetitivo ao sódio (Epstein, 1973; Antunes-Rodrigues et al., 2005; De Luca Jr. et al., 2005; 2007).

Experimentos da década de sessenta (Fitzsimons et al., 1961) demonstraram que a quantidade de água ingerida por um animal nefrectomizado varia linearmente com o aumento na concentração osmótica extracelular, ou seja, a ingestão de água é proporcional ao grau de desidratação intracelular (teoria osmométrica da sede). Entretanto, ratos com desidratação celular induzida por injeção intragástrica de solução de NaCl hipertônico, ingerem um volume extra de NaCl isotônico em adição a água em teste de dois bebedouros (Pereira et al., 2002).

Embora a ingestão mineral possa resultar da desidratação celular causada pela gavagem de NaCl hipertônico, existe a possibilidade de que ela esteja associada a uma tentativa dos animais de aliviar os sintomas de um desconforto gástrico, uma vez que o NaCl hipertônico é conhecido como um irritante gástrico leve, possivelmente por romper as barreiras de proteção (muco) da mucosa gástrica (Takeuchi et al., 1994; Al-Shabanah et al., 2000).

Caso essa possibilidade se confirme, podemos suspeitar de um comportamento de automedicação. Esse comportamento recebe o nome de pica e parece estar presente em primatas, que ingerem plantas com propriedades medicinais para se auto-proteger contra parasitas (Huffman, 2003; Hutchings et al., 2003), e até mesmo em ratos, que ingerem etanol em resposta a ansiedade (Colombo et. al, 1995) ou caulim, um minério à base de alumínio, em resposta ao

mal-estar causado por quimioterápicos (Yamamoto et al., 2007; De Jonghe et al., 2008).

Se a irritação gástrica for um fator importante para indução de ingestão mineral, então tal ingestão deve desaparecer na presença de protetores da mucosa gástrica e deve ser induzida não só pelo NaCl hipertônico, mas também por qualquer outro irritante da mucosa gástrica, independente de apresentarem ou não sódio em sua composição. Os mesmos irritantes devem induzir ingestão de caulim considerando o desconforto gástrico como uma forma de mal-estar.

É possível que parte da ingestão mineral e da ingestão de água induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico resulte de um efeito da angiotensina II (ANG II) endógena, uma vez que David e colaboradores (2008) mostraram que injeção intracerebroventricular (icv) de ANG II induz ingestão de  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M em ratos.

O presente trabalho foi realizado para verificar se a gavagem de NaCl hipertônico produz ingestão mineral como resposta a irritação gástrica. Na primeira etapa de experimentos estabelecemos o tipo de solução mineral preferida pelos animais no teste de cinco bebedouros. Na segunda etapa de experimentos, usando as soluções preferidas, tentamos tanto inibir a ingestão mineral utilizando agentes protetores da mucosa gástrica [ $\text{Al}(\text{OH})_3$  ou  $\text{NaHCO}_3$ ] associado à gavagem de NaCl hipertônico quanto produzir ingestão semelhante à induzida pelo NaCl hipertônico utilizando gavagem dos irritantes etanol ou ácido acético. Na terceira etapa testamos se o NaCl hipertônico era capaz de induzir ingestão de outro amenizador dos sintomas, o caulim, e finalmente na quarta etapa, tentamos reduzir ou até mesmo

inibir a ingestão mineral induzida pelo NaCl hipertônico com prévia injeção icv de losartan (LOS), um antagonista de receptores AT1 de ANG II.

## 2. OBJETIVOS

Os objetivos desta Dissertação foram (1) verificar se a gavagem de NaCl hipertônico produz ingestão mineral em resposta a irritação gástrica e (2) estudar se tal ingestão é mediada por ANG II central.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Animais

Ratos Holtzman adultos criados no Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara - UNESP, São Paulo, cujo peso inicial variou entre 280 a 300 g no início dos experimentos, foram individualmente alojados em gaiolas de aço inoxidável em ambiente controlado: ciclo claro-escuro de 12:12 horas com início da fase clara às 7 h da manhã, temperatura entre  $23 \pm 2^{\circ}\text{C}$  e umidade entre  $55 \pm 10\%$ . Três ou cinco bebedouros de polipropileno (capacidade para 100 ml - graduados a cada 1 ml e adaptadas com um bico de aço inoxidável) foram colocados na parte da frente da gaiola e ficaram disponíveis “ad libitum”, a não ser quando indicado o contrário. Um dos bebedouros continha água destilada e cada um dos outros, uma solução mineral palatável diferente (veja adiante). Ração granulada contendo 0,5 – 1,0% de sódio (GUABI, Brasil) ficou disponível à vontade para consumo em um recipiente localizado na lateral de cada gaiola. Todos os experimentos começaram no mínimo sete dias após os animais terem sido ambientados com todos os líquidos disponíveis. Todos os teste foram iniciados entre 12:00 e 14:00 h. Em todos os experimentos os animais foram testados uma única vez, com exceção para o teste de cinco bebedouros. Os procedimentos foram aprovados pelo Comitê Ético Institucional de Cuidados aos Animais (FOAr, UNESP) e seguidas às recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### **3.2 Sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico (gavagem de NaCl).**

Os animais foram removidos gentilmente das gaiolas e treinados para o tratamento de sobrecarga intragástrica (ig) através da infusão de 1 ml de água destilada por uma cânula de polipropileno (PE-10) conectada a uma seringa. A extensão da cânula era suficiente para alcançar o estômago do animal, como determinado em experimentos anteriores (Pereira et al., 2002). O treino teve início após dois dias de adaptação às condições laboratoriais e foi prescrito uma vez ao dia, por cinco dias consecutivos prévios à gavagem de NaCl hipertônico. A gavagem de 2 ml de NaCl 2 M foi administrada após a remoção da ração e de todos os líquidos disponíveis na gaiola; esse tratamento induz hipernatremia, hiperosmolemia, redução da atividade de renina plasmática e nenhuma alteração na concentração total de proteína plasmática (Pereira et al., 2002). Os líquidos ou o caulim retornaram as gaiolas uma hora após a gavagem. (veja nos Experimentos).

### **3.3 Soluções Minerais**

Todas as soluções utilizadas no presente trabalho foram preparadas a partir do respectivo sal (Labsynth, Brasil) dissolvido em água destilada.

Os animais tiveram acesso para ingestão das soluções minerais (KCl 0,01 M,  $\text{CaCl}_2$  0,05 mM,  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M e NaCl 0,15 M) determinadas como isopalatáveis (ingestão diária semelhante) por trabalhos prévios (Tordoff, 1994; Pereira et al., 2005).

### **3.4 Caulim**

Grânulos de caulim (silicato de alumínio hidratado - Labsynth, Brasil) usados no protocolo de pica foram fornecidos aos animais em cochos de aço inoxidável

localizados no interior das gaiolas e foram preparados de acordo com trabalhos prévios (Yamamoto et al., 2007) O caulim foi misturado com 1% de goma Arábica em água destilada para formar grânulos de tamanho semelhante aos de ração e depois, esses grânulos foram completamente desidratados à temperatura ambiente.

### 3.5 Drogas

Hidróxido de alumínio ( $\text{Al(OH)}_3$ ; 2,0 g/kg de peso corporal (p.c.); Vetec, Brasil), ácido acético (0,6 N; Labsynth, Brasil) e etanol P.A. (50%; Qhemis, Brasil) foram dissolvidos em água destilada para serem administrados por infusão intragástrica (2 ml). ANG II (50 ng/ $\mu\text{l}$ ; Sigma, USA) e losartan, (LOS, 50, 100 e 200 nmol; Ningbo Pangs) foram dissolvidos em salina isotônica estéril e foram injetados (1,0  $\mu\text{l}$ ) no ventrículo lateral (VL) dos ratos.

### 3.6 Triagem

Aproximadamente 25% dos animais que entraram para o teste de cinco bebedouros, ingeriram quantidades insignificantes de  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M em resposta à gavagem de NaCl hipertônico. Sendo assim, com base na quantidade mínima ingerida no teste de cinco bebedouros, apenas os animais que ingeriram pelo menos 2 ml de  $\text{NaHCO}_3$  em uma triagem foram utilizados nos experimentos posteriores.

No dia da triagem, ração e todos os líquidos foram removidos das gaiolas e todos os animais receberam uma sobrecarga ig de NaCl 2 M (2 ml). Uma hora após a sobrecarga eles tiveram acesso à  $\text{H}_2\text{O}$ , KCl 0,01 M e  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M em bebedouros de vidro graduados a cada 0,1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável. A leitura das ingestões foi realizada aos 60 minutos. Somente os animais que ingeriram mais que 2 ml de  $\text{NaHCO}_3$  ou que preferiram essa solução foram utilizados nos testes subsequentes (critério baseado no volume mínimo ingerido no

teste de cinco bebedouros). Após essa seleção, ração, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> e as soluções minerais palatáveis foram disponibilizadas aos animais até o dia do experimento (3 dias após a triagem).

### **3.7 Cirurgia**

Um dia após a triagem, os animais selecionados para o protocolo com LOS/ANG II foram anestesiados com injeção ip de quetamina (80 mg/kg p.c.; Cristália, Brasil) combinada com xilazina (7 mg/kg p.c.; Agener, Brasil) e posicionados em um aparelho estereotático (modelo Kopf 900, USA) para cirurgia sob condições de assepsia. O crânio foi nivelado entre o bregma e o lambda. Cânulas guia de aço inoxidável (10 x 0,7 mm de diâmetro interno - 22 Gauge) foram implantadas unilateralmente e posicionadas 2 mm acima do VL esquerdo dos animais (coordenadas: 0,3 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral à linha mediana e 3,8 mm abaixo da superfície do crânio). As cânulas guia foram fixadas ao crânio com parafusos e resina acrílica odontológica. Obturadores metálicos preencheram as cânulas guia entre os testes. Após a cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário – pequeno porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e do analgésico/antiinflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,03 ml/rato). Os ratos ficaram em recuperação por no mínimo 5 dias prévios ao início dos experimentos.

### **3.8 Injeções centrais**

As injeções foram feitas usando-se seringas Hamilton de 5  $\mu$ l (Hamilton, USA) conectadas por cânulas de polietileno (PE-10) à cânulas injetoras (12 x 0,3 mm de diâmetro interno – 30 Gauge). No momento do teste os obturadores foram removidos e as cânulas injetoras (2 mm maiores que as cânulas guia) foram introduzidas no cérebro. Os obturadores foram reposicionados após as injeções centrais e os ratos foram alojados nas gaiolas individuais.

### **3.9 Histologia**

Ao final dos experimentos, os animais que tinham cânulas icv foram profundamente anestesiados com injeção ip de tiopental sódico (80 mg/kg p.c.; Cristália, Brasil) e tiveram seus cérebros perfundidos transcardialmente com formalina 10%. Os cérebros foram removidos, fixados em formalina 10%, congelados, cortados em secções coronais de 50- $\mu$ m, corados com o corante Giemsa e analisados em microscópio óptico para confirmação do posicionamento da cânula guia. Somente dados de animais que apresentavam o trajeto da cânula guia no interior do VL foram considerados para análise.

### **3.10 Análise estatística**

Análise de variância de medidas repetidas de dois fatores - ANOVA (grupo contrabalanceado) ou análise de duas vias – ANOVA, foram usados para comparar grupos ou para comparar animais ingerindo diferentes líquidos em um teste de cinco ou de três bebedouros respectivamente. ANOVA de um fator foi usada para comparar ingestão de água/caulim. Dados são reportados como media  $\pm$  E.P.M. e todos os testes de ANOVA foram seguidos pelo pós-teste de comparação Student-Newman-Keuls.

Para a análise macroscópica da mucosa gástrica, teste qui-quadrado foi feito e por existir uma associação positiva entre as duas variáveis: tratamento e coloração da mucosa gástrica, uma análise residual foi feita para determinar quanto cada resultado contribui para o resultado final do teste qui-quadrado. Os resultados são reportados como o número de estômagos em cada classificação e a porcentagem relativa ao número total de estômagos avaliados.

O nível de significância foi estabelecido para  $p < 0,05$  para todos os testes.

## 4. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

### **Experimento 1. Preferência por soluções minerais no teste de cinco bebedouros**

Infusão iv de NaCl hipertônico induz ingestão seletiva de solução de KCl 0,01 M, quando comparado com a ingestão de H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M e NaCl 0,15 M (Pereira et al., 2005). Tentamos descobrir se resposta semelhante ocorria quando o NaCl hipertônico era administrado via ig. Devido ao fato de que nesses experimentos os animais apresentaram clara preferência por KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M (vide Resultados), todos os outros experimentos envolvendo ingestão de soluções minerais foram conduzidos com apenas três bebedouros contendo essas duas soluções e, para garantir a hidratação apropriada, água.

No dia do experimento, ração, água e todas as soluções foram removidas das gaiolas e oito ratos foram separados em dois grupos: um que recebeu gavagem de H<sub>2</sub>O e outro sobrecarga ig de NaCl 2 M (2 ml). Uma hora após a sobrecarga ig eles tiveram acesso à H<sub>2</sub>O, KCl 0,01 M, CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M e NaCl 0,15 M em bebedouros de vidro graduados a cada 1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável e a medida de ingestão foi feita por 60 minutos. Ração foi repostada e bebedouros de vidro foram substituídos pelos de polipropileno contendo as mesmas soluções até o próximo experimento.

Os testes foram feitos de forma contrabalanceada, onde cada animal foi testado duas vezes em diferentes dias para diferentes tratamentos com três dias de intervalo entre cada um.

## **Experimento 2. Ação de protetores da mucosa gástrica na ingestão mineral**

### **Experimento 2a. Aspectos da mucosa gástrica em resposta a gavagem de NaCl hipertônico**

Devido ao fato do NaCl ser considerado um irritante gástrico (Takeuchi et al., 1994; Al-Shabanah et al., 2000), primeiramente verificamos se o NaCl 2 M induzia irritação gástrica procurando por sinais macroscópicos de hiperemia ou sangramento e se tal irritação era revertida por um protetor mecânico da mucosa gástrica como o  $\text{Al}(\text{OH})_3$  (Hollander et al., 1986). Também testamos se outros irritantes, como o etanol e o ácido acético (Mercer et al., 1995; Matsumoto et al., 1992 e Pathak et al., 2007) induziriam irritação semelhante à induzida pelo NaCl hipertônico.

No dia do experimento, ração e soluções minerais foram removidas das gaiolas e os animais (n=26) foram subdivididos entre cinco grupos que receberam uma primeira gavagem de 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  ou  $\text{Al}(\text{OH})_3$  2 g/kg p.c. e, uma hora depois, a segunda gavagem (2 ml) com uma dessas substâncias: NaCl 2 M, etanol 50% ou ácido acético 0,6 N, formando os seguintes grupos:  $\text{H}_2\text{O}$  +  $\text{H}_2\text{O}$  (n=4),  $\text{H}_2\text{O}$  + NaCl (n=6),  $\text{Al}(\text{OH})_3$  + NaCl (n=4),  $\text{H}_2\text{O}$  + etanol (n=6) e  $\text{H}_2\text{O}$  + ácido acético (n=6). Uma hora após a segunda gavagem eles foram sacrificados com injeção ip de tiopental (80 mg/kg p.c.). Depois, os estômagos foram removidos, cortados longitudinalmente em sua maior curvatura e estendidos em papel absorvente para análise duplo-cego em microscópio cirúrgico com aumento de 10 vezes. O aspecto da mucosa gástrica foi classificado visualmente de acordo com quatro intensidades pré-estabelecidas de coloração da mucosa: A (rosada); B (avermelhada); C (profundamente avermelhada) e D (pontos de hiperemia – acastanhados, independente a coloração geral da mucosa gástrica).

### **Experimento 2b. Combinação de protetores da mucosa com gavagem de NaCl**

Protetores gástricos deveriam reduzir a ingestão mineral induzida por gavagem de NaCl hipertônico, caso ela fosse causada por irritação gástrica. Para testar essa hipótese, utilizamos  $\text{Al}(\text{OH})_3$  e  $\text{NaHCO}_3$ . A combinação de  $\text{NaHCO}_3$  à gavagem deveria inibir a ingestão mineral, particularmente de  $\text{NaHCO}_3$ , não somente por ser o bicarbonato um protetor da mucosa (Konturek et al., 1993), mas também porque o  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M é uma das soluções ingeridas em resposta à gavagem de NaCl.

Os animais foram subdivididos em três grupos: oito ratos receberam gavagem de 2 ml de  $\text{Al}(\text{OH})_3$  2g/kg p.c. uma hora antes da gavagem de 2 ml de NaCl 2 M, dezesseis ratos receberam gavagem de 2 ml de NaCl 2 M mais  $\text{NaHCO}_3$  igual à quantidade média ingerida pelos animais durante o teste de cinco bebedouros (0,05 g/2 ml – 0,3 M) e doze ratos receberam gavagem de 2 ml de  $\text{H}_2\text{O}$  previamente (1 hora) à gavagem de 2 ml de NaCl 2 M. Uma hora depois eles tiveram acesso à  $\text{H}_2\text{O}$ , KCl 0,01 M e  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M em bebedouros de vidro graduados a cada 0,1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável. A medida de ingestão foi feita após 60 minutos.

### **Experimento 3. Irritantes gástricos não-sódicos e ingestão de soluções minerais**

Esses experimentos foram realizados para verificar se outros irritantes também induzem ingestão de KCl 0,01 M e  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M.

### **Experimento 3a. Efeitos da gavagem de etanol ou de ácido acético na ingestão de soluções minerais**

Todos os líquidos e toda a ração foram removidos e treze ratos receberam uma gavagem de 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Depois eles foram separados em três subgrupos: um (n=4) recebeu uma gavagem de 2 ml de NaCl 2 M, outro (n=5) recebeu uma gavagem de 2 ml de etanol 50% e o terceiro grupo (n=4) recebeu uma gavagem de 2 ml de ácido acético 0,6 N. Uma hora depois eles tiveram acesso a H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M em bebedouros de vidro graduados a cada 0,1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável e tiveram a ingestão medida pelos próximos 60 minutos.

### **Experimento 3b. Irritantes não-sódicos e depressão do comportamento ingestivo**

O etanol e o ácido acético não induziram ingestão das soluções minerais. Esse resultado poderia ser atribuído tanto a uma incapacidade destes irritantes ativarem os mecanismos de ingestão mineral, como a uma depressão comportamental, tipicamente associada pelo menos ao etanol (Getachew et al., 2008). Foi, portanto, necessário verificar se esses mesmos irritantes também inibem o comportamento ingestivo.

Primeiramente os animais foram designados a um experimento para verificar o efeito depressor do etanol. Vinte e dois ratos receberam uma gavagem de 2 ml de NaCl 2 M para induzir desidratação celular. Uma hora depois da sobrecarga ig eles foram separados em três grupos que receberam gavagem de 2 ml de: H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (n=5), etanol 50% (n=9) ou NaCl 2 M (n=8). Uma hora depois eles tiveram acesso à H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M em bebedouros de vidro graduados a cada 0,1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável. A medida de ingestão foi feita por 60 minutos.

Depois, um segundo grupo de animais foi testado para verificar o efeito depressor do ácido acético. Dezenove ratos receberam uma gavagem de 2 ml de NaCl 2 M e uma hora depois, nove dos animais receberam uma segunda gavagem de 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> e dez ratos receberam uma gavagem de 2 ml de ácido acético 0,6 N. Uma hora depois eles tiveram acesso à H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M em bebedouros de vidro graduados a cada 0,1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável. A medida de ingestão foi feita por 60 minutos.

#### **Experimento 4. Efeito dos irritantes na ingestão de caulim**

A ingestão de caulim, um tipo de argila (silicato hidratado de alumínio), está associada à redução da sensação de mal-estar do animal toxêmico (Yamamoto et al., 2007; De Jonghe, 2008). É possível que uma indisposição gástrica produza o mesmo efeito porque na natureza uma toxemia pode freqüentemente estar associada a alterações gastrointestinais (Stecher et al., 2008). Sendo assim, se a gavagem de NaCl induzir algum mal-estar decorrente de irritação gástrica, então essa gavagem também deve induzir ingestão de caulim.

#### **Experimento 4a. Gavagem de NaCl e ingestão de caulim**

Vinte e dois ratos selecionados em triagem prévia para ingestão de NaHCO<sub>3</sub> foram ambientados por 24 horas com cochos de aço inoxidável contendo grânulos de caulim em adição à ração, H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> e soluções minerais palatáveis, que estavam disponíveis desde o início do experimento.

No dia do experimento, toda ração, líquidos e caulim foram removidos da gaiola e todos os animais receberam uma gavagem de 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>. Depois eles foram divididos em dois grupos: um que recebeu outra gavagem de 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (grupo controle) e outro que recebeu uma gavagem de 2 ml de NaCl 2 M (grupo

teste). Uma hora depois eles tiveram acesso aos grânulos de caulim disponibilizados em um cocho previamente pesado e à H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> em bebedouros de vidro graduados a cada 0,1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável. A medida de ingestão foi feita por 120 minutos e, então, os cochos foram novamente pesados.

#### **Experimento 4b. Gavagem de etanol ou ácido acético e ingestão de caulim**

O procedimento foi semelhante ao descrito no experimento 4a, mas nesse protocolo os animais foram subdivididos em três grupos que receberam uma gavagem de 2 ml de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (n=7), de ácido acético 0,6 N (n=8) ou de etanol 50% (n=8).

#### **Experimento 5. Efeito da injeção intracerebroventricular (icv) de losartan (LOS), antagonista de receptor AT1 de ANG II, na ingestão mineral induzida por gavagem de NaCl**

Injeção central (icv) de ANG II induz ingestão seletiva de NaHCO<sub>3</sub> no rato (David et al., 2008). Portanto, o presente experimento foi desenvolvido para verificar se esse peptídeo está também envolvido com a ingestão de NaHCO<sub>3</sub> induzida pela gavagem de NaCl. Primeiramente, para complementar achados prévios (David et al., 2008), combinamos injeção central de LOS à injeção central de ANG II. Depois, obtivemos uma curva dose-resposta baseada na dose de LOS que inibiu os efeitos da ANG II na ingestão de soluções minerais.

#### **Experimento 5a. Efeito da injeção icv de LOS na ingestão mineral induzida por injeção icv de ANG II**

Cinco dias após o implante das cânulas no VL, os animais que seriam utilizados posteriormente no protocolo de LOS/ANG II central foram selecionados em

uma segunda triagem. Ração, água e soluções minerais foram removidas das gaiolas e os animais receberam injeção icv de ANG II (50 ng) ou veículo (salina). Depois, os ratos foram gentilmente retornados às suas gaiolas e os bebedouros de vidro graduados a cada 0,1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável contendo H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M foram imediatamente oferecidos. O consumo foi medido por 60 minutos. Somente os animais que ingeriram mais de 2 ml de NaHCO<sub>3</sub> ou preferiram essa solução é que foram utilizados no teste subsequente (critério usado como uma forma de prever se a cânula estava posicionada no local correto baseado em experimentos anteriores). Após essa seleção, ração, água e as soluções minerais palatáveis foram disponibilizadas até o dia do experimento (três dias depois da segunda triagem).

No dia do experimento, ração, água e as soluções minerais palatáveis foram removidas das gaiolas e vinte e dois animais foram separados para receberem injeções icv executando, portanto, quatro grupos experimentais: salina/salina (n=5); LOS/salina (n=6); salina/ANG II (n=5) e LOS/ANG II (n=6). O intervalo entre cada injeção icv foi de quinze minutos. Imediatamente após os ratos receberem a última injeção, bebedouros de vidro graduados a cada 0,1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável contendo H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M foram oferecidos. O consumo dos líquidos foi medido por 60 minutos.

#### **Experimento 5b. Efeito da injeção icv de LOS na ingestão de soluções minerais induzida pela gavagem de NaCl**

Três dias após o segundo teste de triagem os experimentos foram realizados com trinta e cinco animais que receberam uma sobrecarga ig de NaCl 2 M quarenta e cinco minutos antes da injeção icv de: salina (n=7), LOS 50 nmol (n=9), LOS 100

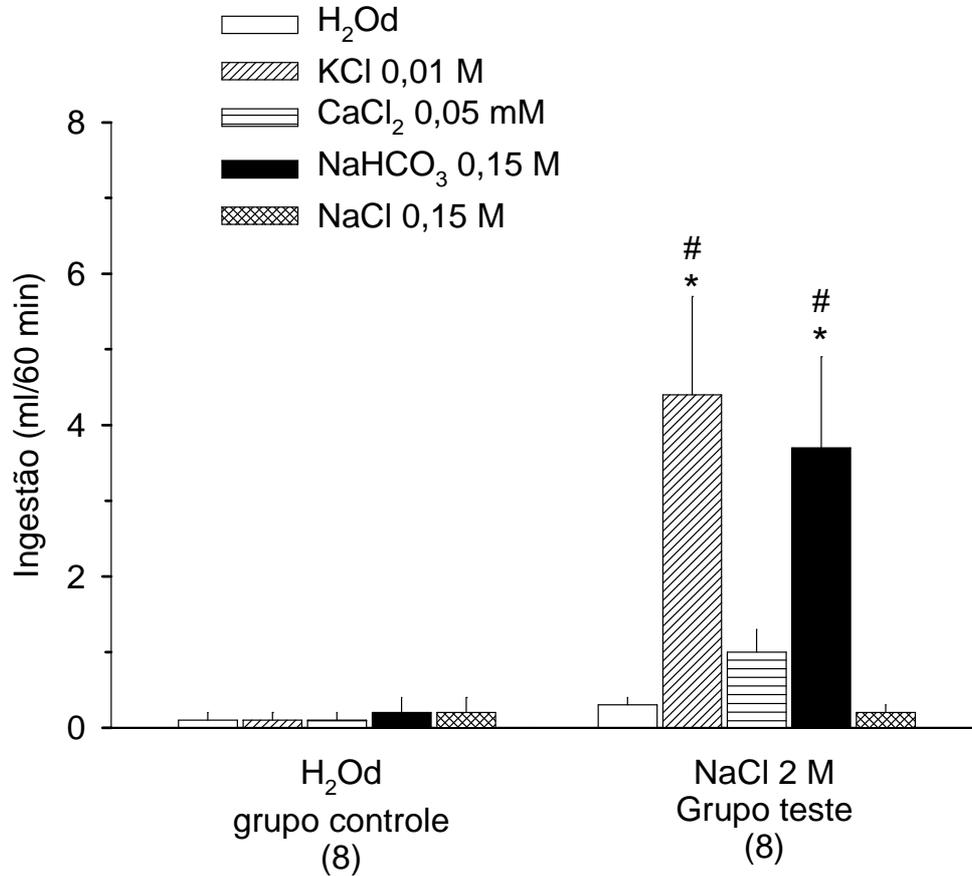
nmol (n=8) e LOS 200 nmol (n=8). Quinze minutos depois de terem recebido LOS icv, bebedouros de vidro graduados a cada 0,1 ml e adaptados com um bico de aço inoxidável contendo H<sub>2</sub>O, KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M foram oferecidos. O consumo dos líquidos foi medido por 60 minutos.

## 5. RESULTADOS

### **Experimento 1. Preferência por soluções minerais no teste de cinco bebedouros**

Gavagem de NaCl hipertônico induziu ingestão de KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M; não houve preferência por nenhuma das soluções minerais quando os animais receberam gavagem de H<sub>2</sub>O [F(4, 70) = 5,778, p < 0,001]. Na comparação entre os grupos a ingestão de KCl 0,01 M e de NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M foi maior nos animais tratados com NaCl 2 M do que nos tratados com H<sub>2</sub>O; a ingestão dos demais líquidos foi semelhante entre os dois tratamentos [F(1, 70) = 25,988, p < 0,001], **(Figura. 1)**.

### Teste cinco bebedouros



**Figura. 1.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M, CaCl<sub>2</sub> 0,05 mM, NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M e NaCl 0,15 M) em teste de cinco bebedouros por ratos que receberam gavagem de NaCl 2 M ou H<sub>2</sub>O (2 ml). NaCl hipertônico induziu apenas ingestão de KCl e NaHCO<sub>3</sub> em comparação com o tratamento com H<sub>2</sub>O. # p < 0,05 vs. H<sub>2</sub>O, CaCl<sub>2</sub> e NaCl no mesmo grupo; \* p < 0,05 vs. Respetivo fluido do grupo controle. O número de ratos está representado em parênteses.

## **Experimento 2. Ação de protetores da mucosa gástrica na ingestão mineral**

### **Experimento 2a. Aspectos da mucosa gástrica em resposta a gavagem de NaCl hipertônico**

As duas características que foram analisadas na tabela (tratamentos e coloração da mucosa gástrica) estão significativamente relacionados [Q-quadrado = 35,1,  $p < 0,001$ ]. Gavagem de etanol 50% provocou forte irritação do estômago com pontos de hiperemia (acastanhados) na porção glandular da mucosa do estômago. Quando os animais foram tratados com outros tipos de irritantes (NaCl 2 M ou ácido acético 0,6 N) ocorreu uma leve alteração no aspecto da mucosa comparado ao estômago normal dos ratos tratados com água e essa alteração não foi prevenida com prévio tratamento com  $\text{Al(OH)}_3$  (**Tabela. 1**).

**Tabela 1** – Coloração da mucosa gástrica de ratos em cinco tratamentos diferentes (H<sub>2</sub>Od/H<sub>2</sub>Od, H<sub>2</sub>Od/NaCl 2 M, H<sub>2</sub>Od/etanol 50%, H<sub>2</sub>Od/ácido acético 0,6 N e Al(OH)<sub>3</sub> 2 g/kg).

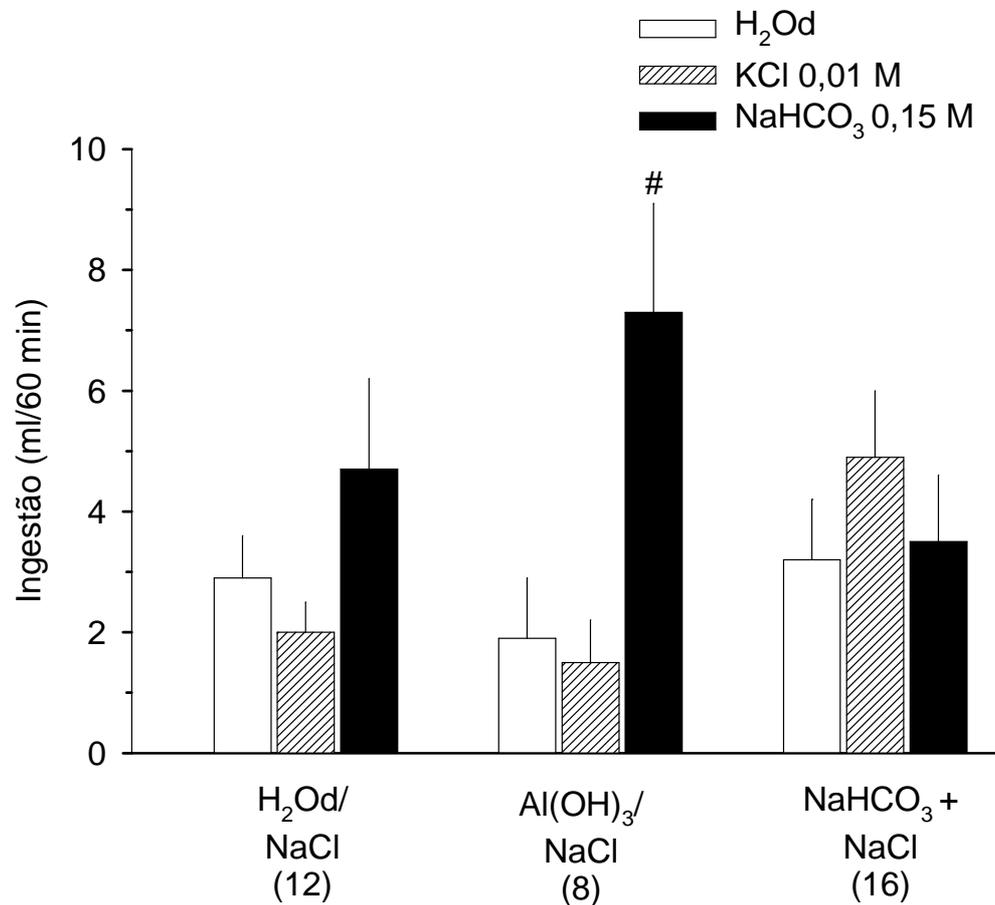
Tratamentos		Classificação de acordo com a coloração da mucosa gástrica *				
1 <sup>a</sup> gavagem	2 <sup>a</sup> gavagem	A	B	C	D	(N)
H <sub>2</sub> Od	H <sub>2</sub> Od	4 (100%)+	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	4 (100%)
H <sub>2</sub> Od	NaCl 2 M	3 (50%)	3 (50%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)
H <sub>2</sub> Od	Etanol 50%	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	6 (100%)+	6 (100%)
H <sub>2</sub> Od	Ácido acético 0,6 N	2 (33,3%)	3 (50%)	1 (16,6%)	0 (0%)	6 (100%)
Al(OH) <sub>3</sub> 2 g/kg	NaCl 2 M	1 (25%)	2 (50%)	1 (25%)	0 (0%)	4 (100%)
Total		10 (38,4%)	8 (30,7%)	2 (7,6%)	6 (23,0%)	26

\* Classificação A: rosado; B: avermelhado; C: vermelho intenso e D: pontos de hiperemia – acastanhado, independente da cor da mucosa gástrica. O número de ratos está representado na última coluna da tabela. (+) Os valores são significantes para  $p < 0,05$ .

### **Experimento 2b. Combinação de protetores da mucosa com gavagem de NaCl**

Quando o NaCl 2 M ou o NaCl 2 M mais NaHCO<sub>3</sub> 0,3 M foi administrado por gavagem, os animais ingeriram todos os líquidos, sem apresentar preferência por algum em específico. Pré-tratamento com Al(OH)<sub>3</sub> (agente protetor) induziu preferência por solução de NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M [F(2, 99) = 4,352, p < 0,05]. Na comparação entre grupos nem o Al(OH)<sub>3</sub> prévio ao NaCl, nem a gavagem de NaCl 2 M mais NaHCO<sub>3</sub> foram capazes de inibir ou reduzir a ingestão de NaHCO<sub>3</sub>; a ingestão de outros líquidos também foi similar entre os três tratamentos [F(2, 99) = 0,285, p > 0,05], (**Figura. 2**).

### Agentes protetores



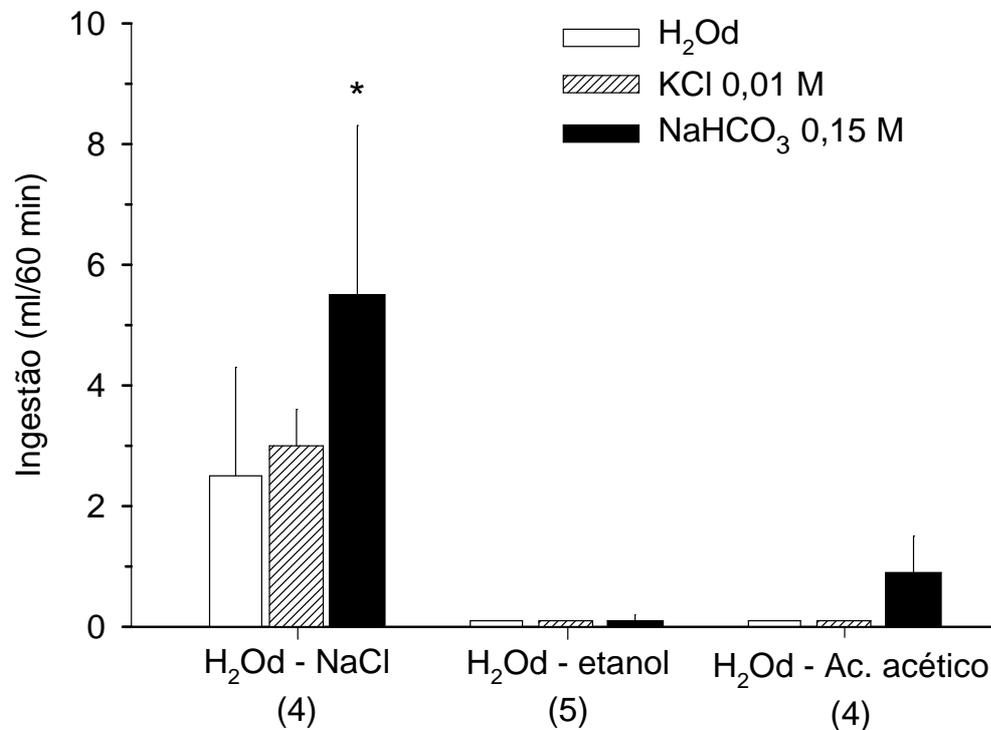
**Figura 2.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>Od) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M) em teste de três bebedouros por ratos que receberam gavagem de NaCl 2 M (2 ml) precedida (uma hora antes) por gavagem de H<sub>2</sub>Od ou Al(OH)<sub>3</sub> 2 g/kg peso corporal. O terceiro grupo de ratos recebeu uma única gavagem de NaCl 2 M mais NaHCO<sub>3</sub> (0,05 g/2 ml – 0,3 M). # p < 0,05 vs. outros líquidos do mesmo grupo. O número de ratos está representado em parênteses.

### **Experimento 3. Irritantes gástricos não-sódicos e ingestão de soluções minerais**

#### **Experimento 3a. Efeitos da gavagem de etanol ou de ácido acético na ingestão de soluções minerais**

Somente o tratamento com NaCl 2 M induziu ingestão dos três líquidos, mas sem que houvesse preferência por um específico [ $F(2, 30) = 1,322, p > 0,05$ ]. Na comparação entre grupos, gavagem de NaCl 2 M induziu a maior ingestão de  $\text{NaHCO}_3$  comparado aos grupos tratados com gavagem de etanol 50% ou ácido acético 0,6 N; a ingestão dos outros líquidos foi semelhante entre os tratamentos [ $F(2, 30) = 10,131, p < 0,001$ ], (**Figura. 3**).

### Irritantes gástricos



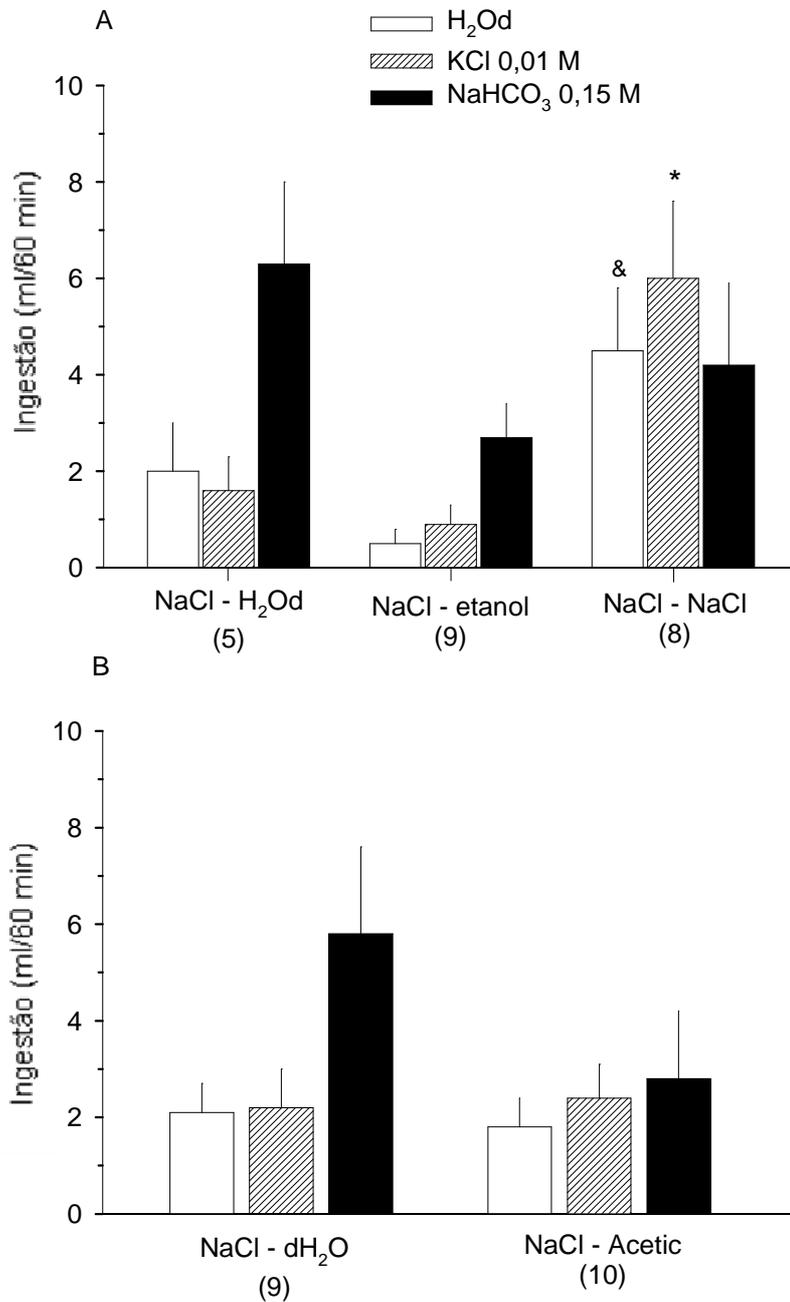
**Figura 3.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M) foi medida em ratos tratados com gavagem de H<sub>2</sub>O combinada com NaCl 2 M ou irritantes não sódicos (etanol 50% ou ácido acético 0,6 N). Somente gavagem de NaCl induziu ingestão de soluções minerais. \* p < 0,05 vs. respectivo fluido nos outros tratamentos. O número de ratos está representado em parênteses.

### **Experimento 3b. Irritantes não-sódicos e depressão do comportamento ingestivo**

No teste do comportamento ingestivo, todos os irritantes induziram ingestão de todos os líquidos sem preferência por nenhum específico [ $F(2, 57) = 2,739$ ,  $p > 0,05$ ]; a dupla gavagem de NaCl 2 M induziu a maior ingestão de dH<sub>2</sub>O comparada ao grupo tratado com NaCl + H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> e de KCl 0,01 M comparada à todos os outros grupos [ $F(2, 57) = 8,511$ ,  $p < 0,001$ ], (**Figura 4A**).

Não houve diferença entre a ingestão de água e soluções minerais palatáveis quando os animais foram tratados com gavagem de NaCl 2 M + ácido acético 0,6 N ou gavagem de NaCl 2 M + H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> [ $F(2, 51) = 2,832$ ,  $p > 0,05$ ]; não houve diferença na comparação entre os grupos [ $F(1, 51) = 1,434$ ,  $p > 0,05$ ], (**Figura 4B**).

### Teste de depressores do comportamento

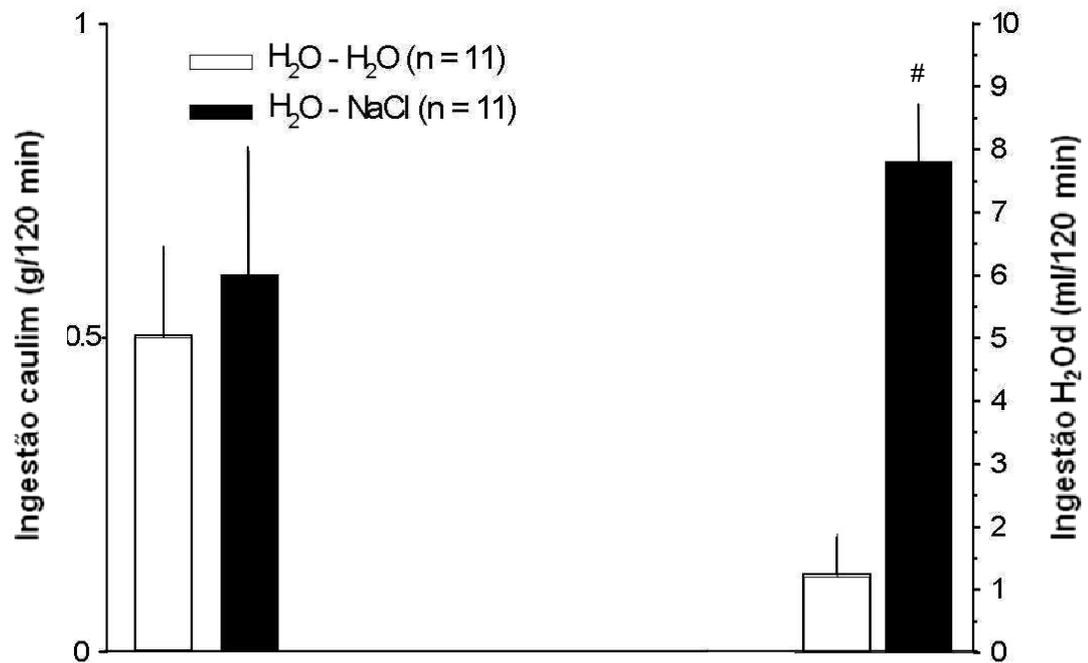


**Figura 4.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>Od) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M) foi medida em ratos tratados com gavagem de NaCl 2M combinada (uma hora depois) com H<sub>2</sub>Od, etanol 50% ou NaCl 2 M (A) ou com H<sub>2</sub>Od ou ácido acético 0,6 N (B). \* p < 0,05 vs. respectivo fluido nos outros tratamentos e & p < 0,05 vs. respectivo fluido do tratamento NaCl – etanol. O número de animais está representado em parênteses.

## **Experimento 4. Efeito dos irritantes na ingestão de caulim**

### **Experimento 4a. Gavagem de NaCl e ingestão de caulim**

Embora o tratamento com gavagem de NaCl 2 M tenha sido efetivo em induzir ingestão de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> comparado ao tratamento com gavagem de H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> [ $F(1, 20) = 32,347, p < 0,001$ ] - (**Figura 5, lado direito**), ele não foi capaz de induzir ingestão de caulim [ $p > 0,05$ ], (**Figura 5, lado esquerdo**).

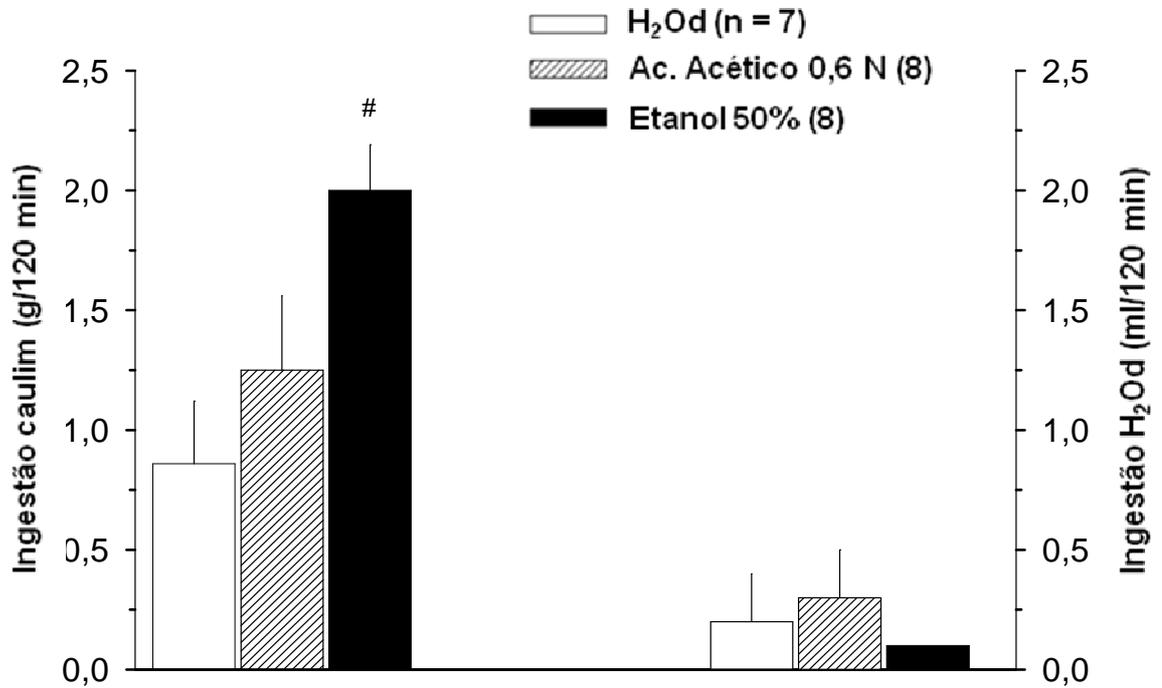
**Desidratação celular e ingestão de caulim**

**Figura 5.** Ingestão de caulim (esquerda) e de água destilada (H<sub>2</sub>Od - direita) foram medidas em ratos tratados com gavagem de H<sub>2</sub>Od prévia (uma hora antes) a gavagem de H<sub>2</sub>Od ou NaCl 2 M. Não houve diferença na ingestão de caulim entre o grupo teste e controle. <sup>#</sup> p < 0,05 vs. ingestão de água do grupo controle (H<sub>2</sub>Od - H<sub>2</sub>Od). O número de ratos está representado em parênteses.

### **Experimento 4b. Gavagem de etanol ou ácido acético e ingestão de caulim**

Ratos tratados com gavagem de etanol 50% ingeriram mais caulim que ratos tratados com gavagem de H<sub>2</sub>O, mas não houve diferença quando comparado ao grupo tratado com gavagem de ácido acético 0,6 N [ $F(2, 20) = 4,945$ ,  $p < 0,05$ ], (**Figura 6, lado esquerdo**). A ingestão de água foi semelhante para todos os grupos [ $p > 0,05$ ], (**Figura 6, lado direito**).

### Irritantes não sódicos e ingestão de caulim



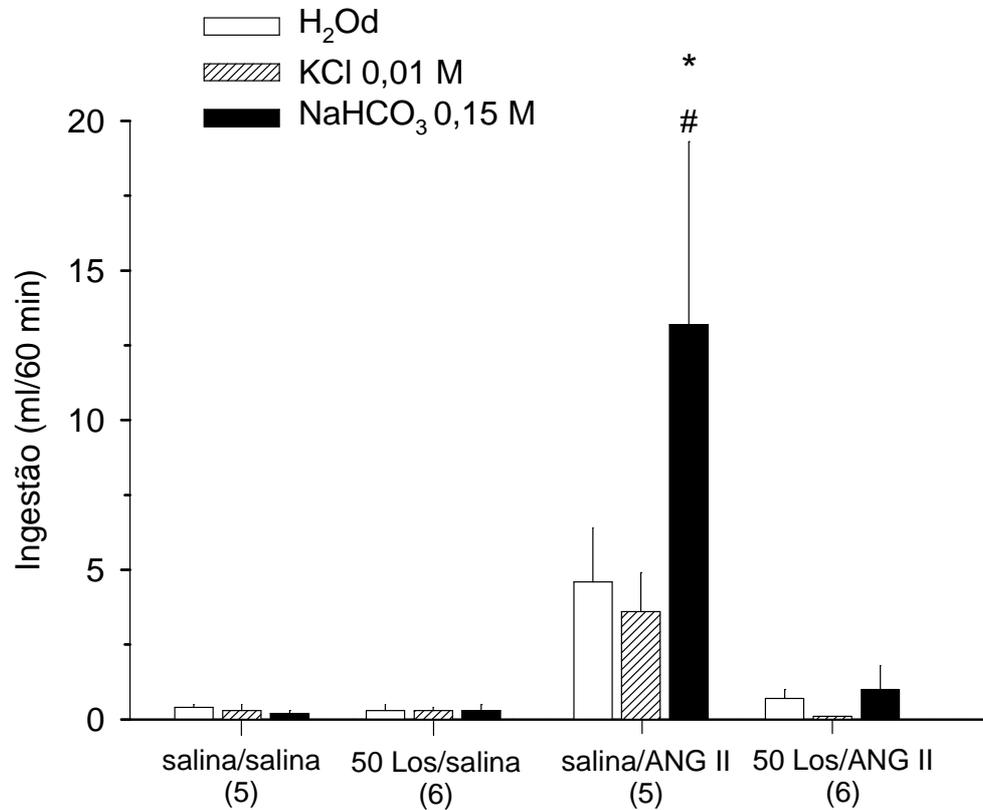
**Figura 6.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O) e de caulim foi medida em ratos tratados com gavagem de H<sub>2</sub>O, ácido acético 0,6 N ou etanol 50%. Não houve diferença na ingestão de H<sub>2</sub>O entre os grupos <sup>#</sup> p < 0,05 vs. ingestão de caulim do grupo controle (H<sub>2</sub>O). O número de ratos está representado em parênteses.

**Experimento 5. Efeito da injeção intracerebroventricular (icv) de losartan (LOS), antagonista de receptor AT1 de ANG II, na ingestão mineral induzida por gavagem de NaCl**

**Experimento 5a. Efeito da injeção icv de LOS na ingestão mineral induzida por injeção icv de ANG II**

Ratos tratados com injeção icv de salina/ANG II ingeriram mais  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M do que outros líquidos e injeção icv de LOS 50 quinze minutos antes da injeção de ANG II inibiu acentuadamente a ingestão dessa mesma solução mineral; não houve preferência por soluções minerais quando os ratos foram tratados com injeção icv de salina/salina ou LOS 50/salina [ $F(3, 54) = 10,839, p < 0,001$ ]. Na comparação entre os grupos a ingestão de  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M foi maior no grupo tratado com salina/ANG II comparado aos demais tratamentos; a ingestão de outros líquidos foi semelhante entre os quatro grupos estudados [ $F(6, 54) = 2,146, p > 0,05$ ], (**Figura 7**).

### Losartan central/ANG II

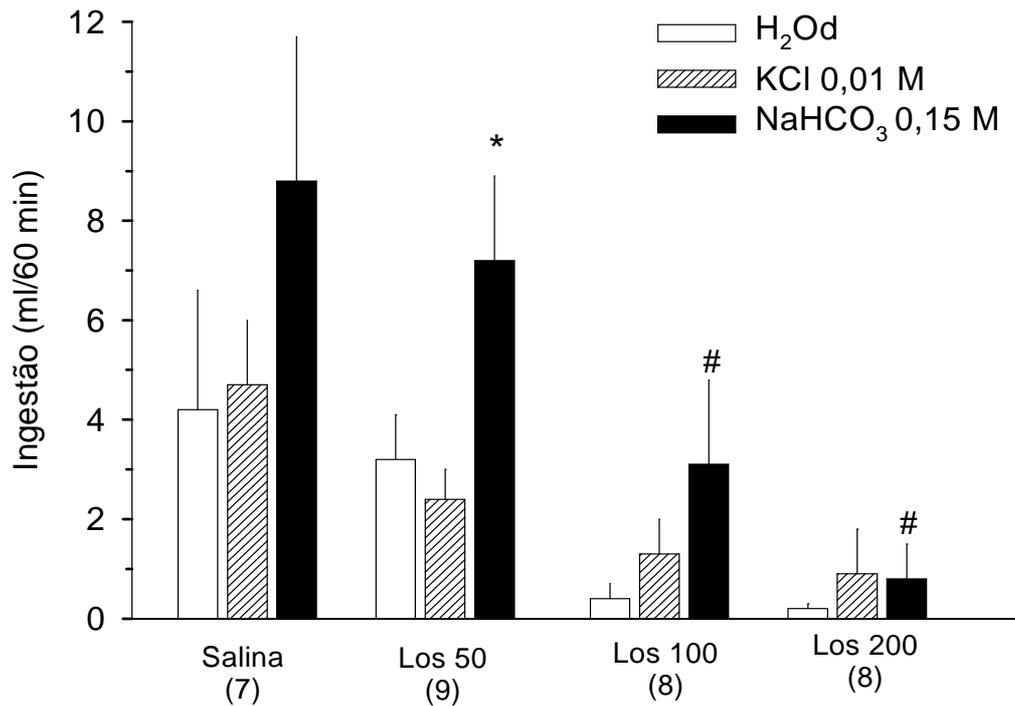


**Figura 7.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O) e de soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M and NaHCO<sub>3</sub>0,15 M) em teste de três bebedouros por ratos que receberam injeção icv de salina ou angiotensina II (ANG II; 50 ng) precedida por salina ou losartan 50 nmol (antagonista de ANG II). \* p < 0,05 vs. outros líquidos do mesmo tratamento; # p < 0,05 vs. respectivo fluido nos outros tratamentos. O número de ratos está representado em parênteses.

### **Experimento 5b. Efeito da injeção icv de LOS na ingestão de soluções minerais induzida pela gavagem de NaCl**

Gavagem de NaCl 2 M combinada com injeção icv de salina induziu ingestão das três soluções minerais. A ingestão de água destilada não foi inibida por nenhuma das doses de LOS injetadas no VL [ $F(3, 28) = 2,798, p > 0,05$ ], mas a ingestão de KCl foi inibida pelo LOS 100 e LOS 200 quando comparado com ratos tratados com salina icv [ $F(3, 28) = 3,430, p < 0,05$ ]. Ingestão de bicarbonato de sódio foi acentuadamente inibida com o LOS 200 quando comparado com animais tratados com salina e LOS 50 [ $F(3, 28) = 3,888, p < 0,05$ ], (**Figura 8**).

### NaCl hipertônico (gavagem) prévia ao losartan (icv)



**Figura 8.** Ingestão de água destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) e soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M) em um teste de três bebedouros por ratos que estavam com desidratação celular induzida por gavagem de NaCl hipertônico prévia a injeção icv de: salina (NaCl 0,15 M) ou losartan (50, 100 ou 200 nmol). \*  $p < 0,05$  vs. outros líquidos do mesmo tratamento; #  $p < 0,05$  vs. respectivo fluido do tratamento salina e Los 50. O número de ratos está representado em parênteses.

## 6. DISCUSSÃO

A gavagem de 2 ml de NaCl 2 M induziu ingestão preferencial das soluções isopalatáveis KCl 0,01 M e NaHCO<sub>3</sub> 0,15 M e uma leve irritação da mucosa gástrica definida por hiperemia. Nem a hiperemia, nem a ingestão de soluções minerais foram inibidas por prévia gavagem de Al(OH)<sub>3</sub>. Bicarbonato de sódio adicionado à gavagem de NaCl também não preveniu a ingestão dessa mesma solução mineral. Os irritantes, ácido acético 0,6 N (leve) e etanol 50% (forte), não induziram qualquer ingestão mineral ou de água, mas um deles (etanol) induziu ingestão de caulim. Ingestão de caulim não foi observada em animais tratados com gavagem de NaCl hipertônico. Injeção icv prévia de LOS, em dose efetiva para inibir ingestão de líquidos induzida por ANG II, inibiu de forma dose-dependente a ingestão de H<sub>2</sub>O, KCl e NaHCO<sub>3</sub> induzida por gavagem de NaCl.

Portanto, não foi confirmada a hipótese inicial de que a ingestão de solução mineral em resposta à gavagem de NaCl 2 M é secundária a um mal-estar ocasionado pela irritação da mucosa gástrica.

Os presentes resultados são em parte semelhantes ao obtido pela infusão endovenosa de NaCl. Essa infusão induz ingestão preferencial de KCl em resposta a maioria das doses de NaCl hipertônico, mas eventualmente pode produzir também ingestão de NaHCO<sub>3</sub> na dose de 1 M (Pereira et al., 2005), o que, pelo menos em parte, também confirma que a ingestão de ambas as soluções não resulta de irritação gástrica e que a solução de NaCl não é a preferida quando os ratos com desidratação celular têm disponível outras soluções minerais palatáveis.

Além disso, os protetores gástricos falharam em reduzir a ingestão de NaHCO<sub>3</sub>, até mesmo quando o “protetor” era o próprio NaHCO<sub>3</sub>. Isso também

sugere que a ingestão dessa solução não ocorre em resposta a uma deficiência de bicarbonato.

Nossos resultados também sugerem que a incapacidade de produzir ingestão de solução mineral pelos irritantes não-sódicos não é devida a uma inibição comportamental genérica. É verdade que o etanol teve uma tendência de reduzir a ingestão das soluções quando induzida por gavagem de NaCl. Entretanto, se a inibição comportamental fosse significativa para impedir a indução de alguma ingestão das soluções minerais, então o etanol não deveria ter induzido a ingestão de caulim, a qual inclusive envolve um sistema mais complexo de componentes motores. Assim, a ingestão de caulim induzida pelo etanol confirma que a irritação gástrica está pode estar associada a um mal-estar, mas somente quando a irritação for mais intensa do que àquela causada por NaCl 2 M. Isso também indica que, apesar de ter inibido a ingestão de líquidos, o etanol 50% não é suficiente para inibir um comportamento associado com um alívio do mal-estar. Sendo assim, o etanol deveria ter induzido alguma ingestão de  $\text{NaHCO}_3$  caso esse comportamento estivesse relacionado com o mal-estar. O ácido acético também falhou em induzir ingestão de  $\text{NaHCO}_3$  e isso reforça a idéia de que irritação gástrica não é a causa da ingestão dessa solução mineral.

Ratos tratados com ANG II icv no teste de cinco bebedouros apresentam a mesma resposta observada em animais tratados com gavagem de NaCl hipertônico: ingerem grandes quantidades de  $\text{NaHCO}_3$  0,15 M e apresentam pouco interesse pela solução de NaCl 0,15 M (David et al., 2008). Então, é possível que a ingestão de  $\text{NaHCO}_3$  seja uma resposta comum a hiperosmolalidade e a ANG II, que pode apresentar um mecanismo comum de ativação de receptores centrais de angiotensina II, tal como sugerido pelo efeito inibitório do antagonista de receptor de

angiotensina II (losartan) sobre a ingestão. Em ratos com desidratação celular esses receptores devem ser ativados pela ANG II central porque o sistema renina-angiotensina periférico é inibido por gavagem de NaCl hipertônico (Pereira et al., 2002). Trabalhos anteriores já sugeriram que a ingestão de água induzida por desidratação celular ativa o sistema renina-angiotensina central (Findlay, 1996; Mckinley et al., 2001), mas ainda não está claro como a desidratação celular é capaz de estimular a ação da ANG II central; talvez a interação descrita entre canais catiônicos de estiramento e ANG II para ativar neurônios centrais traga alguma resposta (Oliet et al., 1993; Bourque et al., 2008). Outros resultados da literatura mostraram que ratos tratados cronicamente com diuréticos ingerem duas vezes mais  $\text{NaHCO}_3$  que NaCl (Rowland et al., 2003), portanto, aparentemente, a ingestão de  $\text{NaHCO}_3$  é uma resposta comum à desidratação extracelular e celular como sugerido pelos resultados presentes e prévios de nosso laboratório (Pereira et al., 2005 e David et al., 2008).

No entanto, ainda não está claro por qual razão um animal com desidratação celular ingere soluções minerais, assim como não está claro por qual razão a ingestão de  $\text{NaHCO}_3$  é mais facilmente observada em resposta a gavagem de NaCl hipertônico, quando comparada com infusão intravenosa da mesma solução (Pereira et al., 2005). De qualquer modo, os resultados reforçam achados prévios (Pereira et al., 2002 e 2005) em que a ingestão de soluções minerais, particularmente soluções sódicas associadas ao bicarbonato, não ocorre como um comportamento exclusivo de animais com desidratação extracelular ou depletados de sódio. Juntamente com resultados da literatura (David et al., 2008), eles também sugerem que a angiotensina II é um mediador comum desses comportamentos.

## 7. CONCLUSÕES

Nossos resultados sugerem que (1) a ingestão de soluções minerais, particularmente soluções sódicas associadas ao bicarbonato, ocorre em resposta à desidratação celular causada pela sobrecarga de NaCl hipertônico, e não em resposta à irritação gástrica e também que (2) a angiotensina II age como um dos mediadores desse comportamento.

## 8. REFERÊNCIAS

AL-SHABANAH, A. O.; QURESHI, S.; AL-HARBI, M. M.; AL-BEKAIRI, A. M.; AL-GHARABLY, N. M.; RAZA, M. Inhibition of gastric mucosal damage by methylglyoxal pretreatment in rats. **Food Chem. Toxicol.** v. 38, p. 577-584, 2000.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; PIKANÇO-DINIZ, D. L. W.; VALENÇA, M. M.; McCANN, S. M. Controle Neuroendócrino da Homeostase dos Fluidos Corporais. In:\_\_\_\_\_. **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. Cap. 9, p. 81-115.

BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nat. Rev. Neurosci.** v. 9, n. 7, p. 519-531, 2008.

COLOMBO, G.; AGABIO, R.; LOBINA, C.; REALI, R.; ZOCCHI, A.; FADDA, F.; GESSA, G. L. Sardinian alcohol-preferring rats: a genetic animal model of anxiety. **Physiol. Behav.** v. 57, n. 6, p. 1181-1185, 1995.

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

DE JONGHE, B. C.; HORN, C. C. Chemotherapy-induced pica and anorexia are reduced by common hepatic branch vagotomy in the rat. **Am. J. Physiol.** v. 294, p. 756-765, 2008.

DE LUCA JR., L. A.; VIVAS, L.; MENANI, J. V. Controle Neuroendócrino da Ingestão de Água e Sal. In: Antunes-Rodrigues, J., editor. **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap.10, p. 116-134.

DE LUCA JR. L. A.; VENDRAMINI, R. C.; PEREIRA, D. T.; COLOMBARI, D. A.; DAVID, R. B.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V. Water deprivation and double-depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 40, n. 5, p. 707-712, 2007.

EPSTEIN, A. N. Epilogue: Retrospect and Prognosis. In: Epstein, A. N.; Kissileff, H. R.; Stellar, E., editors. **The Neuropsychology of thirst: new findings and advances in concepts**. New York: Wiley, 1973. p. 315-332.

FINDLAY, A. L. The effect of losartan on drinking and NaCl intake in the rat in response to hyperosmotic and hypovolemic stimuli: effect of route of administration and strain of rat. **Regul. Pept.** v. 66, p. 95-100, 1996.

FITZSIMONS, J. T. Drinking by nephrectomized rats injected with various substances. **J. Physiol.** v. 155, p. 563-579, 1961.

GETACHEW, B.; HAUSER, S. R.; TAYLOR, R. E; TIZABI, Y. Desipramine blocks alcohol-induced anxiety- and depressive-like behaviors in two rat strains. **Pharmacol., Biochem. and Behav.** v. 91, p. 97-103, 2008.

HOLLANDER, D.; TARNAWSKI, A.; GERGELY, H. Protection against alcohol-induced gastric mucosal injury by aluminum-containing compounds-sucralfate, antacids, and aluminum sulfate. **Scand. J. Gastroenterol. Suppl.** v. 125, p. 151-155, 1986.

HUFFMAN, M. A. Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. **Proc. Nutr. Soc.** v. 62, n. 2, p. 371-381, 2003.

HUTCHINGS, M. R.; ATHANASIADOU, S.; KYRIAZAKIS, I.; GORDON, I. J. Can animals use foraging behaviour to combat parasites? **Proc. Nutr. Soc.** v. 62, n. 2, p. 361-370, 2003.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front. Neuroendocrinol.** v. 18, p. 292-353, 1997.

KONTUREK, S. J. New aspects of clinical pharmacology of antacids. **J. Physiol. Pharmacol.** v. 44, p. 5-21, 1993.

MATSUMOTO, J.; TAKEUCHI, K.; UESHIMA, K.; OKABE, S. Role of capsaicin-sensitive afferent neurons in mucosal blood flow response of rat stomach induced by mild irritants. **Dig. Dis. Sci.** v. 37, n. 9, p. 1336-1344, 1992.

MCKINLEY, M. J.; ALLEN, A. M.; MATHAI, M. L.; MAY, C.; MCALLEN, R. M.; OLDFIELD, B. J.; WEISINGER, R. S. Brain angiotensin and body fluid homeostasis. **Jpn J. Physiol. Rev.** v. 51, n. 3, p.281-289, 2001.

MERCER, D. W.; CROSS, J. M.; BARRETO, J. C.; STROBEL, N. H.; RUSSELL, D. H.; MILLER, T. A. Cholecystinin is a potent protective agent against alcohol-induced gastric injury in the rat. Role of endogenous prostaglandins. **Dig. Dis. Sci.** v. 40, n. 3, p. 651-660, 1995.

OLIET, S. H.; BOURQUE, C. W. Steady-state osmotic modulation of cationic conductance in neurons of rat supraoptic nucleus. **Am J Physiol.** v. 265, n. 6 Pt 2, p. 1475-1479, 1993.

PATHAK, R.; ASAD, M.; HRISHIKESHAVAN, H. J.; PRASAD, S. Effect of peroxisome proliferator-activated receptor-alpha agonist (bezafibrate) on gastric secretion and gastric cytoprotection in rats. **Fundam. Clin. Pharmacol.** v. 21, n. 3, p. 291-296, 2007.

PEREIRA, D. T. B.; VENDRAMINI, R. C.; DAVID, R. B.; NOZAKI, P. N.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. **Physiol. Behav.** v. 75, p. 443-448, 2002.

PEREIRA, D. T. B.; DAVID, R. B.; VENDRAMINI, R. C.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. Potassium intake during cell dehydration. **Physiol. Behav.** v. 85, p. 99-106, 2005.

ROWLAND, N. E.; COLBERT, C. L. Sodium appetite induced in rats by chronic administration of a thiazide diuretic. **Physiol. Behav.** v. 79, n. 4-5, p. 613-619, 2003.

STECHER, B; HARDT, W.-D. The role of microbiota in infectious disease. **Trends in Microbiol.** v. 16, n. 3, p. 107-114, 2008.

TAKEUCHI, K.; OHUCHI, T.; OKABE, S. Endogenous nitric oxide in gastric alkaline response in the rat stomach after damage. **Gastroenterology.** v. 106, p. 367-374, 1994.

TORDOFF, M. G. Voluntary intake of calcium and other minerals by rats. **Am. J. Physiol.** v. 267, n. 2 Pt 2, p. 470-475, 1994.

YAMAMOTO, K.; NAKAI, M.; NOHARA, K.; YAMATODANI, A. The anti-cancer drug-induced pica in rats is related to their clinical emetogenic potential. **Europ. J. Pharmacol.** v. 554, p. 34-39, 2007.