
Universidade Federal de São Carlos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

PIPGCF UFSCar/UNESP

DIULIE GRAZIELA FELIPE CAVASSIM

**INGESTÃO E PALATABILIDADE AO SÓDIO RELACIONADOS AOS
MECANISMOS INIBITÓRIOS DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL
EM MODELOS DE DESIDRATAÇÃO INTRACELULAR E
EXTRACELULAR**

ARARAQUARA

2019

Universidade Federal de São Carlos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

PIPGCF UFSCar/UNESP

DIULIE GRAZIELA FELIPE CAVASSIM

**INGESTÃO E PALATABILIDADE AO SÓDIO RELACIONADOS AOS
MECANISMOS INIBITÓRIOS DO NÚCLEO PARABRAQUIAL LATERAL
EM MODELOS DE DESIDRATAÇÃO INTRACELULAR E
EXTRACELULAR**

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

Orientadora: Carina A. Fabricio de Andrade

ARARAQUARA

2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Diulie Graziela Felipe Cavassim, realizada em 06/09/2019:



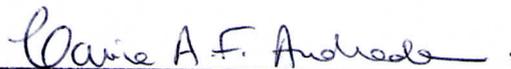
Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade
UNESP



Profa. Dra. Patricia Maria de Paula
UNESP

Prof. Dr. Lisandra Brandino de Oliveira
UFOP

Certifico que a defesa realizou-se com a participação à distância do(s) membro(s) Lisandra Brandino de Oliveira e, depois das arguições e deliberações realizadas, o(s) participante(s) à distância está(ão) de acordo com o conteúdo do parecer da banca examinadora redigido neste relatório de defesa.



Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade

DEDICATÓRIA

Ao Deus Altíssimo, ao meu esposo, Rodrigo Cavassim, à todos meus familiares (principalmente meus pais) e aos amigos pelo apoio que me concederam, dando-me a força necessária para a chegada até aqui.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Pai, Deus filho e ao Deus Espirito Santo, primeiramente por ter sustentado meus pés vacilantes, por sempre guardar a minha vida durante todas as viagens, a todo tempo mostrando-me os seus propósitos em minha vida, debaixo de suas asas fico tranquila.

Ao meu esposo Rodrigo Cavassim, o qual sempre me apoiou desde a época que o mestrado era apenas um sonho, suportando a distância, dando-me forças para seguir em frente, mesmo nos momentos de maior angustia e saudade, sempre esteve comigo, as palavras nunca serão o suficiente para expressar a minha gratidão.

Aos meus pais Sebastião e Cleusa, que sempre me receberam de braços abertos em sua casa, sempre apoiando as minhas escolhas e orando em todo tempo, pedindo proteção para a minha vida, durante as minhas viagens, meus queridos pais, que nunca esconderam seu orgulho de mim.

Aos meus irmãos Peterson e Robson, meus queridos sobrinhos que deram alegria e sentido para a minha vida, agradeço aos demais familiares, que sempre me deram o conforto e todo incentivo necessário.

A minha orientadora, professora Dra. Carina A. Fabricio de Andrade, pela confiança em mim depositada, por aceitar o desafio de me orientar, tendo sempre os ouvidos atentos para minhas dúvidas, além de transmitir todos os seus ensinamentos com paciência, serenidade e inspiração.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara e do programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos, especialmente ao professor Dr. Laurival A. De Luca Junior que com muita paciência ensinou-me sobre os conceitos fundamentais de fisiologia do comportamento, além de sempre ser um conselheiro nos momentos de dúvidas, minha gratidão e admiração! E ao professor Dr. José Vanderlei Menani, principalmente por sempre atender com humildade e paciência a todos os alunos do laboratório.

A professora Dra. Patrícia Maria de Paula pela oportunidade de aprender com sua excelente didática.

Aos amigos Emilson, Aline, Rayssa, Jéssica e Elaine pela essencial ajuda nos longos experimentos e análises, pelo companheirismo e apoio direto em todo esse trabalho, que Deus os retribua e os abençoe! Existem amigos que são mais chegados do que irmãos...

A Dra. Glaucia, pelo apoio e dedicação em passar os seus conhecimentos.

A minha amiga Dra. Mariana Lauar, que mesmo distante me ouviu, me confortou e transmitiu confiança em meu trabalho, sou grata a Deus por você!

Silas Pereira Barbosa pela paciência em transmitir seus conhecimentos, dedicação e amor pela fisiologia.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara Silvana A. D. Malavolta, Carla Molina, Mikail D. dos Santos e Ana V. de Oliveira por todo o suporte necessários para a execução desse trabalho.

Aos demais colegas de laboratório que de alguma forma contribuíram para o desenvolvimento desse trabalho, muito obrigada!

Ao Centro Universitário de União da Vitória-UNIUV, especialmente aos professores Marcelo e Sérgio (coordenadores do curso de odontologia), pelo apoio e incentivo incondicional, por sempre compreenderem minha ausência em alguns momentos.

Aos meus queridos alunos, por que sempre compreenderam os momentos de ausência em sala de aula, sempre procurei ser o melhor para vocês, fisiologia não é fácil, mas é possível!

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

À Agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e também a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), que através do auxílio financeiro e suporte tornou-se possível a realização desse trabalho.

“Os mais poderosos intelectos da Terra não podem compreender a Deus. Os Homens podem estar sempre a pesquisar, sempre a aprender, e ainda há, para além, o infinito.”

Ellen Gould Whitte

RESUMO

Várias evidências correlacionam o consumo excessivo de sal ao desenvolvimento ou agravamento de doenças crônicas, incluindo a hipertensão e doenças cerebrovasculares. Apesar disso, a causa desse comportamento excessivo permanece ainda mal compreendida. Um fator que pode contribuir para o uso excessivo de sal na dieta é a sua capacidade de melhorar a palatabilidade dos alimentos. Um importante mecanismo inibitório para o controle da ingestão de sódio já foi descrito para o núcleo parabraquial lateral (NPBL), estrutura bilateralmente localizada na ponte. Estudos anteriores demonstraram que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL com injeções bilaterais de moxonidina produz um potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M induzida por desidratação extracelular, prolongando o aumento da palatabilidade ao sódio induzido por depleção de sódio. Embora o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL produza uma ingestão paradoxal de NaCl 0,3 M em ratos com desidratação intracelular, ainda é desconhecido se ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL poderia alterar a palatabilidade ao sódio nessas condições. No presente estudo foram avaliados: 1) a palatabilidade e apetite ao sódio induzido por 24 horas de privação hídrica (modelo de desidratação intracelular e extracelular), e 2) a palatabilidade ao sódio em ratos submetidos a sobrecarga intragástrica (desidratação intracelular), após a administração de moxonidina ou veículo no NPBL. Os presentes resultados mostram que a administração unilateral de moxonidina no NPBL não alterou a palatabilidade ao NaCl 0,3 M em ratos submetidos a sobrecarga intragástrica (desidratação intracelular) em relação ao tratamento controle, embora o grupo tratado com moxonidina tenha apresentado o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M. Já a administração bilateral de moxonidina no NPBL não alterou o apetite ao sódio induzido por 24 h de privação hídrica seguida de reidratação parcial em relação ao tratamento com veículo. Contudo, quando não foi permitido aos animais a reidratação parcial, ou seja, acesso imediato por duas horas à água e simultaneamente ao NaCl 0,3 M, observou-se um potente aumento da ingestão de sódio hipertônico após a administração de moxonidina no NPBL. Em outro grupo de animais, sem implantes no NPBL foi verificado um aumento das respostas hedônicas a infusão intraoral de NaCl 0,3 M após o período de 24 horas de privação hídrica em relação a condição basal (normoidratação), reestabelecendo-se os valores basais após o período de reidratação parcial. Os presentes resultados sugerem que o efeito da moxonidina evidenciado apenas após o período de privação hídrica, sem a prévia reidratação parcial, poderia estar associado ao aumento das respostas hedônicas a infusão intraoral de NaCl 0,3 M observado nessas condições. Contudo, em relação a desidratação intracelular, exclusivamente, o tratamento com injeções unilaterais no NPBL com moxonidina promoveu o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M sem alterações na palatabilidade para essa solução.

Palavras-chave: desidratação, apetite ao sódio, palatabilidade, comportamento ingestivo, tronco encefálico.

ABSTRACT

Several evidences correlate excessive salt intake with the development or aggravation of chronic diseases, including hypertension and cerebrovascular diseases. One factor that could contribute to excessive salt intake is its ability to improve the palatability of foods. An important inhibitory mechanism for the control of sodium intake has been described for the lateral parabrachial nucleus (LPBN), structure bilaterally located in the pons. Previous studies have shown that LPBN α_2 -adrenergic receptors activation with bilateral injections of moxonidine produces a potent increase in extracellular dehydration-induced 0.3 M NaCl intake, prolonging the increase in sodium palatability induced by sodium depletion. Although blocking LPBN inhibitory mechanisms produces a paradoxical intake of 0.3 M NaCl in rats with intracellular dehydration, it is still unknown whether activation of α_2 -adrenergic receptors in LPBN could alter sodium palatability under these conditions. Here we investigated: 1) sodium palatability and appetite induced by 24 hours of water deprivation (intracellular and extracellular dehydration model), and 2) sodium palatability in rats submitted to intragastric overload (intracellular dehydration) after administration of moxonidine or vehicle in LPPN. Present results showed that in rats submitted to 2 M NaCl (2 ml/rat) intragastric overload (intracellular dehydration) unilateral administration of moxonidine (α_2 -adrenergic/ I_1 imidazoline receptors agonist) into the LPBN did not change palatability to NaCl compared to vehicle treatment, although the moxonidine-treated group showed increased 0.3 M NaCl intake. When bilaterally injected into the LPBN, moxonidine did not change 24 h water deprivation-induced sodium appetite followed by partial rehydration period when compared to vehicle treatment. However, when animals were not allowed to be partially rehydrated, i.e., they had immediate and simultaneous access to water and 0.3 M NaCl during two hours, there was a potent increase in hypertonic sodium intake after bilateral moxonidine injections into the NPBL. In another group of animals without LPBN cannulas, there was an increase in hedonic responses frequency to intra-oral infusion of 0.3 M NaCl after 24 h water deprivation in relation to basal condition (normohydration), recovering to basal values after the partial rehydration period. The present results suggest that the increase in NaCl intake, evidenced only after water deprivation period, without previous partial rehydration, could be associated with the increase of hedonic responses frequency to intraoral infusion. However, with regard to intracellular dehydration exclusively, moxonidine unilateral LPBN injections promoted an increase in 0.3 M NaCl intake without changes in palatability for this solution.

Key words: dehydration, sodium appetite, palatability, ingestive behavior, brainstem.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Esquema do protocolo experimental para avaliação apetite ao sódio induzido por privação hídrica e reidratação parcial após administração de moxonidina no NPBL.....27
- Figura 2.** Esquema do protocolo experimental para avaliação da ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzido por privação hídrica após administração de moxonidina no NPBL.....28
- Figura 3.** Esquema do protocolo experimental para estudo da palatabilidade ao NaCl 0,3 M após o protocolo de privação hídrica, após a reidratação parcial e durante a fase do apetite ao sódio.....29
- Figura 4.** Esquema do protocolo experimental para estudo da palatabilidade ao sódio em animais com desidratação intracelular após administração UNILATERAL de moxonidina no NPBL.....31
- Figura 5.** Fotomicrografia de corte coronal de encéfalo de animal representativo dos grupos testados mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicados pelas setas) **A)** bilateral e **B)** unilateral em ratos Holtzman. pcs, pedúnculo cerebelar superior.....33
- Figura 6.** Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica e reidratação parcial (PH-RP) que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais.....35
- Figura 7.** Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica que receberam injeções **bilaterais** de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais.....37
- Figura 8.** Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica que receberam injeções **unilaterais** de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais.38
- Figura 9.** A) Respostas hedônicas e B) respostas aversivas ao teste de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M em diferentes condições: 1) saciados; 2) após o período de privação hídrica; 3) após o período de reidratação parcial; 4) após apetite ao sódio Valores são representados como média ± EPM; N = número de animais por grupo40
- Figura 10.** Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos submetidos a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M i.g. (2 ml/rato) que receberam injeções **unilaterais** de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais.....42
- Figura 11.** A) Respostas hedônicas e B) respostas aversivas ao teste de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M em ratos submetidos a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M i.g. (2 ml/rato) que receberam injeções **unilaterais** de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais.....43
-
-

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANG I – angiotensina I;
ANG II – angiotensina II;
ANOVA – análise de variância;
ANP – peptídeo natriurético atrial;
ASM - área septal medial
AVP - arginina vasopressina
AP – área postrema;
AT1 – receptor de angiotensina do subtipo AT1
AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo;
ECA – enzima conversora de angiotensina
EPM – erro padrão da média;
g – grama(s);
h – hora(s);
HTZ – Holtzman
HCO⁻³ – íon bicarbonato
ICV- intracerebroventricular
IO – intra-oral
kg – quilograma(s);
LEC- líquido extracelular
LCE- Líquido cerebrospinal
M – molar (número de mols/litro)
mg – miligrama(s);
min – minutos
ml – mililitro(s);
MnPO – núcleo pré-óptico mediano;
mOsm – miliosmol(es);
NaCl – cloreto de sódio
NPBL – núcleo parabraquial lateral;
NPV – núcleo paraventricular;
NSO – núcleo supra-óptico;
NTS – núcleo do trato solitário;
OCVs – órgãos circunventriculares;

OSF – órgão subfornical;
OT – ocitocina;
OVLT – órgão vasculoso da lâmina terminal;
P.C. – peso corporal
PH – privação hídrica
RP – reidratação parcial
s.c. – subcutâneo/subcutaneamente
SNC – sistema nervoso central
TRS – teste de reatividade ao sabor
VEI – veículo
 μg – micrograma(s);
 μl – microlitro(s);
 μm – micrometro (s)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. OBJETIVO	21
3. MATERIAIS E MÉTODOS	22
3.1. Animais.....	22
3.2. Cirurgia para implante de cânula intraoral e cânulas em direção ao NPBL.....	22
3.3. Fármacos utilizados	23
3.4. Injeções de fármacos no NPBL	24
3.5. Teste de reatividade ao sabor	24
3.6. Confirmação dos pontos de injeção no NPBL	25
3.7. Análise estatística	25
3.8. Protocolos experimentais.....	25
3.8.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por privação hídrica após administração de moxonidina no NPBL. 27	
3.8.3 Alterações da palatabilidade ao NaCl 0,3 M após o protocolo de privação hídrica, após a reidratação parcial e durante a fase do apetite ao sódio.	28
3.8.4 Palatabilidade ao sódio em animais com desidratação intracelular após administração de moxonidina no NPBL.....	29
4. RESULTADOS	31
4.1. Análise histológica	31
4.2. Apetite ao sódio induzido por privação hídrica e reidratação parcial após administração de moxonidina no NPBL.	33
5. DISCUSSÃO	43
6. CONCLUSÃO.....	49
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1. INTRODUÇÃO

A quantidade total de água representa cerca de 60% do peso corporal de um adulto, e encontra-se distribuída em dois compartimentos: líquido extracelular e líquido intracelular. O sódio é o principal íon osmoticamente ativo do líquido extracelular, e por isso, a regulação precisa de sua concentração é fundamental para a regulação do volume e osmolaridade plasmáticos (VERBALIS, 2003).

A ingestão de água e de alimentos que contêm sódio são respostas comportamentais fundamentais para um indivíduo repor suas necessidades de água e NaCl. Esses comportamentos ingestivos são regulados por mecanismos ativados em situações de hipovolemia ou alterações de osmolaridade plasmática e dependem de informações aferentes detectados por sensores em diferentes partes do corpo (por exemplo, barorreceptores e osmorreceptores) ou hormônios (angiotensina II e aldosterona) que atuam em seus respectivos receptores em algumas regiões específicas do sistema nervoso central (SNC) (JOHNSON, A.; THUNHORST, R., 2007).

Quando a concentração extracelular de sódio aumenta, ocorre um aumento da pressão osmótica efetiva no líquido extracelular, o que promoverá o movimento de água para fora das células e, conseqüentemente, redução do volume de líquido intracelular. A redução do volume do líquido celular é característica da desidratação celular (DE LUCA JR; VIVAS; MENANI, 2005). A ativação dos osmorreceptores centrais em resposta a aumento de osmolaridade plasmática desencadeia a sede e liberação do hormônio vasopressina (AVP) (VERNEY, 1947). A sede é o nome dado a um estado de deficiência de água, está intimamente associada ao desejo de ingerir água, levando o animal a busca, obtenção e consumo ou ingestão hídrica (WOOD; ROLLS; ROLLS, 1982). Estudos mais recentes demonstraram que indivíduos com aumento da osmolaridade podem saciar a sede em segundos, antes mesmo que ocorra a correção da osmolaridade do LEC (EGAN et al., 2003; ZHANG; BOURQUE, 2008).

Em situações de hemorragia, vômitos e diarreias ou depleção de sódio ocorre diminuição do volume do líquido extracelular, promovendo a desidratação extracelular (DE LUCA JR; VIVAS; MENANI, 2005). Neste caso, em resposta a hipovolemia a sede e apetite ao sódio serão estimulados. O apetite ao sódio é caracterizado pelo estado motivacional pela procura, aquisição e consumo do sódio em animais com deficiência desse íon, sendo inato e específico ao sódio (EPSTEIN, 1991). Ao contrário da sede, o apetite ao sódio manifesta-se apenas horas depois em animais hipovolêmicos (QUARTERMAIN; MILLER; WOLF, 1967; DAVID; MENANI; DE LUCA, 2008).

Vários estudos mostram aumento da preferência ao sódio em indivíduos submetidos a diversas situações em que o balanço hidromineral está alterado, como por exemplo, administração de diuréticos acompanhada de dieta hipossódica, privação hídrica mais sudorese, hemodiálise e gestação (BEAUCHAMP et al., 1990; TAKAMATA et al., 1994; LESHEM; RUDOY, 1997; DUFFY et al., 1998; DE SOUZA et al., 2012).

A ingestão de sódio na forma de solução hipertônica tem sido enfaticamente considerada como critério da expressão do apetite ao sódio em modelos animais, devido ao fato de que a ingestão de soluções mais diluídas, como por exemplo NaCl isotônico, podem ocorrer durante a fase inicial da depleção de sódio; porém, a ingestão de solução hipertônica de NaCl ocorre apenas na fase tardia da depleção de sódio, quando o apetite ao sódio está completamente estabelecido (BRESLIN; SPECTOR; GRILL, 1993; FITZSIMONS, 1998; PEREIRA et al., 2002; JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L., 2007).

A privação hídrica por longos períodos pode levar a perda de água dos dois compartimentos simultaneamente, resultando em desidratação dupla ou absoluta. Desse modo a desidratação quando mantida por extensos períodos pode causar diversas consequências, desde o comprometimento da termorregulação, choque hipovolêmico e morte (DE LUCA JR; VIVAS; MENANI, 2005; GUYTON; HALL, 2006). Experimentalmente, o protocolo de 24 h de privação

hídrica (PH) seguido de 2 h de livre acesso à água para reidratação parcial (RP), permite ao rato saciar a sede ingerindo apenas água durante a RP, estudando assim separadamente a sede do apetite ao sódio (SATO; YADA; DE LUCA, 1996; DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010).

Embora a ingestão de água de substâncias salgadas seja necessária para repor as deficiências de sódio do organismo, várias evidências correlacionam o consumo excessivo de sal ao desenvolvimento ou agravamento de doenças crônicas, incluindo a hipertensão (HE; MACGREGOR, 2012; WHO, 2012). Dados atuais da OMS, mostram que as doenças cardiovasculares são a maior causa de mortes no mundo (WHO, 2017). Estima-se que a quantidade média diária de sódio consumida pela população brasileira adulta é de 4,5 g por pessoa, independente da região ou classe de renda, excedendo assim em mais de duas vezes o limite recomendado pela OMS para ingestão desse nutriente (SARNO et al., 2013), sendo que no Brasil a população adulta em geral ainda apresenta um estimado consumo de sal bem elevado acima das recomendações (MILL et al., 2019).

Apesar de evidências substanciais que indicam que a ingestão diária de sal excede em grande parte a necessidade fisiológica, a causa desse comportamento excessivo permanece mal compreendida. Um fator que pode contribuir para o uso excessivo de sal na dieta é a sua capacidade de melhorar a palatabilidade dos alimentos (KEAST; BRESLIN, 2003; LIEM; MIREMADI; KEAST, 2011). A adesão a uma dieta com baixo teor de sódio mostrou-se extremamente difícil de manter, com muitos pacientes relatando falta de palatabilidade para alimentos com baixo teor de sódio como uma das razões importantes para a não continuidade (HORVATHOVA et al., 2003; HOLLENBERG, 2006).

Considerando que humanos, primatas não humanos e ratos exibem expressões faciais estereotipadas em resposta a diferentes sabores aplicados diretamente na cavidade oral, a avaliação dessas expressões pode ser usada como uma medida comportamental do valor hedônico do sabor,

ou seja, da palatabilidade ao sabor (GRILL; NORGREN, 1978; BERRIDGE, 2000; 2004; BERRIDGE; KRINGELBACH, 2008; BERRIDGE, 2013).

Dados anteriores da literatura mostraram que, em ratos normotensos, o padrão de reatividade gustatória induzido por infusões orais de NaCl 0,5 M muda de um perfil de componentes hedônicos e aversivos (durante condições normais) para exclusivamente hedônicos (após a depleção de sódio), (BERRIDGE et al., 1984), concluindo que a palatabilidade de soluções salinas altamente concentradas aumenta em ratos normotensos com depleção de sódio. Contudo, os mecanismos neuroquímicos associados a tais aumentos na frequência de respostas hedônicas ainda não foram completamente esclarecidos.

O papel do NPBL na inibição da ingestão de sódio

No tronco cerebral, um importante mecanismo inibitório para o controle da ingestão de água e especialmente de sódio foi descrito para o núcleo parabraquial lateral (NPBL), [para revisão vide (ANDRADE et al., 2014; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014)]. O NPBL exerce uma forte influência inibitória sobre a ingestão de NaCl, provavelmente para prevenir ingestão excessiva de solutos (ANDRADE et al., 2004; CALLERA et al., 2005; ANDRADE et al., 2006; DE OLIVEIRA et al., 2007; DE OLIVEIRA; DE LUCA; MENANI, 2008; DE GOBBI et al., 2009; ANDRADE-FRANZE; ANDRADE; DE LUCA; DE PAULA; COLOMBARI; et al., 2010; ANDRADE-FRANZE; ANDRADE; DE LUCA; DE PAULA; MENANI, 2010; ANDRADE et al., 2011; RONCARI et al., 2011; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014; RONCARI et al., 2014; GASPARINI; MENANI; DANIELS, 2015).

A ativação farmacológica de receptores serotoninérgicos no NPBL pelo hidrobrometo de 2,5-dimetoxi-4-iodo-anfetamina (DOI, agonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) reduz a ingestão de sódio induzida pela hipovolemia sugerindo a participação destes receptores no mecanismo serotoninérgico antinatriorexigênico presente no NPBL (MENANI; THUNHORST; JOHNSON, 1996;

FRATUCCI DE GOBBI et al., 2001). A injeção da própria serotonina no NPBL também reduz a ingestão de sódio em animais submetidos à privação hídrica, demonstrando que a atividade deste neurotransmissor no NPBL é predominantemente antinatriorexigênica (DE GOBBI et al., 2005).

Estudos subsequentes demonstraram o papel de outros neurotransmissores na modulação do mecanismo antinatriorexigênico do NPBL. Em animais hipovolêmicos, a ativação adrenérgica, purinérgica e GABAérgica, assim como a desativação colecistocininérgica potencializam o apetite ao sódio em animais hipovolêmicos (MENANI; JOHNSON, 1998; ANDRADE et al., 2004; CALLERA et al., 2005; GASPARINI et al., 2009). O agonista opioidérgico β -endorfina, o agonista de receptores GABA_B baclofeno e o muscimol (agonista de receptores GABA_A) injetados no NPBL promovem ingestão de água e sódio em animais hidratados (CALLERA et al., 2005; DE OLIVEIRA; DE LUCA; MENANI, 2008; DE OLIVEIRA et al., 2011), sendo sugerido que este efeito do muscimol depende da ativação de receptores angiotensinérgicos centrais, talvez pelos tônus angiotensinérgico basal (RONCARI et al., 2011). É importante frisar que a metisergida no NPBL desinibe a ingestão de sódio somente na presença de um sinal relacionado à desidratação, diferentemente da ativação GABAérgica ou opioidérgica, que também promove natriorexigênese em ratos hidratados.

A ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL com injeções bilaterais de moxonidina produz um potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M em ratos (Andrade et al., 2004) e altera o padrão de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M em animais depletados de sódio agudamente (ANDRADE et al., 2011), sugerindo que as injeções de moxonidina no NPBL reduzem os sinais inibitórios ativados em consequência da ingestão de NaCl hipertônico e água (ANDRADE et al., 2011; ANDRADE et al., 2014). Em outras palavras, o tratamento com moxonidina no NPBL parece bloquear o declínio relacionado à saciedade das respostas hedônicas e/ou aumentar as respostas aversivas que normalmente ocorrem durante e após o consumo de NaCl 0,3 M e água induzidas pela depleção aguda de sódio.

Em animais submetidos a desidratação intracelular (induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M), a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL com injeções bilaterais de moxonidina produz uma ingestão paradoxal de NaCl 0,3 M. Contudo, ainda permanece desconhecido se o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL durante essa situação poderia alterar a palatabilidade ao NaCl 0,3 M, o que poderia explicar essa ingestão de sódio absolutamente desnecessária nesta situação de hiperosmolaridade plasmática.

2. OBJETIVO

Considerando que a) a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL parece bloquear o declínio relacionado à saciedade das respostas hedônicas e/ou aumentar as respostas aversivas que normalmente ocorrem durante e após o consumo de NaCl 0,3 M e água induzidas pela depleção aguda de sódio; b) a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL promove uma ingestão paradoxal NaCl 0,3 M em condições de desidratação intracelular; c) ainda é desconhecido se a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL pode alterar o apetite ao sódio induzido por 24 horas de privação hídrica (modelo de desidratação intracelular e extracelular), com ou sem prévia reidratação parcial; d) não se conhece para o modelo de privação hídrica, com ou sem prévia reidratação parcial, promove desvio da palatabilidade ao sódio; os objetivos do presente trabalho foram:

1. Investigar os efeitos da moxonidina no NPBL sobre o apetite ao sódio induzido por 24 horas de privação hídrica (modelo de desidratação intracelular e extracelular), com ou sem prévia reidratação parcial.
2. Verificar se a privação hídrica de 24 horas promove desvio da palatabilidade ao sódio.
3. Verificar se a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL altera a palatabilidade e ingestão de NaCl 0,3 M de ratos com desidratação intracelular (aumento de osmolaridade plasmática).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman, adultos, provenientes do Biotério Central da FOAr (Campus de Araraquara), com peso entre de 280 - 310 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável suspensas em estantes (gaioleiros) no biotério da Fisiologia, com livre acesso a ração comercial e água. Os ratos foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade $50 \pm 10\%$) com ciclo claro-escuro 12-12 h (luz 7:00 – 19:00 h). Os protocolos experimentais realizados foram aprovados previamente pela CEUA 18/2015; 02/2016 e 13/2016.

3.2. Cirurgia para implante de cânula intraoral e cânulas em direção ao NPBL

Todos materiais cirúrgicos foram devidamente esterilizados em autoclave (vapor saturado sobre pressão a 134°C), para a prevenção do processo infeccioso. Sob a anestesia (cloridrato de cetamina, 80 mg/kg p.c. combinada com xilazina, 7 mg/kg p.c.), a região superior da cabeça foi tricotomizado e realizada a antisepsia na superfície da cabeça com álcool iodado a 0,1%. A cabeça do animal foi então fixa a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900), seguida de uma incisão sagital na pele da cabeça, exposição da superfície do crânio e inserção de dois parafusos na mesma para fixação das cânulas. Logo após o animal foi removido do estereotáxico para o implante da cânula intraoral. A cânula intraoral consiste de tubo de polietileno P50 com uma de suas extremidades alargada e um “stop” de silicone endodôntico fixado a ela. Um sistema de agulhas (confeccionado a partir de uma agulha de 23G inserida e fixada a uma agulha de 18G) é utilizado para orientar o implante da cânula. A ponta ativa da agulha de 18G permanece livre para guiar o sistema cânula intraoral/sistema de agulhas através do fundo de vestibulo na região de primeiro molar em direção a margem da musculatura mastigatória que faceia o osso temporal sob o arco

zigomático, seguindo dorsal ao olho e externalizando no topo do crânio. A extremidade da cânula intraoral com o “stop” de silicone permanece no fundo de vestibulo. O sistema de agulhas é então substituído por uma cânula de aço de 10 mm. No mesmo ato cirúrgico deu-se prosseguimento a cirurgia de implante de cânulas bilaterais em direção ao NPBL, colocando o animal novamente no aparelho estereotáxico.

Para atingir a região do NPBL, cânulas foram posicionadas bilateralmente no encéfalo de acordo com as seguintes coordenadas: 9,2 mm caudal ao bregma, 2,1 mm lateral à linha mediana e 3,5 mm abaixo da dura-máter, (PAXINOS; WATSON, 2004). Nesses pontos foi realizada outra trepanação no crânio, abrindo-se orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro onde as cânulas foram introduzidas, utilizando-se o bregma foram determinados os pontos para a introdução de cânulas de aço inoxidável de 12 x 0,5 mm d.i. (diâmetro interno) nas cabeças dos ratos. As cânulas foram então fixadas nas cabeças dos ratos com o auxílio da resina acrílica. Após sua completa secagem, foi introduzido o mandril na cânula e o animal foi retirado do aparelho estereotáxico. Após as cirurgias os ratos receberam injeções profiláticas de penicilina (20.000 unidades via intramuscular na dose de 0,2 ml/rato) e do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,3 ml/rato) via subcutânea.

Diariamente os ratos foram manipulados e treinados com manobras utilizadas para a realização dos procedimentos experimentais. Os experimentos foram realizados 5 dias após a cirurgia. A cânula intraoral não interfere com o comportamento alimentar normal do animal e permite infusão direta de soluções no interior da boca.

3.3.Fármacos utilizados

Cloridrato de moxonidina, agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, (Sigma, Saint Louis, MO, USA) foi dissolvida em mistura de propilenoglicol e água (2:1). A dose de

moxonidina escolhida para este estudo foi baseada em trabalhos anteriores (ANDRADE et al., 2015; CABRAL; ANDRADE, 2016). **Solução de NaCl 0,3 M**, disponível ad libitum e também para administração intraoral, 1 ml/min, 2 vezes. **NaCl 2 M**, administração intragástrica (gavagem), 2 ml/rato, 2 vezes.

3.4. Injeções de fármacos no NPBL

Os fármacos ou respectivos veículos foram administrados no NPBL dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µl), conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no encéfalo pelas cânulas guias previamente fixadas. A cânula injetora (0,3 mm diâmetro) era 2 mm mais longa do que a cânula guia. O volume de injeção no NPBL foi de 0,2 µl de cada lado.

3.5. Teste de reatividade ao sabor

Previamente aos experimentos, os animais foram submetidos a um período de habituação por 3 dias, no qual eles foram expostos por 10 min à caixa de vidro onde se realizará o teste da reação ao sabor e a seguir, foi feita de infusão de 1 ml de água pela cânula intra-oral. No momento do experimento, a cânula intra-oral foi conectada a um tubo de polietileno (PE 50), para a infusão da solução diretamente na cavidade oral do rato. O rato foi então colocado na caixa de teste e em seguida foi feita a infusão da solução de NaCl 0,3 M na cavidade oral do rato (1 ml/min). O comportamento do rato foi gravado por meio de uma filmadora, com o auxílio de um espelho montado abaixo do fundo transparente da caixa, que permite a câmera aproximar a imagem de tal forma que a face do rato ocupe a tela inteira. O teste de reação ao sabor e a subsequente análise dos comportamentos foi realizado conforme descrito em estudos anteriores (GRILL; NORGRÉN, 1978; GRILL; BERRIDGE, 1985; BERRIDGE, 2000; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2019). As gravações foram analisadas em câmera lenta em 1/30 a 1/10 da velocidade normal.

3.6. Confirmação dos pontos de injeção no NPBL

Terminados os experimentos, os ratos com implantes de cânulas no NPBL foram profundamente anestesiados (tiopental sódico, 80 mg/kg) e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração de solução salina tamponada (50 ml) seguida de solução de formalina 10% (50 ml). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram corados pelo método Giemsa e analisados para se localizar os pontos das injeções de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS; WATSON, 2004).

3.7. Análise estatística

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média estão representados em gráficos (resultados). Análise de variância para medidas repetidas (RM ANOVA) de uma ou duas vias seguidas do pós-teste de Newman Keuls foram utilizados para as comparações dos dados. Diferenças foram consideradas para $p < 0,05$.

3.8. Protocolos experimentais

3.8.1 Apetite ao sódio induzido por privação hídrica e reidratação parcial após administração de moxonidina no NPBL.

Para esse teste os animais receberam apenas o implante de cânulas no NPBL.

O protocolo de privação hídrica e reidratação parcial – PH-RP foi feito de acordo com estudos prévios (DE LUCA et al., 2002; PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010). O modelo de privação hídrica com reidratação parcial com água por 2 horas (PH-RP) fornece subsídios para o estudo da sede e apetite ao sódio, separadamente. Foi aguardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Foram utilizados bebedouros graduados com divisão de 0,1 ml para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M.

Quinze minutos do término do período de reidratação parcial, ou seja, 15 min antes do acesso ao NaCl 0.3 M para o teste do apetite ao sódio, os animais receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo (0,2 μ l) no NPBL, Figura 1. A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi avaliada por 120 minutos, começando 15 após o acesso ao NaCl 0.3 M e água. Os animais foram submetidos a dois testes. Em cada teste os animais foram divididos em 2 grupos que receberam diferentes tratamentos no NPBL (veículo ou moxonidina). A sequência de tratamentos foi aleatória e no final dos testes todos os ratos receberam todos os tratamentos. Os testes foram realizados com intervalo mínimo de 72 h entre eles. Os animais que não ingeriram água (0 ml) até o término o período de reidratação parcial, e, portanto, não tiveram a sede saciada previamente ao teste do apetite ao sódio, foram excluídos da análise dos dados.

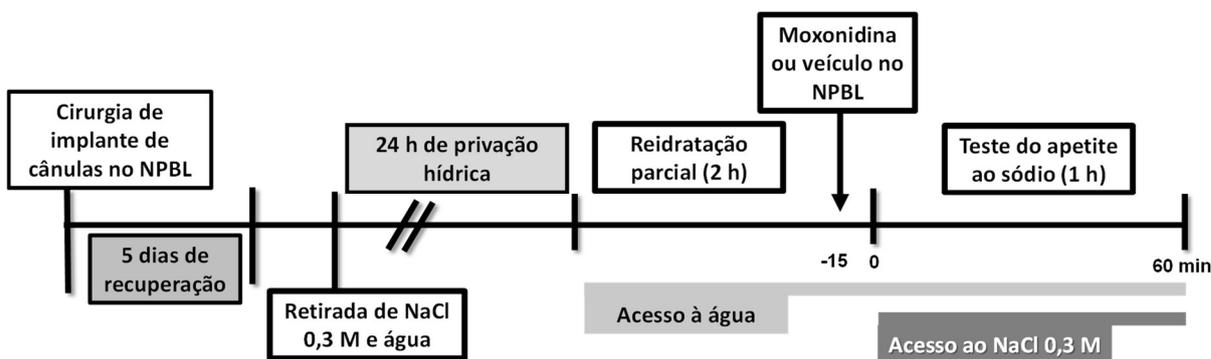


Figura 1: Esquema do protocolo experimental para avaliação do apetite ao sódio induzido por privação hídrica e reidratação parcial após administração de moxonidina no NPBL.

3.8.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por privação hídrica após administração de moxonidina no NPBL.

Para esse teste os animais receberam apenas o implante de cânulas no NPBL.

Os bebedouros de NaCl 0,3 M e de água foram removidas por 24 h, a ração habitual estava disponível para esses animais. Nesse experimento os animais não tiveram o período de reidratação parcial. Quinze minutos antes do acesso a água e NaCl 0,3 M para ingestão, os animais receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL, Figura 2. A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi medida a cada 30 minutos, totalizando 120 minutos após o acesso ao NaCl 0,3 M e água.

Os animais foram submetidos a dois testes. Em cada teste os animais foram distribuídos em 2 grupos que receberam diferentes tratamentos no NPBL (veículo ou moxonidina). A sequência de tratamentos foi aleatória e no final dos testes todos os ratos receberam todos os tratamentos. Os testes foram realizados com intervalo mínimo de 72 h entre eles.

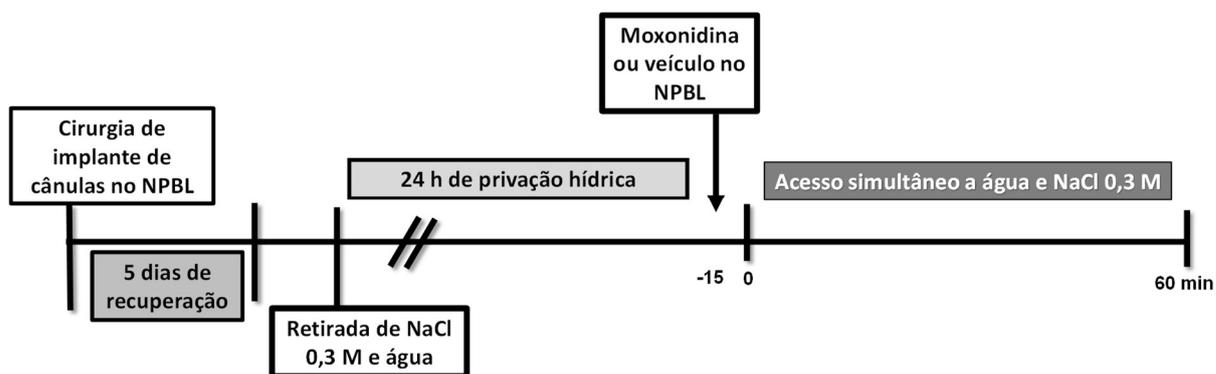


Figura 2: Esquema do protocolo experimental para avaliação da ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzido por privação hídrica após administração de moxonidina no NPBL.

3.8.3 Alterações da palatabilidade ao NaCl 0,3 M após o protocolo de privação hídrica, após a reidratação parcial e durante a fase do apetite ao sódio.

Para esse teste os animais receberam apenas o implante de uma cânula intra-oral, e passaram pelo período de habituação e demais procedimentos experimentais conforme descrito detalhadamente no item 2.5.

O teste de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M foi realizado nos mesmos animais em 4 momentos distintos: a) na condição basal (animais saciados); b) logo após o término das 24 h do período de privação hídrica (PH); c) imediatamente após o período de reidratação parcial (RP); d) após 60 min de livre acesso bebedouros graduados contendo água e NaCl 0,3 M (teste do apetite ao sódio), Figura 3. O volume de água e de NaCl 0,3 M ingerido durante os períodos de livre acesso a essas soluções também foi avaliado. Durante o experimento os ratos não tiveram acesso à ração.



Figura 3: Esquema do protocolo experimental para estudo da palatabilidade ao NaCl 0,3 M após o protocolo de privação hídrica, após a reidratação parcial e durante a fase do apetite ao sódio.

3.8.4 Palatabilidade ao sódio em animais com desidratação intracelular após administração de moxonidina no NPBL.

Para esse teste os animais receberam o implante de uma cânula intra-oral e cânulas guia em direção ao NPBL no mesmo ato cirúrgico, seguido do período de recuperação e ambientação para o teste de reatividade ao sabor. Além de água e ração, os ratos tiveram à disposição tubos com NaCl 0,3 M, desde pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos.

No momento do experimento, água, ração e NaCl 0,3 M foram removidos das gaiolas e os animais receberam sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M (2 ml/rato). Este procedimento foi utilizado para induzir uma desidratação intracelular, e, portanto ingestão de líquidos (FITZSIMONS, 1985), devido a uma elevação de cerca de 4 % da osmolaridade e concentração de sódio plasmática (PEREIRA et al., 2002). Quarenta e cinco minutos após a sobrecarga i.g., os ratos receberam injeções bilaterais no NPBL de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo.

Água e NaCl 0,3 M foram oferecidos aos animais uma hora após a sobrecarga intragástrica, ou seja, após 15 min das injeções no NPBL. Para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram utilizados tubos com divisão de 0,1 ml. Durante o período de teste da ingestão de água e NaCl os ratos não tiveram acesso à ração. Foi aguardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

O teste de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M foi realizado nos mesmos animais em 2 momentos distintos: a) 1 hora após a sobrecarga intragástrica; b) após 30 e c) 60 min de livre acesso simultâneo a bebedouros graduados contendo água e NaCl 0,3 M, Figura 4.

Os animais foram submetidos a dois testes. Em cada teste os animais foram divididos em 2 grupos que receberam diferentes tratamentos no NPBL (veículo ou moxonidina). A sequência de tratamentos foi aleatória e no final dos testes todos os ratos receberam todos os tratamentos. Os testes foram realizados com intervalo mínimo de 72 h entre eles.

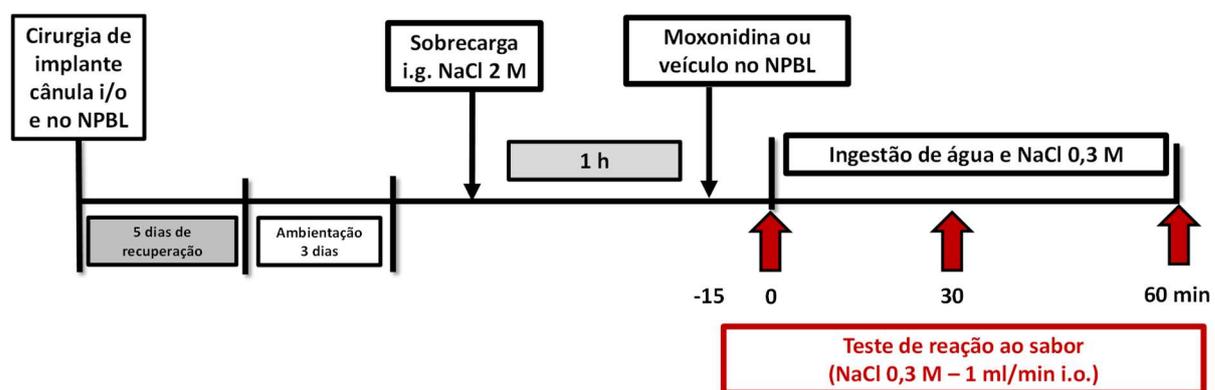


Figura 4: Esquema do protocolo experimental para estudo da palatabilidade ao sódio em animais com desidratação intracelular após administração UNILATERAL de moxonidina no NPBL.

4. RESULTADOS

4.1. Análise histológica

A figura 5A mostra injeções bilaterais típicas no NPBL. Os pontos de injeção foram localizados principalmente nas porções centro laterais e dorso lateral do NPBL [vide (FULWILER; SAPER, 1984) para definições dos subnúcleos do NPBL]. Os pontos de injeção do presente estudo são similares àqueles em que estudos anteriores mostraram os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de água e sódio (ANDRADE et al., 2004; DE GOBBI et al., 2009; ANDRADE et al., 2011; MENEZES et al., 2011; ANDRADE et al., 2012). Injeções que atingiram as porções ventro lateral e lateral externa, assim como o núcleo Kölliker-Fuse, foram observadas apenas em alguns ratos e os resultados desses animais foram incluídos na análise.

A figura 5B mostra exemplo implantes de cânulas guias em direção ao NPBL, mas que em apenas um lado teve injeção confirmada na área; enquanto o outro lado teve injeção localizada em região fora do NPBL (regiões dorsais, no cerebelo). Dessa forma, esses animais apresentaram injeções **unilaterais** no NPBL.

A)



B)



Figura 5: Fotomicrografia de corte coronal de encéfalo de animal representativo dos grupos testados mostrando os sítios de injeção no NPBL (indicados pelas setas) **A)** bilateral e **B)** unilateral em ratos Holtzman. pcs, pedúnculo cerebelar superior.

4.2. Apetite ao sódio induzido por privação hídrica e reidratação parcial após administração de moxonidina no NPBL.

O volume de água ingerido no período de reidratação parcial foi semelhante entre os grupos de animais ($13,7 \pm 1,3$; vs. veículo $11,9 \pm 1,7$ ml/120 min).

Em relação ao apetite ao sódio não foi verificada diferença no volume de NaCl 0,3 M ingerido entre os tratamentos, figura 6A [$F(1,12) = 0,742$; $p > 0,05$], nem na ingestão de água, Figura 6B, [$F(1,12) = 0,02$; $p > 0,05$].

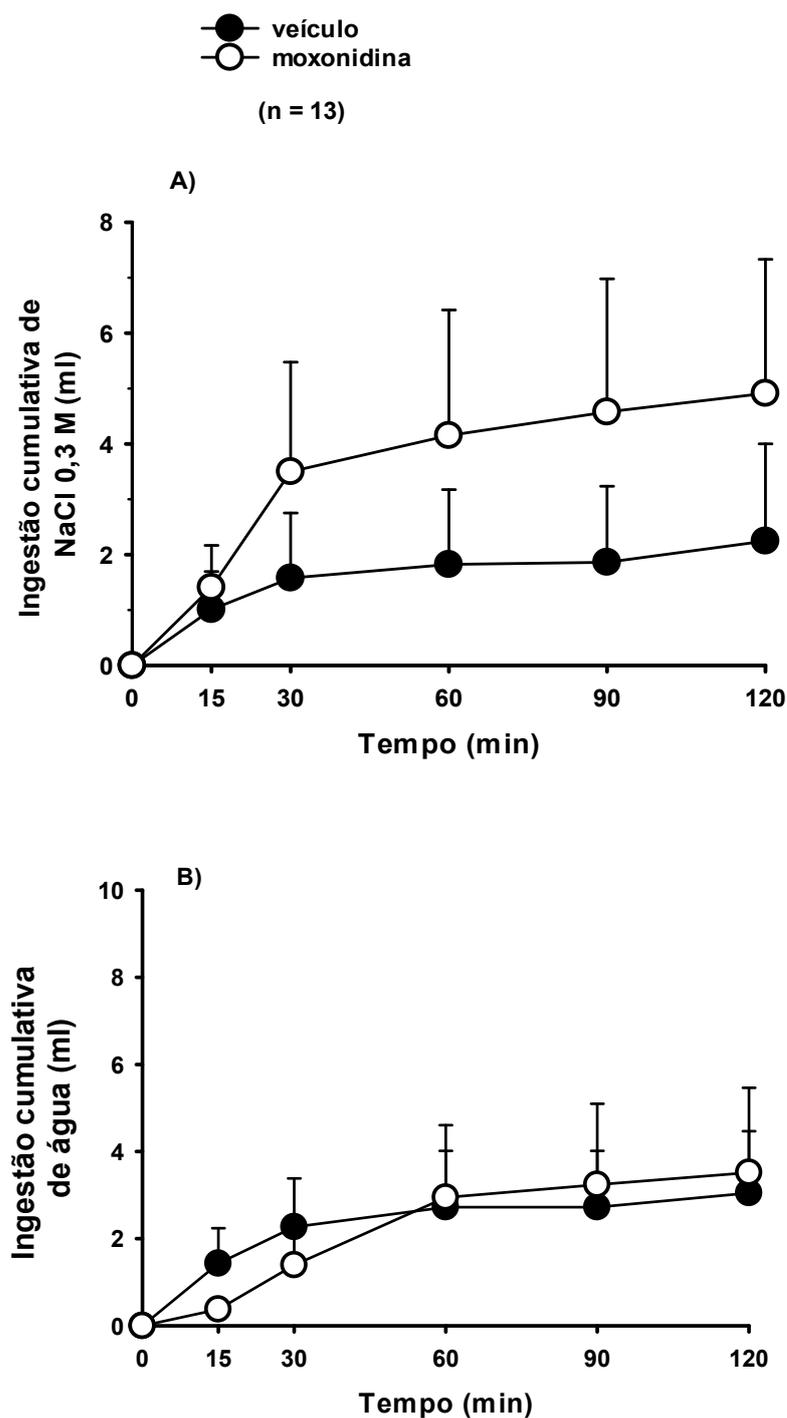


Figura 6: Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica e reidratação parcial (PH-RP) que receberam injeções **bilaterais** de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.3 Ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por privação hídrica após administração de moxonidina no NPBL.

Injeções bilaterais de moxonidina no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M, [F(1, 4) = 8,3; $p < 0,05$], sem alterar a ingestão de água, [F(1, 4) = 0,6; $p > 0,05$], (Figura 7).

A Figura 8 mostra o resultado do grupo de animais com injeções UNILATERAIS de moxonidina ou veículo no NPBL. O tratamento com moxonidina aumentou a ingestão de NaCl 0,3 M ([F(1,8) = 51,1; $p < 0,05$]), e de água ([F(1,8) = 41,5; $p < 0,05$]), induzidas por 24 h de privação hídrica.

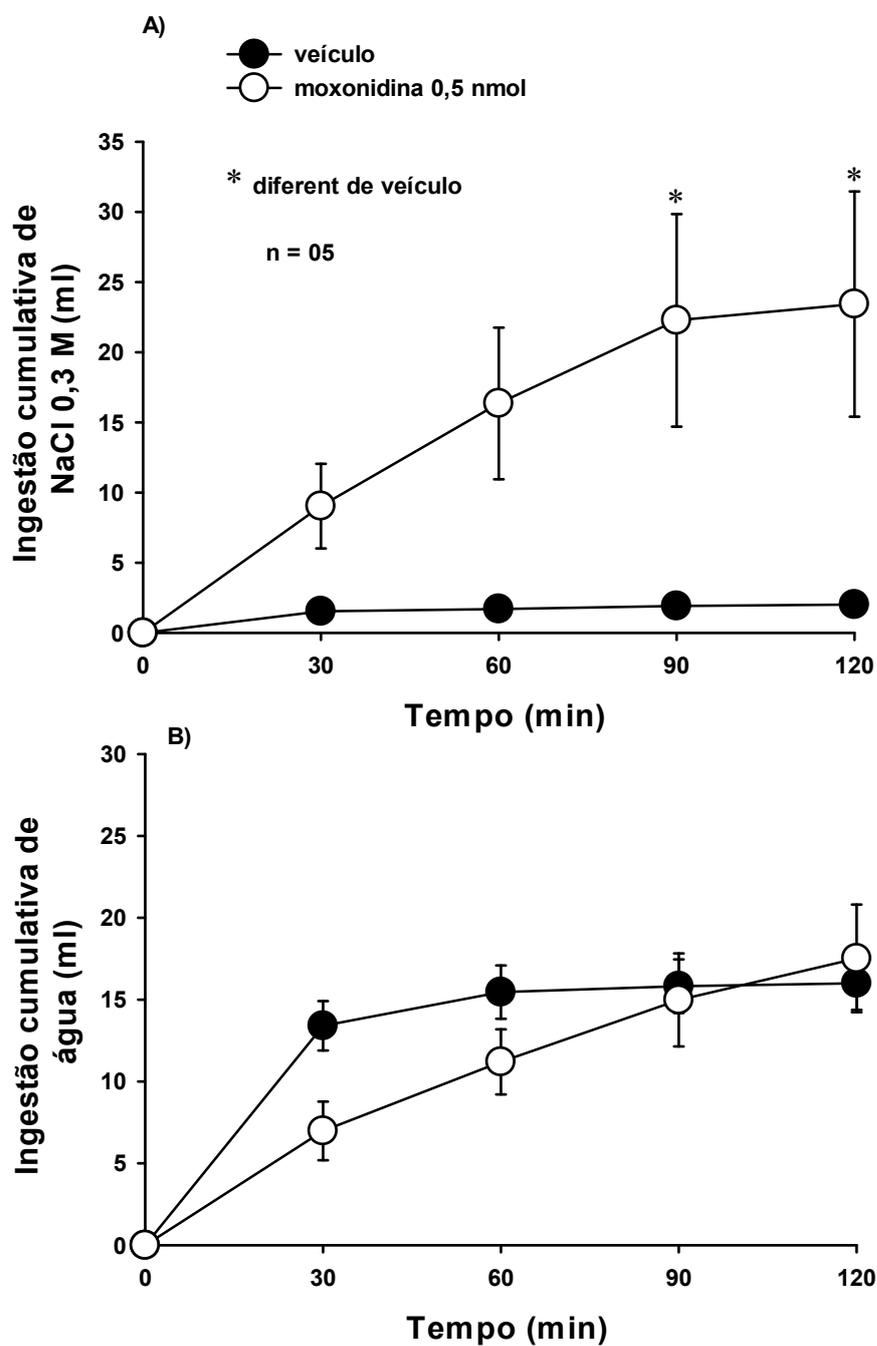


Figura 7: Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica que receberam injeções **bilaterais** de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

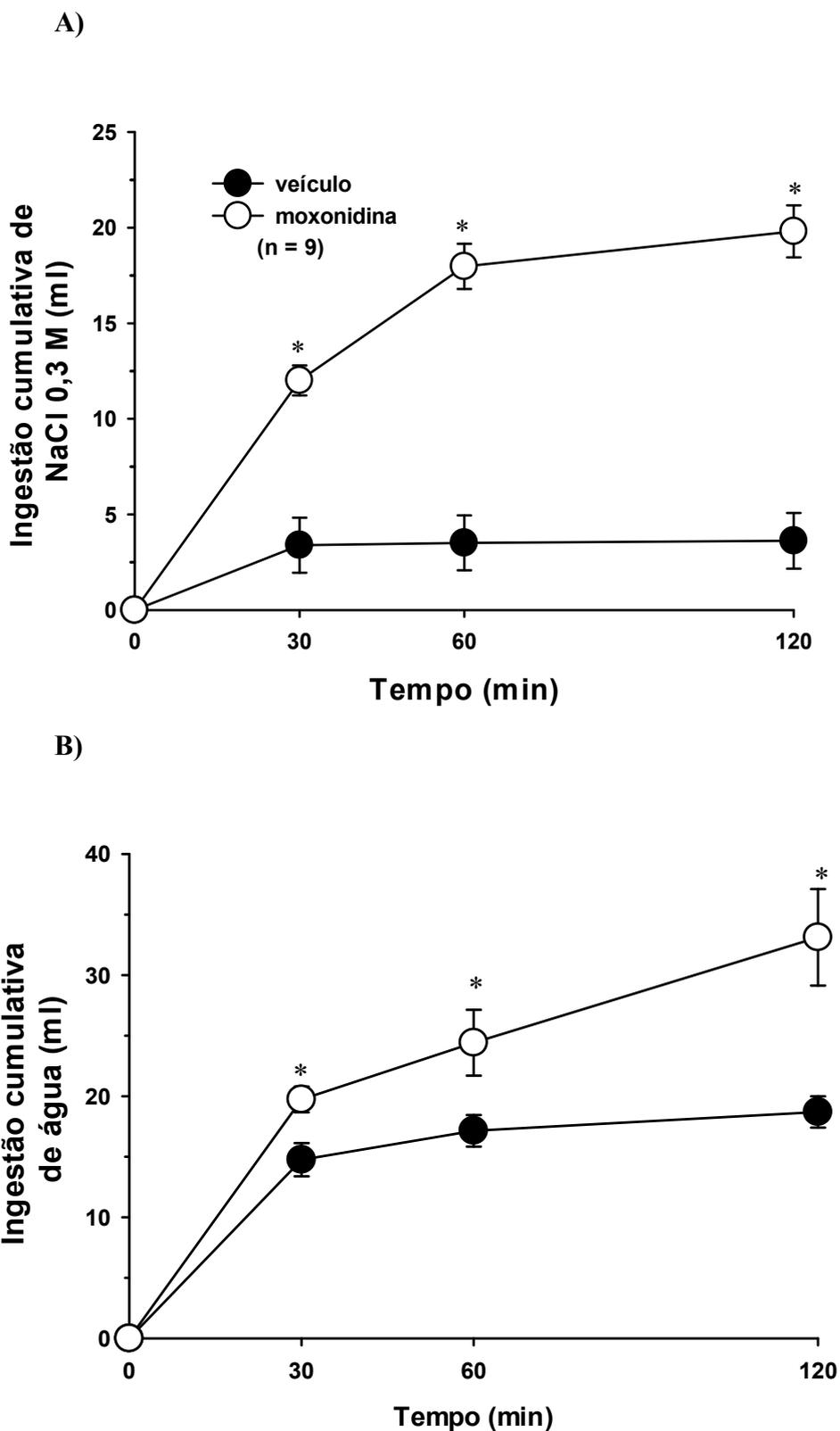


Figura 8: Ingestão cumulativa de A) NaCl 0,3 M (ml) e B) água (ml) em ratos submetidos ao protocolo de privação hídrica que receberam injeções **unilaterais** de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.4 Alterações da palatabilidade ao NaCl 0,3 M após o protocolo de privação hídrica, após a reidratação parcial e durante a fase do apetite ao sódio.

O número de respostas hedônicas a infusão intraoral NaCl 0,3 M aumentou em relação a condição saciado apenas no termino do período de 24 h de privação hídrica. Após a reidratação parcial, o número de respostas hedônicas retornou próximo ao valor da condição basal, Figura 9A, [F(3,21) = 36,3; p <0,001].

Em relação ao número de respostas aversivas, foi observado diferença apenas entre o momento do final do teste do apetite ao sódio em comparação ao momento do termino do período da privação hídrica de 24 h, Figura 9B, [F(3,21) = 4,5; p < 0,05].

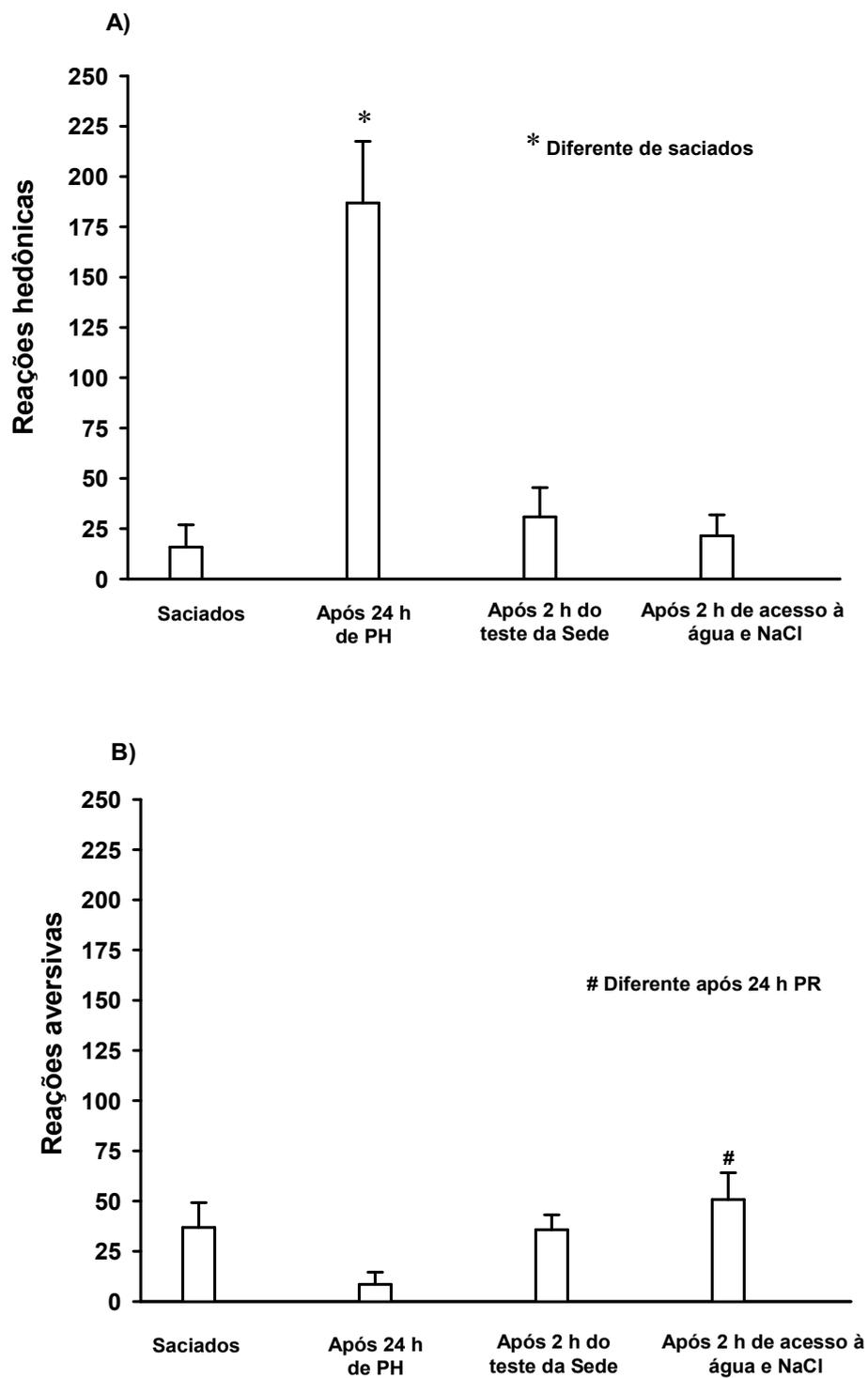


Figura 9: A) Respostas **hedônicas** e B) respostas **aversivas** ao teste de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M em diferentes condições: 1) saciados; 2) após o período de privação hídrica; 3) após o período de reidratação parcial; 4) após apetite ao sódio. Valores são representados como média \pm EPM; n = número de animais por grupo.

4.5 Palatabilidade e ingestão ao sódio em animais com desidratação intracelular após administração de moxonidina no NPBL.

A figura 10 mostra os resultados da ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos submetidos ao protocolo de sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml/rato), que receberam injeções UNILATERAIS de moxonidina ou veículo no NPBL. O tratamento com moxonidina promoveu aumento da ingestão de NaCl 0,3 M após de livre acesso a água e NaCl 0,3 M, [F(1,5) = 9,6; $p < 0,05$], sem alterações da ingestão de água, [F(1,5) = 1,5; $p > 0,05$].

A figura 11 mostra os resultados do teste de reatividade ao sabor do NaCl 0,3 M nesse grupo de animais. O tratamento com injeções UNILATERAIS de moxonidina ou não alterou a frequência de respostas hedônicas ou aversivas em relação ao tratamento controle, [F(1,5) = 0,105; $p > 0,05$] e [F(1,5) = 1,6; $p > 0,05$], respectivamente.

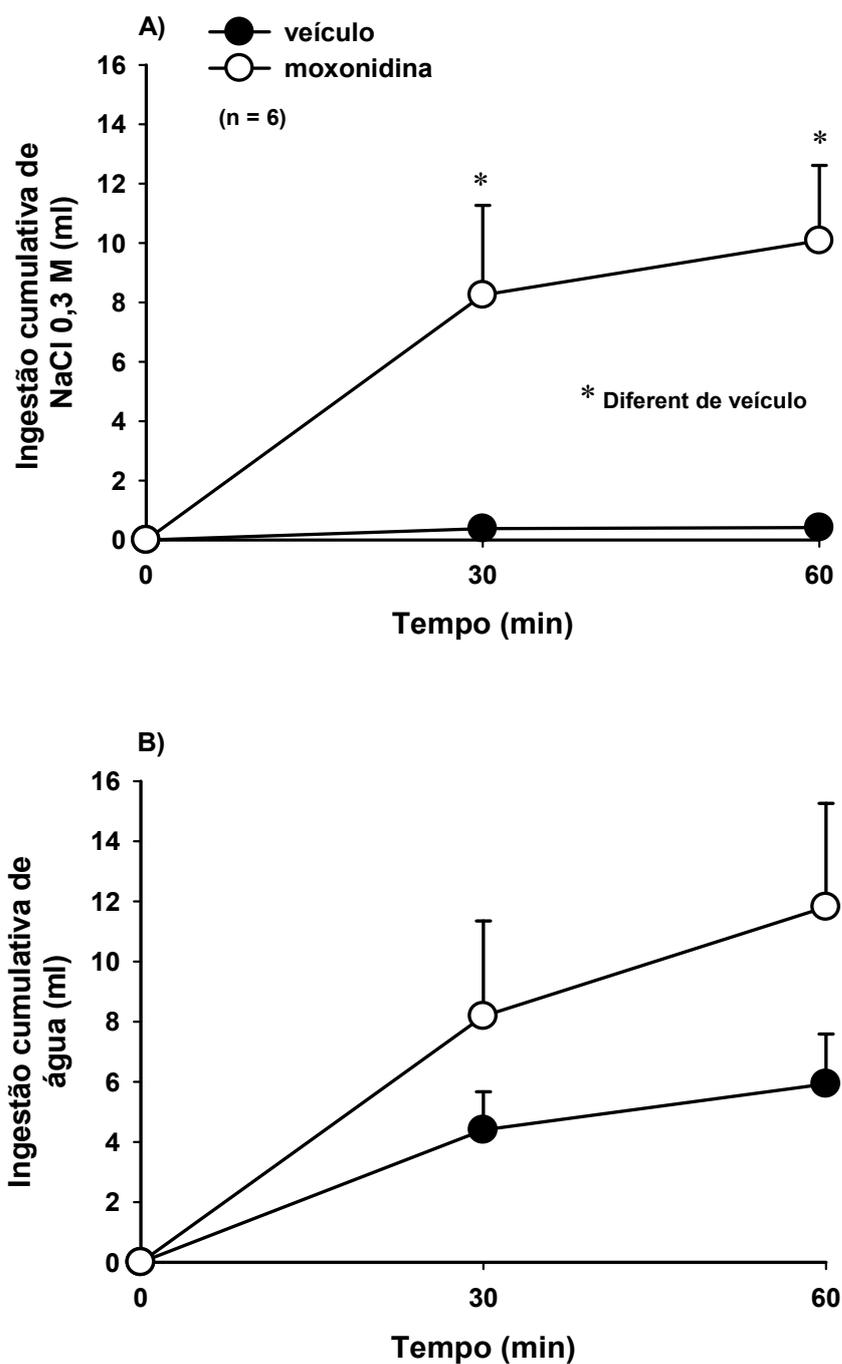


Figura 10: Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0,3 M (ml) e **B)** água (ml) em ratos submetidos a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M i.g. (2 ml/rato) que receberam injeções **unilaterais** de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

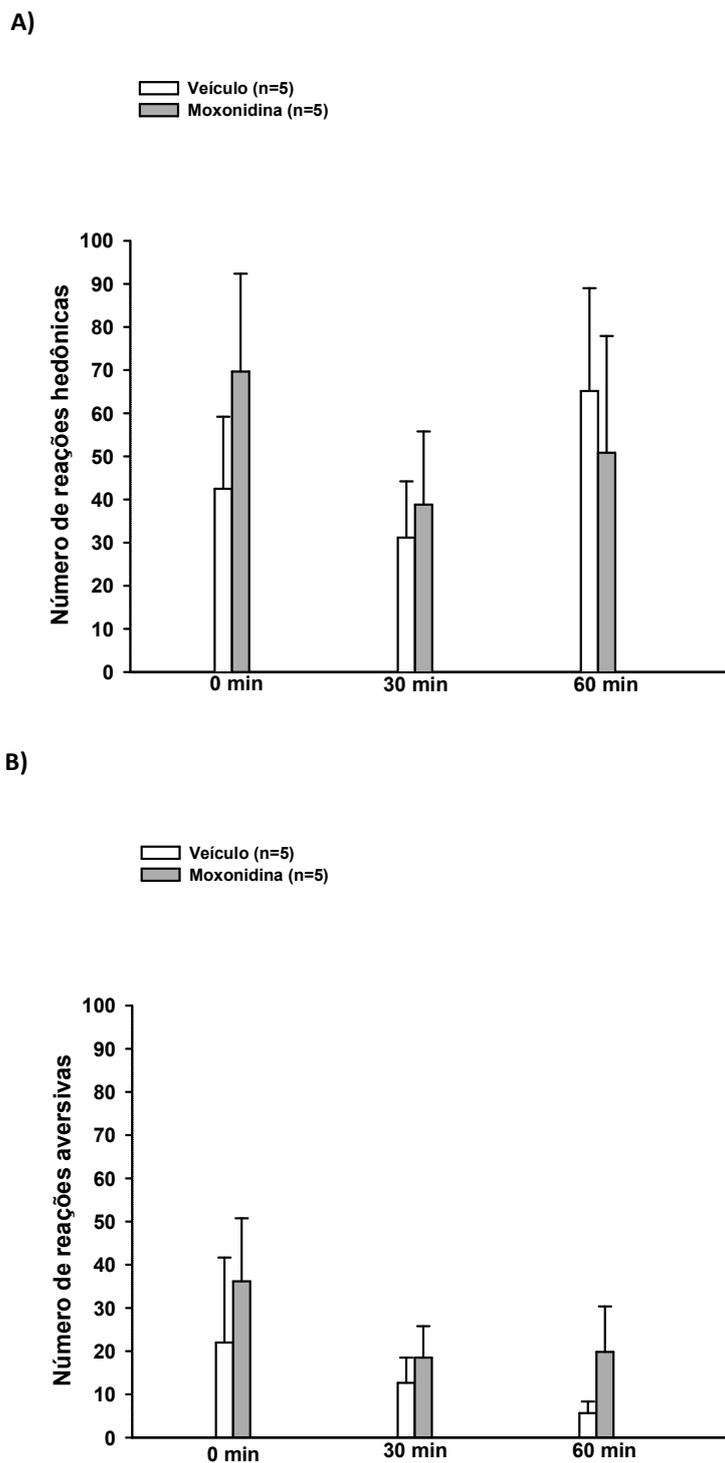


Figura 11. A) Respostas **hedônicas** e **B)** respostas **aversivas** ao teste de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M em ratos submetidos a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M i.g. (2 ml/rato) que receberam injeções **unilaterais** de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

5. DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram que durante condição de desidratação intracelular, o tratamento unilateral no NPBL com moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2) promoveu aumento da ingestão de NaCl 0,3 M, sem alterações no teste de reatividade ao sabor a essa solução. Foi verificado também que administração de moxonidina no NPBL não alterou o apetite ao sódio induzido por 24 h de privação hídrica seguida de reidratação parcial em relação ao tratamento com veículo. Contudo, quando não foi permitido aos animais a reidratação parcial, ou seja, acesso imediato por duas horas à água e simultaneamente ao NaCl 0,3 M, observou-se um potente aumento da ingestão de sódio hipertônico após a administração de moxonidina no NPBL. Em outro grupo de animais, foi verificado um aumento do número de respostas hedônicas a infusão intraoral de NaCl 0,3 M após o período de 24 horas de privação hídrica em relação a condição basal (normoidratação), reestabelecendo-se os valores controles após o período de reidratação parcial.

Dados prévios demonstraram que, durante uma condição de desidratação extracelular, o potente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M produzido pela administração de moxonidina no NPBL (mais do que dez vezes a quantia ingerida pelos controles tratados com FURO + CAP s.c. e veículo no NPBL) foi completamente abolido pelo RX 821002, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , indicando que a moxonidina produz um potente, seletivo e específico aumento da ingestão de NaCl hipertônico pela ação em receptores adrenérgicos α_2 , (ANDRADE et al., 2004). Os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL sobre a ingestão de sódio não são devido a uma facilitação não específica de todos os comportamentos ingestivos, uma vez que a ingestão de solução de sacarose ou a ingestão de alimento não são alteradas pelas injeções bilaterais de moxonidina no NPBL (ANDRADE et al., 2004; ANDRADE et al., 2007).

O apetite ao NaCl é fortemente inibido pela desidratação celular (BLACKBURN et al., 1995; FITZSIMONS, 1998) ao mesmo tempo que sinais dos osmorreceptores ativam os circuitos cerebrais que desencadeiam a sede (FITZSIMONS, 1985). Porém, ratos com desidratação celular podem também ingerir NaCl hipertônico além da água quando os receptores adrenérgicos α_2 do NPBL são ativados (ANDRADE et al., 2006). De acordo com estudos anteriores (DE LUCA JR; BARBOSA; MENANI, 2003; ANDRADE et al., 2006), o aumento da osmolaridade plasmática pode ser também um estímulo excitatório para a ingestão de sódio, sugerindo que os circuitos cerebrais que controlam o apetite ao sódio, como aqueles que desencadeiam a sede, são ativados não apenas pela desidratação extracelular, mas também pela desidratação intracelular. Portanto, a ativação desse comportamento depende da modulação exercida pelos mecanismos envolvendo o NPBL que inibe fortemente o apetite ao sódio. A ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL desativa o mecanismo inibitório e permite esse comportamento se a osmolaridade estiver elevada.

Considerando que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 por meio de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL aumenta a ingestão de NaCl 0,3 M e de água induzida pela desidratação extracelular ou intracelular (ANDRADE et al., 2004; ANDRADE et al., 2006), mas que ainda não era conhecido o bloqueio do NPBL poderia alterar a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por desidratação dupla, no presente estudo testamos também os efeitos da moxonidina no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos submetidos a 24 horas de privação de água.

Conforme bem estabelecido previamente, o protocolo de privação hídrica e reidratação parcial – PH-RP foi feito de acordo com estudos prévios (DE LUCA et al., 2002; PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010). O modelo de privação hídrica com reidratação parcial com água por 2 horas (PH-RP) fornece subsídios para o estudo da sede e apetite ao sódio, separadamente. O animal foi privado de água por 24 horas, e ao final desse período observa-se aumento da osmolaridade e sódio plasmáticos, hipovolemia e aumento da atividade de renina plasmática (DE

LUCA et al., 2002). Após o período de reidratação parcial (2 horas de acesso apenas à água) o aumento da osmolaridade plasmática é totalmente corrigido, mas apenas parcialmente a hipovolemia, enquanto que o aumento da atividade de renina plasmática permanece elevado até o início do teste do apetite ao sódio (DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010).

Os presentes resultados mostram que a moxonidina no NPBL é capaz de promover um aumento da ingestão de NaCl 0,3 M em relação ao tratamento controle, quando são oferecidas simultaneamente água e sódio para ingestão após o período de 24 h de privação hídrica, ou seja, durante condição de desidratação absoluta. Por outro lado, quando é permitido aos animais o acesso à água por duas horas para a reidratação parcial, verificamos que não houve alteração da ingestão de NaCl 0,3 M após injeção de moxonidina no NPBL em relação ao tratamento controle no NPBL. Esses resultados sugerem que após PH-RP, a ingestão de água durante a reidratação parcial poderia enfraquecer o estímulo facilitatório para a ingestão de sódio, não sendo suficiente para que o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL com a moxonidina pudesse promover o esperado aumento da ingestão de sódio.

A partir desses resultados surgiu a questão se a sensação de sede não poderia interferir nesse aumento da ingestão de sódio e/ou palatabilidade ao sódio, com ou sem o bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL. Assim sendo, em outro grupo de animais com apenas implante de cânula intraoral foi avaliada a reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M, antes e após o período de reidratação parcial. Os resultados mostram que houve um aumento do número de respostas hedônicas a infusão intraoral de NaCl 0,3 M após o período de 24 horas de privação hídrica em relação a condição basal (normoidratação). No entanto, esse desvio na palatabilidade foi restabelecido para os valores controles após o período de reidratação parcial.

Dados anteriores da literatura mostraram que durante uma situação de deficiência de sódio, induzida por depleção de sódio, observa-se ingestão robusta de concentrações hipertônicas de

NaCl, bem com aumento das respostas hedônicas à solução salina hipertônica (BERRIDGE et al., 1984; BERRIDGE; SCHULKIN, 1989; SORGE; FUDGE; PARKER, 2002; ANDRADE et al., 2011). Contudo, os presentes resultados indicam que após um ciclo de PH-RP, o número de respostas hedônicas já foi restabelecido em direção ao normal. Mais estudos são necessários para explicar essa aparente dissociação entre a palatabilidade ao NaCl 0,3 M e o apetite ao sódio induzido pelo protocolo de PH-RP.

Em relação a participação do NPBL sobre a modulação da palatabilidade ao sódio hipertônico, verificamos anteriormente que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL com injeções bilaterais de moxonidina altera o padrão de reatividade ao sabor ao NaCl 0,3 M em animais depletados de sódio agudamente (ANDRADE et al., 2011), sugerindo que as injeções de moxonidina no NPBL reduzem os sinais inibitórios ativados em consequência da ingestão de NaCl hipertônico e água (ANDRADE et al., 2011; ANDRADE et al., 2014). Em outras palavras, o tratamento com moxonidina no NPBL parece bloquear o declínio relacionado à saciedade das respostas hedônicas e/ou aumentar as respostas aversivas que normalmente ocorrem durante e após o consumo de NaCl 0,3 M e água induzidas pela depleção aguda de sódio.

Dados não publicados de nosso laboratório mostram que a injeção de bilateral de moxonidina no NPBL promove um aumento significativo da ingestão de NaCl 0,3 M induzido por esse modelo de depleção de sódio de 24 h. A depleção de sódio induzida pelo tratamento com uma única dose do diurético furosemida (20 mg/kg de peso corporal, s.c.), seguido da manutenção dos ratos por 24 h com alimento deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum* antes de se iniciar o protocolo experimental, promove apetite ao sódio devido ao elevado nível de angiotensina II (ANG II) e aldosterona circulante (SPIELMAN; DAVIS, 1974; HABER, 1976). Dessa forma, nesses animais que tinham água disponível por todo o período de 24 h da dieta deficiente de sódio

antes do acesso a solução de NaCl 0,3 M e água, as injeções de injeção de moxonidina no NPBL promoveram uma potencialização do apetite ao sódio, independente de influências de sede.

Informações dos barorreceptores arteriais, receptores cardiopulmonares, receptores gustatórios e outros receptores viscerais também chegam até o núcleo do trato solitário (NTS) e ascendem até o núcleo parabraquial (NORGREN, 1981; LANCA; VAN DER KOOY, 1985; HERBERT; MOGA; SAPER, 1990; JOHNSON; THUNHORST, 1997; JOHNSON, A.; THUNHORST, R., 2007). Esses sinais podem modular a atividade dos mecanismos inibitórios do NPBL por meio da liberação de diferentes neurotransmissores, como por exemplo, a serotonina, colecistocinina (CCK), fator liberador de corticotrofina (CFR) e glutamato, os quais aumentam a ação inibitória do NPBL sobre a ingestão de sódio. Por outro lado, neurotransmissores como o GABA, opioides, ATP e noradrenalina reduzem essa ação inibitória (DE GOBBI et al., 2009; GASPARINI et al., 2009; DE OLIVEIRA et al., 2011; MENEZES et al., 2011; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014).

Resultados de Roncari e cols (2017) mostram que a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por hiperosmolaridade plasmática, protocolo FURO + CAP, ou injeções de carbacol no VL ou OSF combinadas com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL (administração de moxonidina no NPBL) é abolida pelo bloqueio dos receptores colinérgicos e angiotensinérgicos prosencefálicos, particularmente da ASM e do OSF. Como o bloqueio dos mecanismos angiotensinérgicos abole a ingestão de água e NaCl 0,3 M produzida pela ativação de mecanismos colinérgicos combinada com bloqueio dos mecanismos inibitórios do NPBL, mas o contrário não ocorre, pode-se sugerir que diferentes estímulos, tais como hiperosmolaridade e ativação colinérgica central, facilitam a ingestão de NaCl através da ativação de mecanismos angiotensinérgicos centrais (RONCARI et al., 2017). Embora não se possa descartar totalmente outras possibilidades, como a de receptores angiotensinérgicos e colinérgicos estarem localizados

no mesmo neurônio, é possível que os neurônios do OSF estejam organizados em série da seguinte maneira: osmorreceptores ativados pela hiperosmolaridade levam à ativação de mecanismos colinérgicos que, por sua vez, ativam vias angiotensinérgicas. A ingestão de NaCl dependeria da ativação da área integrativa que recebe sinais inibitórios e facilitatórios. Sendo assim, a saciedade ou o apetite ao sódio provavelmente é o resultado da ação de sinais opostos que chegam à área integrativa. Se os sinais inibitórios forem predominantes, o resultado é a saciedade; no entanto, se os sinais predominantes forem facilitatórios, o resultado é o apetite ao sódio (RONCARI et al., 2017).

6. CONCLUSÃO

Em suma, os presentes resultados sugerem que o efeito da moxonidina evidenciado apenas após o período de privação hídrica, sem a prévia reidratação parcial, poderia estar associado ao aumento das respostas hedônicas a infusão intraoral de NaCl 0,3 M observado nessas condições. Contudo, em relação a desidratação intracelular, exclusivamente, o tratamento unilateral com moxonidina no NPBL promoveu aumento da ingestão de NaCl 0,3 M sem alterações na palatabilidade essa solução.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE-FRANZE, G. M. et al. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. **Brain Res**, v. 1332, p. 57-64, May 21 2010. ISSN 1872-6240 (Electronic) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20331983> >.

ANDRADE-FRANZE, G. M. et al. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. **Neuroscience**, v. 165, n. 3, p. 633-41, Feb 3 2010. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19909794> >.

ANDRADE, C. A. et al. Changes in taste reactivity to intra-oral hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an alpha2-adrenergic receptor agonist. **Physiol Behav**, v. 104, n. 5, p. 702-8, Oct 24 2011. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803064>
http://ac.els-cdn.com/S0031938411003726/1-s2.0-S0031938411003726-main.pdf?_tid=4b1c24c8-1f98-11e3-9ac0-0000aacb35d&acdnat=1379422650_0f545d577f0275496f8f8ed532a7f802 >.

ANDRADE, C. A. et al. Role of alpha2-adrenoceptors in the lateral parabrachial nucleus in the control of body fluid homeostasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 1, p. 11-8, Jan 2014. ISSN 1414-431X (Electronic) 0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24519089> >.

ANDRADE, C. A. et al. Activation of alpha2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 25-34, 2004. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489025>
http://ac.els-cdn.com/S0306452204006918/1-s2.0-S0306452204006918-main.pdf?_tid=4ea63aa2-1f98-11e3-9c38-0000aab0f6c&acdnat=1379422656_a98cadfab8bd9e7888b17a286a75f26d >.

ANDRADE, C. A. et al. Alpha2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 21-8, Sep 29 2006. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16890365>
http://ac.els-cdn.com/S0306452206005008/1-s2.0-S0306452206005008-main.pdf?_tid=52229ae0-1f98-11e3-97e6-0000aacb35e&acdnat=1379422662_cec0d24d16012cd69628ed0046ff6ba1 >.

_____. Enhancement of meal-associated hypertonic NaCl intake by moxonidine into the lateral parabrachial nucleus. **Behav Brain Res**, v. 183, n. 2, p. 156-60, Nov 2 2007. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17629970>
http://ac.els-cdn.com/S0166432807002987/1-s2.0-S0166432807002987-main.pdf?_tid=55706eac-1f98-11e3-863f-0000aacb362&acdnat=1379422668_13542ccfb568c6a8445dd2bf44c40152 >.

ANDRADE, C. A. et al. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus reduces renal and hormonal responses to cell dehydration. **Neuroscience**, v. 208, p. 69-78, Apr 19 2012. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22373877>
http://ac.els-cdn.com/S0306452212001364/1-s2.0-S0306452212001364-main.pdf?_tid=58afe69c-1f98-11e3-9622-0000aacb360&acdnat=1379422673_41dac9de7f355b821b464c0624443a72 >.

ANDRADE, C. A. F. et al. Gabaergic and opioid receptors mediate the facilitation of NaCl intake induced by α 2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus. **Behavioural Brain Research**, v. 278, p. 535-541, 1 February 2015 2015.

BEAUCHAMP, G. K. et al. Experimental sodium depletion and salt taste in normal human volunteers. **Am.J.Clin.Nutr.**, v. 51, p. 881-889, 1990 1990.

BERRIDGE, K. C. Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, n. 2, p. 173-98, Mar 2000. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714382> >.

_____. Motivation concepts in behavioral neuroscience. **Physiol Behav**, v. 81, n. 2, p. 179-209, Apr 2004. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159167> >.

BERRIDGE, K. C. **Affective taste 'liking'/'disliking' expressions: Human babies, adult apes, monkeys, and rats. (movie file):** <https://lsa.umich.edu/psych/research&labs/berridge/VideoIndex.htm> 2013.

BERRIDGE, K. C. et al. Sodium depletion enhances salt palatability in rats. **Behav Neurosci.**, v. 98, n. 4, p. 652-660, 1984 1984.

BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 199, n. 3, p. 457-80, Aug 2008. ISSN 0033-3158 (Print)

0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311558> >.

BERRIDGE, K. C.; SCHULKIN, J. Palatability shift of a salt-associated incentive during sodium depletion. **Q J Exp Psychol B**, v. 41, n. 2, p. 121-38, May 1989. ISSN 0272-4995 (Print)

0272-4995 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2748936> >.

BLACKBURN, R. E. et al. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 269, n. 2 Pt 2, p. R245-51, Aug 1995. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7653644> >.

BRESLIN, P. A.; SPECTOR, A. C.; GRILL, H. J. Chorda tympani section decreases the cation specificity of depletion-induced sodium appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 264, p. R319-R323, 1993 1993.

CABRAL, K. A.; ANDRADE, C. A. Importance of the lateral parabrachial nucleus to sodium balance in fluid-depleted rats. **Neurosci Res**, Jun 6 2016. ISSN 1872-8111 (Electronic)

0168-0102 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27282217> >.

CALLERA, J. C. et al. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 725-35, 2005. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16009500> >.

DAVID, R. B.; MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A., JR. Central angiotensin II induces sodium bicarbonate intake in the rat. **Appetite**, v. 51, n. 1, p. 82-9, Jul 2008. ISSN 0195-6663 (Print)

0195-6663 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18272252> >.

DE GOBBI, J. I. et al. Activation of serotonergic 5-HT(1A) receptors in the lateral parabrachial nucleus increases NaCl intake. **Brain Res**, v. 1066, n. 1-2, p. 1-9, Dec 20 2005. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16360657> >.

DE GOBBI, J. I. et al. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. **Brain Res**, v. 1301, p. 44-51, Dec 8 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19747457> >.

DE LUCA JR, L. A.; BARBOSA, S. P.; MENANI, J. V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 1055-1061, 2003 2003.

DE LUCA JR, L. A.; VIVAS, L.; MENANI, J. V. Controle neuroendócrino da ingestão de água e sal. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C., et al (Ed.). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. cap. 10, p.116-131.

- DE LUCA, L. A., JR. et al. Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiol Behav**, v. 100, n. 5, p. 535-44, Jul 14 2010. ISSN 1873-507X (Electronic) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226201> >.
- DE LUCA, L. A., JR. et al. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 2, p. R552-9, Feb 2002. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792666> >.
- DE OLIVEIRA, L. B. et al. GABAergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on sodium appetite. **Brain Res Bull**, v. 73, n. 4-6, p. 238-47, Jul 12 2007. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17562389> >.
- DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA, L. A., JR.; MENANI, J. V. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 350-8, Aug 13 2008. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18602454> >.
- DE OLIVEIRA, L. B. et al. Baclofen into the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium chloride and sucrose intake in rats. **Neuroscience**, v. 183, p. 160-70, Jun 2 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21419196> >.
- DE SOUZA, J. T. et al. Higher salt preference in heart failure patients. **Appetite**, v. 58, n. 1, p. 418-23, Feb 2012. ISSN 1095-8304 (Electronic) 0195-6663 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22019543> >.
- DUFFY, V. B. et al. Taste changes across pregnancy. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v. 855, p. 805-809, 1998 1998.
- EGAN, G. et al. Neural correlates of the emergence of consciousness of thirst. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 25, p. 15241-6, Dec 9 2003. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14657368> >.
- EPSTEIN, A. N. Neurohormonal control of salt intake in the rat. **Brain Res Bull**, v. 27, n. 3-4, p. 315-20, Sep-Oct 1991. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1959025> >.
- FITZSIMONS, J. T. Physiology and pathology of thirst and sodium appetite. In: DW, S. e G, G. (Ed.). **The kidney: physiology and pathophysiology**. New York: Raven Press, 1985. p.885-901.
- _____. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol.Rev**, v. 78, p. 583-686, 1998 1998.
- FRATUCCI DE GOBBI, J. I. et al. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 5, p. R1301-7, May 2001. ISSN 0363-6119 (Print) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11294747> >.
- FULWILER, C. E.; SAPER, C. B. Subnuclear Organization of the Efferent Connections of the Parabrachial Nucleus in the Rat. **Brain Research Reviews**, v. 7, n. 3, p. 229-259, 1984 1984. ISSN 0165-0173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1984TM05800002 >.
- GASPARINI, S. et al. Adrenergic mechanisms of the Kolliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 370-9, Dec 1 2009. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716860> http://ac.els-cdn.com/S0306452209014067/1-s2.0-S0306452209014067-main.pdf?_tid=74b626a8-1f98-11e3-be55-0000aacb362&acdnat=1379422720_4cf5b0f0273e3f6b978d2f279eb970ee >.

GASPARINI, S.; MENANI, J. V.; DANIELS, D. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus modifies postingestive signals involved in sodium intake control. **Neuroscience**, v. 284, p. 768-74, Jan 22 2015. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25264033> >.

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

GRILL, H. J.; NORGREN, R. The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. **Brain Res.**, v. 143, p. 263-279, 1978 1978.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of Medical Physiology**. 11th. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2006. 1116 p. ISBN 0721602401.

HABER, E. George C. Griffith lecture. The role of renin in normal and pathological cardiovascular homeostasis. **Circulation**, v. 54, n. 6, p. 849-61, Dec 1976. ISSN 0009-7322 (Print) 0009-7322 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/791534> >.

HE, F. J.; MACGREGOR, G. A. Salt intake, plasma sodium, and worldwide salt reduction. **Ann Med**, v. 44 Suppl 1, p. S127-37, Jun 2012. ISSN 1365-2060 (Electronic) 0785-3890 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22713141> >.

HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J Comp Neurol**, v. 293, n. 4, p. 540-80, Mar 22 1990. ISSN 0021-9967 (Print) 0021-9967 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1691748> >.

HOLLENBERG, N. K. The influence of dietary sodium on blood pressure. **J Am Coll Nutr**, v. 25, n. 3 Suppl, p. 240S-246S, Jun 2006. ISSN 0731-5724 (Print) 0731-5724 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16772635> >.

HORVATHOVA, H. et al. Compliance and the therapeutic effect in patients with arterial hypertension. **Bratisl Lek Listy**, v. 104, n. 4-5, p. 149-54, 2003. ISSN 0006-9248 (Print) 0006-9248 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14604255> >.

JOHNSON, A.; THUNHORST, R. The neuroendocrinology, neurochemistry and molecular biology of thirst and salt appetite. In: LAJTHA, A. e LAUSTEIN, J. (Ed.). **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology**. . 3rd edn. New York: Springer, 2007. p.641-687.

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, n. 3, p. 292-353, Jul 1997. ISSN 0091-3022 (Print) 0091-3022 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9237080> >.

JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology, neurochemistry and molecular biology of thirst and salt appetite. In: LAJTHA, A. e LAUSTEIN, J. (Ed.). **Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology: Behavioral Neurochemistry, Neuroendocrinology and Molecular Neurobiology**. . 3rd edn. New York: Springer, 2007. p.641-687.

KEAST, R. S. J.; BRESLIN, P. A. An overview of binary taste–taste interactions. **Food Quality and Preference**, v. 14,, n. 2, p. 111–124, 2003.

LANCA, A. J.; VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 1117-26, Apr 1985. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2987755> >

http://ac.els-cdn.com/0306452285902817/1-s2.0-0306452285902817-main.pdf?_tid=7da2a8a4-1f98-11e3-89fe-00000aab0f6c&acdnat=1379422735_3a7d5323c2ba26dd0ed8fefef760c5e2 >.

LESHEM, M.; RUDDY, J. Hemodialysis increases the preference for salt in soup. **Physiol.Behav.**, v. 61, p. 65-69, 1997

LIEM, D. G.; MIREMADI, F.; KEAST, R. S. Reducing sodium in foods: the effect on flavor. **Nutrients**, v. 3, n. 6, p. 694-711, Jun 2011. ISSN 2072-6643 (Electronic)
2072-6643 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22254117> >.

MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A., JR.; JOHNSON, A. K. Role of the lateral parabrachial nucleus in the control of sodium appetite. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 306, n. 4, p. R201-10, Feb 15 2014. ISSN 1522-1490 (Electronic)
0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24401989> >.

MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1431-7, Nov 1998. ISSN 0002-9513 (Print)
0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9791058> >.

MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 270, n. 1 Pt 2, p. R162-8, Jan 1996. ISSN 0002-9513 (Print)
0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8769798> >.

MENEZES, M. F. et al. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. **Brain Res**, v. 1372, p. 49-58, Feb 4 2011. ISSN 1872-6240 (Electronic)
0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21129366> >.

MILL, J. G. et al. Sex-specific patterns in the association between salt intake and blood pressure: The ELSA-Brasil study. **J Clin Hypertens (Greenwich)**, v. 21, n. 4, p. 502-509, Apr 2019. ISSN 1751-7176 (Electronic)
1524-6175 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30861624> >.

NORGREN, R. The central organization of the gustatory and visceral systems in the nucleus of the solitary tract. . In: KATSUKI, Y.;NORGREN, R., *et al* (Ed.). **Brain mechanisms of sensation**. New York: Wiley, 1981. p.143-160.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. 5th ed. San Diego, CA: Academic Press, 2004.

PEREIRA-DERDERIAN, D. T. et al. Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 5, p. R1298-309, May 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic)
0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200133> >.

PEREIRA, D. T. et al. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. **Physiol Behav**, v. 76, n. 4-5, p. 501-5, Aug 2002. ISSN 0031-9384 (Print)
0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12126985>
http://ac.els-cdn.com/S0031938402007783/1-s2.0-S0031938402007783-main.pdf?_tid=9099e4e0-1f98-11e3-a9b1-00000aacb35d&acdnat=1379422767_d8aa5deacd03d601353fee4fb7fdcf77 >.

PEREIRA, E. D., JR. et al. Estradiol modulates the palatability of 0.3M NaCl in female rats during sodium appetite. **Appetite**, v. 133, p. 252-261, Feb 1 2019. ISSN 1095-8304 (Electronic)
0195-6663 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30458200> >.

QUARTERMAIN, D.; MILLER, N. E.; WOLF, G. Role of experience in relationship between sodium deficiency and rate of bar pressing for salt. **J Comp Physiol Psychol**, v. 63, n. 3, p. 417-20, Jun 1967. ISSN 0021-9940 (Print)
0021-9940 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6064385> >.

- RONCARI, C. F. et al. Importance of central AT(1) receptors for sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**, v. 196, p. 147-52, Nov 24 2011. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21893164> >.
- RONCARI, C. F. et al. The lateral parabrachial nucleus and central angiotensinergic mechanisms in the control of sodium intake induced by different stimuli. **Behav Brain Res**, v. 333, p. 17-26, Aug 30 2017. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28625546> >.
- RONCARI, C. F. et al. Angiotensinergic and cholinergic receptors of the subfornical organ mediate sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**, v. 262, p. 1-8, Mar 14 2014. ISSN 1873-7544 (Electronic) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24374079> >.
- SARNO, F. et al. [Estimated sodium intake for the Brazilian population, 2008-2009]. **Rev Saude Publica**, v. 47, n. 3, p. 571-8, Jun 2013. ISSN 1518-8787 (Electronic) 0034-8910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346570> >.
- 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**, v. 60, n. 4, p. 1099-104, Oct 1996. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884939> >.
- SORGE, R. E.; FUDGE, M. A.; PARKER, L. A. Effect of sodium deprivation on morphine- and lithium-induced conditioned salt avoidance and taste reactivity. **Psychopharmacology**, v. 160, p. 84-91, 2002 2002.
- SPIELMAN, W. S.; DAVIS, J. O. The renin-angiotensin system and aldosterone secretion during sodium depletion in the rat. **Circ Res**, v. 35, n. 4, p. 615-24, Oct 1974. ISSN 0009-7330 (Print) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4370497> >.
- TAKAMATA, A. et al. Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement. **Am.J.Physiol.**, v. 266, p. R1493-R1502, 1994 1994.
- VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 17, n. 4, p. 471-503, Dec 2003. ISSN 1521-690X (Print) 1521-690X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14687585> >.
- VERNEY, E. B. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. **Proc.Royal Soc., London**, v. 135, p. 25-106, 1947 1947.
- WHO. In: (Ed.). **Guideline: Sodium Intake for Adults and Children**. Geneva, 2012. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). ISBN 9789241504836.
- _____. World Health Organization. Top 10 causes of death. Global Health Observatory (GHO) data., 2017. Disponível em: < http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/ >.
- WOOD, R. J.; ROLLS, E. T.; ROLLS, B. J. Physiological mechanisms for thirst in the nonhuman primate. **Am J Physiol**, v. 242, n. 5, p. R423-8, May 1982. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7081465> >.
- ZHANG, Z.; BOURQUE, C. W. Amplification of transducer gain by angiotensin II-mediated enhancement of cortical actin density in osmosensory neurons. **J Neurosci**, v. 28, n. 38, p. 9536-44, Sep 17 2008. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18799685> >.