

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCar

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
CONVÊNIO UFSCar/UNESP

**ESPECIFICIDADE DO APETITE AO SÓDIO: UMA POSSÍVEL
CONTRIBUIÇÃO HORMONAL**

RICHARD BOARATO DAVID

SÃO CARLOS

2006

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

**ESPECIFICIDADE DO APETITE AO SÓDIO: UMA POSSÍVEL
CONTRIBUIÇÃO HORMONAL**

Richard Boarato David

Prof. Dr. Laurival A. De Luca Jr. (orientador)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciências Fisiológicas, área de concentração Fisiologia.

São Carlos

2006

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

D249ea

David, Richard Boarato.

Especificidade do apetite ao sódio: uma possível
contribuição hormonal / Richard Boarato David. -- São
Carlos : UFSCar, 2006.

77 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São
Carlos, 2006.

1. Neurofisiologia. 2. Angiotensina II. 3.
Mineralocorticóide. 4. Hipovolemia. 5. Preferência mineral. I.
Título.

CDD: 612.8 (20^a)

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

Candidato: Richard Boarato David

Dissertação: Especificidade do apetite ao sódio: uma possível contribuição hormonal

A Comissão Examinadora da Defesa da Dissertação de Mestrado, em
sessão pública realizada a ____/____/____, considerou o candidato

_____.

Examinador (a): _____
Assinatura

Nome

Examinador (a): _____
Assinatura

Nome

Examinador (a): _____
Assinatura

Nome

Aos meus queridos pais, a minha irmã e à Danielle, pessoas que tenho como exemplo, pelo carinho e amparo, pela presença nos momentos importantes, pelos conselhos e pelo apoio incondicional ao meu trabalho;

Ao Prof. Dr. Laurival A. De Luca Jr., meu orientador desde a iniciação científica, pela confiança depositada em mim, pela oportunidade do ingresso neste programa de pós-graduação e por todo o conhecimento transmitido nestes seis anos de convivência;

Aos demais professores do Laboratório de Fisiologia – UNESP Araraquara, exemplos de competência e dedicação, pelo pronto auxílio prestado durante todo o meu trabalho;

Aos funcionários do departamento, pela amizade e pelo auxílio na execução deste trabalho;

Aos colegas do laboratório e a todos os meus amigos, pelo companheirismo e oportunidade de crescimento pessoal e profissional durante todos esses anos;

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS

APOIO FINANCEIRO



Resumo

DAVID, Richard Boarato. ESPECIFICIDADE DO APETITE AO SÓDIO: UMA POSSÍVEL CONTRIBUIÇÃO HORMONAL. PPGCF-UFSCar/UNESP, SÃO CARLOS: 2006.

A hipótese do sinergismo entre dois hormônios responsáveis pela conservação de sódio, a aldosterona e a ANG II, explica uma característica do apetite ao sódio, a ingestão de NaCl hipertônico em um animal hipovolêmico. Ingestão de NaCl hipertônico pode ser induzida em ratos normovolêmicos que receberam um tratamento combinado de mineralocorticóide e ANG II, em doses individuais insuficientes para induzir a ingestão de sódio (teste paradigmático do sinergismo). Sendo a motivação para uma ingestão específica de sódio uma outra característica do apetite ao sódio, o objetivo desta dissertação foi o de procurar um papel para a interação entre mineralocorticóide e ANG II na especificidade do apetite ao sódio.

Foram utilizados ratos Sprague-Dawley Holtzman (\cong 300 g p.c.) ambientados com livre acesso a bebedouros com água e uma ou mais soluções minerais palatáveis (KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M, NaCl 0,15 M) ou hipertônica (NaCl 0,50 M). Em testes de dois bebedouros, um dos bebedouros continha água e o outro, solução de KCl 0,01 M, NaHCO₃ 0,15 M, NaCl 0,15 M ou NaCl 0,50 M. Em testes de cinco bebedouros, um dos bebedouros continha água e cada um dos demais uma solução de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M ou NaCl 0,15 M.

Testes com dois ou cinco bebedouros foram empregados em animais depletados de sódio e no teste paradigmático do sinergismo. Nos testes de depleção de sódio, os animais receberam injeção sc de 10 mg de furosemida ou veículo, seguida de acesso a uma dieta hipossódica e água por vinte e quatro horas. Em seguida, o alimento foi removido e foram oferecidas soluções minerais para registro da ingestão das mesmas e de água (teste do apetite ao sódio). No teste paradigmático do sinergismo, os animais receberam injeção sc de 2,5 mg de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) ou óleo de girassol (veículo) uma vez ao dia, durante três dias, e uma injeção de 50 ng de ANG II (ou salina) no ventrículo lateral esquerdo, quatro horas após a última injeção de DOCA ou óleo. Passou-se a registrar a ingestão de líquidos imediatamente após a injeção de ANG II e remoção da ração.

O registro da ingestão diária mostrou que não houve preferência por nenhuma solução ou água durante o período de ambientação com cinco bebedouros. A depleção de sódio induziu ingestão preferencial de sódio no teste do apetite ao sódio, sendo a ingestão de NaCl 0,15 M maior do que a de NaHCO₃ tanto nos testes de dois como de cinco bebedouros. O tratamento com apenas DOCA aumentou a ingestão diária de NaCl 0,15 M e de NaHCO₃ sem alterar a ingestão diária de KCl e de NaCl 0,50 M, em testes de dois bebedouros. No teste paradigmático com ratos normovolêmicos, a ANG II combinada ao óleo promoveu ingestão das três soluções minerais palatáveis (KCl, NaHCO₃, NaCl) e de água em testes de dupla escolha, e preferência ao NaHCO₃ no teste com cinco bebedouros. O pré-tratamento com DOCA potencializou o efeito da ANG II apenas sobre a ingestão das soluções sódicas, mais evidente para NaCl, no teste com dois bebedouros (NaCl 0,15 M: DOCA/ANG II = 24,5 ± 6,7 ml/120 min. vs. ÓLEO/ANG II = 9,2 ± 1,8 ml/120 min.; NaHCO₃ 0,15 M: DOCA/ANG II = 17,0 ± 1,8 ml/120 min. vs. ÓLEO/ANG II = 14,6 ± 2,1 ml/120 min.; KCl 0,01 M: DOCA/ANG II = 9,8 ± 1,9 ml/120 min. vs. 11,9 ± 1,2 ml/120 min.), além de aumentar em 80 % a ingestão total de soluções sódicas no início do teste com cinco bebedouros. O efeito da indução de ingestão de NaCl 0,50 M pela combinação de DOCA com ANG II em testes de dois bebedouros foi replicado nos nossos animais.

Os resultados do teste paradigmático do sinergismo são coerentes com os testes do apetite ao sódio, sugerindo que o mineralocorticoide possa tornar mais seletivo o efeito da ANG II sobre a ingestão mineral. Assim, uma interação entre ANG II e mineralocorticoide poderia contribuir para a expressão de duas características do apetite ao sódio, não apenas a aceitação de soluções hipertônicas de NaCl, mas também a ingestão seletiva de sódio.

Palavras-chave: angiotensina II, aldosterona, apetite ao sódio, depleção de sódio, desoxicorticosterona, furosemida, hipovolemia, mineralocorticoide, palatabilidade, preferência mineral, sinergismo.

Abstract

DAVID, Richard Boarato. SODIUM APPETITE SPECIFICITY: A POSSIBLE HORMONAL CONTRIBUTION. PPGCF-UFSCar/UNESP, SÃO CARLOS: 2006.

The hypothesis of a synergy between two hormones responsible for sodium conservation, aldosterone and angiotensin II (ANG II), explains the expression of a characteristic of sodium appetite, hypertonic NaCl intake, in a hypovolemic animal. Hypertonic NaCl intake can be induced in normovolemic rats that received a combined treatment of mineralocorticoid and ANG II at individual doses not sufficient to induce sodium intake (paradigmatic synergy test). Considering the motivation to specific sodium intake another characteristic of sodium appetite, the objective of the present dissertation was to find out a role for the interaction between mineralocorticoid and ANG II on the specificity of sodium appetite.

Sprague-Dawley Holtzman rats (\cong 300 g b.w.) were housed with access to water and one or more palatable (0.01 M KCl, 0.05 mM CaCl₂, 0.15 M NaHCO₃, 0.15 M NaCl) or hypertonic (0.50 M NaCl) mineral solutions for ingestion. In two-bottle tests, a bottle contained water and another bottle contained either 0.01 M KCl, 0.15 M NaHCO₃, 0.15 M NaCl or 0.50 M NaCl. In five-bottle tests, a bottle contained water and each one of the remaining four bottles contained either 0.01 M KCl, 0.05 mM CaCl₂, 0.15 M NaHCO₃ or 0.15 M NaCl, respectively.

In sodium depletion tests, intact rats received each a 10 mg sc. injection of furosemide or vehicle followed by 24 h access to sodium deficient food and water. Then, food was removed and mineral solutions and water were offered for recording their intake (sodium appetite test). In the paradigmatic synergy test, the animals received daily single sc injection of 2.5 mg of deoxycorticosterone acetate (DOCA) or sunflower oil (vehicle) for three days and a left lateral cerebroventricular injection of 50 ng of ANG II four hours after the last DOCA or oil injection. Fluid intake record began immediately after ANG II injection and food removal.

The daily intake record showed no preference for any solution or water when animals had access to five bottles. Sodium depletion induced a preferential sodium intake, with higher NaCl than NaHCO₃ intake, in either two- or five-bottle sodium appetite tests. DOCA alone enhanced the daily 0.15 M NaCl and NaHCO₃ intake, but did not alter KCl or 0.50 M NaCl

intake in two-bottle tests. In the paradigmatic tests with normovolemic animals, ANG II combined to oil induced the ingestion of all three palatable mineral solutions (KCl, NaHCO₃, NaCl) and water, in two-bottle tests, and preference for NaHCO₃ in five-bottle tests. DOCA pretreatment enhanced only sodium solution intake, particularly NaCl intake, induced by ANG II in two-bottle tests (0.15 M NaCl: DOCA/ANG II = 24.5 ± 6.7 ml/120 min. vs. OIL/ANG II = 9.2 ± 1.8 ml/120 min.; 0.15 M NaHCO₃: DOCA/ANG II = 17.0 ± 1.8 ml/120 min. vs. OIL/ANG II = 14.6 ± 2.1 ml/120 min.; 0.01 M KCl: DOCA/ANG II = 9.8 ± 1.9 ml/120 min. vs. 11.9 ± 1.2 ml/120 min.), and enhanced by 80 % the total sodium solution intake in the beginning of the five-bottle test. The combined effect of DOCA with ANG II on the induction of 0.50 M NaCl intake in a two-bottle test was replicated in our animals.

The results from the paradigmatic synergy test are coherent with results from sodium appetite tests, suggesting that the mineralocorticoid may turn the effect of ANG II on mineral intake more selective to sodium intake. Thus, the combined ANG II and mineralocorticoid action could contribute to the expression of two characteristics of sodium appetite, not only the acceptance of hypertonic sodium solutions, but also the selective sodium intake.

Keywords: angiotensin II, aldosterone, deoxycorticosterone, furosemide, hypovolemia, mineral preference, mineralocorticoid, palatability, sodium appetite, sodium depletion, synergy.

Lista de abreviaturas

ANG II: angiotensina II

ANOVA: análise de variância

AT₁: receptor para angiotensina II subtipo 1

AV3V: região anteroventral ao terceiro ventrículo

BNST: núcleo leito da estria terminal

Cum.: cumulativa

DOCA: (acetato de) desoxicorticosterona

FURO: furosemida

icv: intracerebroventricular

Ing.: ingestão

iv: intravenoso

MnPO: núcleo pré-óptico mediano

MR: receptor para mineralocorticóide

NPBL: núcleo parabraquial lateral

NTS: núcleo do trato solitário

ÓLEO: óleo de girassol

OVLT: órgão vascularizado da lâmina terminal

PM: peso molecular

SAL: salina isotônica estéril

sc: subcutâneo

SFO: órgão subfornicial

SRAA: sistema renina-angiotensina-aldosterona

VL: ventrículo lateral

Lista de figuras

- Figura 1.** Esquerda: representação esquemática de um corte coronal 0,4 mm caudal ao bregma do rato, a mais próxima do sítio de injeção observado nos grupos experimentais. Direita: fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal representativo dos grupos estudados, indicando (seta vertical) o sítio de injeção no ventrículo lateral esquerdo (VL). A comissura anterior está contornada pela linha pontilhada.....27
- Figura 2.** Ingestão de NaCl 0,15 M (acima) e água (abaixo) vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO ou VEÍCULO alcalino, em teste de dupla escolha. *Diferente de VEÍCULO.31
- Figura 3.** Ingestão de NaHCO₃ 0,15 M (acima) e água (abaixo) vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO ou VEÍCULO alcalino, em teste de dupla escolha. *Diferente de VEÍCULO.32
- Figura 4.** Ingestão de KCl 0,01 M (acima) e água (abaixo) vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO ou VEÍCULO alcalino, em teste de dupla escolha. *Diferente de VEÍCULO.33
- Figura 5.** Ingestão de soluções minerais palatáveis vs. água (A) ou ingestão total (solução + água, B) em testes de dupla escolha, vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO (esquerda) ou VEÍCULO alcalino (direita). *Diferente da ingestão de água no mesmo grupo; ⁺ diferente da ingestão das outras soluções; [#] diferente da ingestão de KCl; ⁺⁺ diferente da ingestão total dos demais grupos; ^{##} diferente de KCl + água.34
- Figura 6.** Desenho representativo do posicionamento dos bebedouros na gaiola. As posições 1 a 5 foram ocupadas respectivamente por bebedouros contendo água desionizada, KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M, nesta ordem, da direita para a esquerda do rato em posição de beber, nos testes de quintupla escolha com posicionamento fixo (grupo FIXA). A posição que cada bebedouro ocupou foi modificada diariamente nos testes de quintupla escolha com posicionamento aleatório (grupo ALTERNADA), comum a todos os ratos do grupo. O cocho contendo ração ficou localizado durante todos os experimentos na face esquerda da gaiola em relação ao rato.36
- Figura 7.** Ingestão diária de água, KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M durante 7 dias em ratos normohidratados (acima) e ingestão diária relativa à posição (1 ao 5), independente do líquido presente, no mesmo grupo de ratos

normohidratados (abaixo). A posição relativa de cada bebedouro durante os 7 dias de disponibilidade de soluções minerais foi alternada aleatoriamente uma vez ao dia. *Diferente das demais soluções; **diferente da água; + diferente dos bebedouros 1, 2 e 5; ++ diferente do bebedouro 5.	37
Figura 8. Ingestão diária de água, KCl 0,01 M, CaCl ₂ 0,05 mM, NaHCO ₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M durante 7 dias. A posição dos bebedouros durante os 7 dias de disponibilidade de soluções minerais foi mantida fixa.	38
Figura 9. Ingestão de soluções palatáveis vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO (acima) ou VEÍCULO alcalino (abaixo), em teste de cinco bebedouros. Os números de 1 a 5 representam a disposição dos bebedouros em relação ao lado direito (D) e esquerdo (E) do rato em posição de beber (ver figura 6). Os símbolos representam a posição das soluções durante o experimento, que foi similar ao período de ambientação. +Diferente de água e soluções não sódicas; *diferente dos demais líquidos.	41
Figura 10. Ingestão de múltiplas soluções palatáveis vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO (acima) ou VEÍCULO alcalino (abaixo), em teste de cinco bebedouros. Os números de 1 a 5 representam a disposição dos bebedouros em relação ao lado direito (D) e esquerdo (E) do rato em posição de beber (ver figura 6). Os símbolos representam a posição das soluções durante o experimento, escolhida aleatoriamente. +Diferente de água e soluções não sódicas.	42
Figura 11. Efeito do tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc durante 3 dias (área hachurada) sobre a ingestão de NaCl hipertônico 0,50 M e água. *Diferente durante todos os dias de leituras.	44
Figura 12. Efeito do tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias (área hachurada) sobre a ingestão de NaCl 0,15 M e água. *Significativamente diferente de água; +Diferente da ingestão de NaCl dos dias 1, 8 e 9; #Diferente da ingestão de NaCl dos dias 1-4 e 7-9; §Diferente da ingestão de água dos dias 7-9.	45
Figura 13. Efeito do tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias (área hachurada) sobre a ingestão de NaHCO ₃ 0,15 M e água. *Menor do que a ingestão de NaHCO ₃ do dia 4; + menor do que a ingestão de NaHCO ₃ dos dias 4-6.	47
Figura 14. Efeito do tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias (área hachurada) sobre a ingestão de KCl 0,01 M e água.	48

- Figura 15.** Efeito da injeção central de ANG II 50 ng ou SAL (1 µl), após tratamento com DOCA 2,5 mg ou ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de NaCl hipertônico 0,50 M (acima) ou água (abaixo). *Diferente dos demais grupos; ⁺menor do que os grupos tratados com ANG II. O número de animais está entre parênteses. 51
- Figura 16.** Efeito da injeção central de ANG II 50 ng (1 µl), após tratamento com DOCA 2,5 mg ou ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de NaCl 0,15 M (acima) ou água (abaixo). *Diferente do grupo ÓLEO/ANG II; ⁺Menor do que os grupos tratados com ANG II. O número de animais está entre parênteses..... 56
- Figura 17.** Efeito da injeção central de ANG II 50 ng (1 µl), após tratamento com DOCA 2,5 mg ou ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de NaHCO₃ 0,15 M (acima) ou água (abaixo). *Diferente dos demais grupos; ⁺menor do que os grupos tratados com ANG II. O número de animais está entre parênteses..... 57
- Figura 18.** Efeito da injeção central de ANG II 50 ng (1 µl), após tratamento com DOCA 2,5 mg ou ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de KCl 0,01 M (acima) ou água (abaixo). ⁺Diferente dos grupos tratados dos grupos tratados com ANG II; *diferente dos demais grupos. O número de animais está entre parênteses..... 58
- Figura 19.** Soluções minerais palatáveis vs. água (A) ou ingestão total (solução + água, B) em testes de dupla escolha em animais tratados com DOCA 2,5 mg (esquerda) ou ÓLEO (direita), durante 3 dias, e ANG II 50 ng. *Diferente da ingestão de água no mesmo grupo; ⁺diferente da ingestão de água dos demais grupos; [§]diferente da ingestão de KCl; [#]diferente da ingestão total dos demais grupos. 59
- Figura 20.** Efeito da injeção icv de ANG II 50 ng (1 µl), após tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de água e soluções palatáveis de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M, acima, ou sobre a ingestão de água e ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl) e não sódicas (KCl + CaCl₂), abaixo. Teste realizado com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros. [#]Diferente de água; ⁺Diferente de H₂O, KCl e CaCl₂; *Diferente dos demais líquidos. 63
- Figura 21.** Efeito da injeção icv de ANG II 50 ng (1 µl), após tratamento com ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de água e soluções palatáveis de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M, acima, ou sobre a ingestão de água e ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl) e não sódicas (KCl +

CaCl₂), abaixo. Teste realizado com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros.

*Diferente dos demais líquidos. 64

Figura 22. Efeito da injeção icv de SAL (1 µl), após tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de água e soluções palatáveis de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M, acima, ou sobre a ingestão de água e ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl) e não sódicas (KCl + CaCl₂), abaixo. Teste realizado com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros.

*Diferente dos demais líquidos. 65

Figura 23. Efeito da injeção icv de SAL (1 µl), após tratamento com ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de água e soluções palatáveis de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M (acima) ou sobre a ingestão de água e ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl) e não sódicas (KCl + CaCl₂).

Teste realizado com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros. 66

Figura 24. Comparação da preferência mineral obtida nos grupos FURO/FIXA (experimento 1), ÓLEO/ANG II e DOCA/ANG II. Acima: ingestão de água e soluções palatáveis (KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M). Abaixo: ingestão de água, ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl), não sódicas (KCl + CaCl₂) e total. Testes realizados com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros (figuras 9, 20 e 21). *Diferente dos demais grupos. 67

Sumário

1. Introdução	16
1.1. Considerações gerais sobre o apetite ao sódio.....	16
1.2. Mecanismos hormonais reguladores da indução e facilitação da ingestão de sódio	16
1.2.1. Hormônios facilitadores do apetite ao sódio: a ação da angiotensina II e dos mineralocorticóides	17
1.2.1.1. Ação da angiotensina II	17
1.2.1.2. Ação dos mineralocorticóides	18
1.2.1.3. Ação combinada ou sinérgica entre a angiotensina II e os mineralocorticóides	19
1.3. Especificidade do apetite ao sódio.....	20
1.3.1. Ação individual dos hormônios na preferência mineral: ingestão específica versus ingestão não-específica.....	20
1.3.2. Interação entre mineralocorticóide e angiotensina II: mecanismo de produção de ingestão específica de sódio?.....	21
1.4. Objetivo	22
2. Materiais, métodos e resultados	22
2.1. Animais.....	22
2.2. Soluções minerais: tipos de sal e número de bebedouros utilizados	23
2.3. Cirurgia para implante de cânulas-guia	24
2.4. Drogas.....	25
2.5. Técnicas de injeção.....	25
2.6. Protocolos de indução do apetite ao sódio.....	25
2.6.1. Depleção de sódio por diurético (furosemida)	25
2.6.2. Teste paradigmático do sinergismo	26
2.7. Análise histológica	27
2.8. Análise estatística	28
2.9. Experimentos e Resultados.....	28

2.9.1. EXPERIMENTO 1: Seletividade da ingestão mineral na fase tardia da depleção de sódio quando soluções palatáveis estão disponíveis (teste de dois bebedouros)	28
2.9.2. EXPERIMENTO 2: Seletividade da ingestão mineral na fase tardia da depleção de sódio quando múltiplas soluções palatáveis estão disponíveis (teste de cinco bebedouros).....	35
2.9.2.1. Ingestão diária de soluções palatáveis.....	35
2.9.2.2. Teste de preferência mineral com oferecimento simultâneo de múltiplas soluções palatáveis após depleção de sódio	39
2.9.3. EXPERIMENTO 3: Efeito da palatabilidade sobre a seletividade da ingestão mineral promovida pelo tratamento com mineralocorticóide.....	43
2.9.3.1. Influência da concentração da solução sobre a indução da ingestão de NaCl promovida por mineralocorticóide.....	43
2.9.3.2. Teste da seletividade ao sódio promovida pelo tratamento com DOCA.....	46
2.9.4. EXPERIMENTO 4: Ingestão de NaCl hipertônico/aversivo induzida pelo sinergismo (experimento confirmatório).....	49
2.9.5. EXPERIMENTO 5: seletividade da ingestão mineral no protocolo do sinergismo DOCA/ANG II quando uma solução palatável e água estão disponíveis (teste de dois bebedouros)	52
2.9.6. EXPERIMENTO 6: Seletividade da ingestão mineral no protocolo do sinergismo DOCA/ANG II quando múltiplas soluções palatáveis e água estão disponíveis (teste de cinco bebedouros)	60
3. Discussão e conclusão	68
Referências bibliográficas.....	73

1. Introdução

1.1. Considerações gerais sobre o apetite ao sódio

A manutenção do volume nos compartimentos intracelular e extracelular é de fundamental importância para que os órgãos e tecidos possam executar suas funções adequadamente, ou seja, é crítica à manutenção da vida. Uma volemia adequada é necessária para que os tecidos sejam irrigados de uma forma eficiente e está intimamente relacionada à concentração de sódio dos líquidos corporais, responsável pela manutenção do equilíbrio osmótico entre os dois compartimentos.

A perda de água e sódio ocorre constantemente nos vertebrados pelo suor, saliva, excreção urinária e respiração. A busca e a ingestão de água e de sódio, essenciais para a reposição desses nutrientes, pelo menos em mamíferos, estão associadas a estados motivacionais como sede e apetite ao sódio. Sede é a denominação dada à sensação subjetiva decorrente da deficiência de água, à qual está associado o desejo de ingerir água (ROLLS; ROLLS, 1982). A motivação que leva o animal à procura, obtenção e consumo de sódio é chamada de apetite ao sódio (EPSTEIN, 1990). A desidratação que resulta em hipovolemia ativa mecanismos autonômicos e endócrinos de preservação e busca hidromineral além de, inicialmente, sede e, algumas horas depois, apetite ao sódio.

O apetite ao sódio é inato, específico e observado em resposta à deficiência de sódio em muitas espécies de animais, por exemplo, ratos, ovelhas e coelhos (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983; SCHULKIN, 1991a; FITZSIMONS, 1998; NOZAKI *et al.*, 2002). Este apetite também pode ser induzido em animais repletos de sódio através da administração exógena de hormônios facilitadores da ingestão de sódio e atenuado quando a ação destes hormônios é bloqueada (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983; SAKAI *et al.*, 1986; EPSTEIN; SAKAI, 1987).

1.2. Mecanismos hormonais reguladores da indução e facilitação da ingestão de sódio

A ingestão de água e sódio é regulada pelo balanço entre sinais facilitatórios e inibitórios no sistema nervoso central, provenientes de órgãos viscerais ou diretamente da

composição dos líquidos corpóreos. Um importante centro integrador para estes sinais é a região da lâmina terminal, composta pelo núcleo pré-óptico mediano (MnPO), órgão subfornicial (SFO) e órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) (FITZSIMONS, 1998), estes dois últimos fazendo parte dos órgãos circunventriculares. Além de receber e enviar projeções para várias outras regiões encefálicas relacionadas ao controle hidromineral e cardiovascular, esses dois órgãos circunventriculares, adjacentes ao terceiro ventrículo, são livres de barreira hematoencefálica, o que lhes permite monitorar a composição do plasma e do líquido (FITZSIMONS, 1998; MCKINLEY *et al.*, 2001). Do SFO e OVLT partem projeções para o MnPO, regiões hipotalâmicas e núcleo leito da estria terminal (BNST), áreas intimamente relacionadas ao controle hidroeletrólítico (THRASHER; KEIL, 1987; MCKINLEY *et al.*, 2001). O OVLT, por sua vez, recebe projeções do núcleo parabraquial lateral (NPBL), envolvido no controle inibitório da ingestão de sódio, além do núcleo do trato solitário (NTS), que recebe informações de enchimento cardiovascular, detectadas por baroreceptores, e aferências gustatórias via nervo corda do tímpano (JOHNSON; THUNHORST, 1997; MCKINLEY *et al.*, 2001; DANIELS; FLUHARTY, 2004).

A administração de fármacos natriuréticos, por exemplo, furosemida (FURO) e hidroclorotiazida, e a adrenalectomia, constituem paradigmas experimentais para a indução de apetite ao sódio possuindo em comum a ativação do sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA), sistema necessário para a conservação de sódio corporal (FREGLY; ROWLAND, 1985). A angiotensina II (ANG II) e os mineralocorticóides atingem concentrações plasmáticas elevadas durante a depleção de sódio e são capazes de promover, independentemente, o apetite ao sódio, como será descrito a seguir (FREGLY; ROWLAND, 1985; ROWLAND; MORIAN, 1999).

1.2.1. Hormônios facilitadores do apetite ao sódio: a ação da angiotensina II e dos mineralocorticóides

1.2.1.1. Ação da angiotensina II

A ANG II é um hormônio responsável pela indução de sede e apetite ao sódio em animais hipovolêmicos. A administração intravenosa (iv) de ANG II promove aumento da ingestão de NaCl em ratos (FINDLAY; EPSTEIN, 1980) e de NaHCO₃ hipertônico em

ovelhas (WEISINGER *et al.*, 1987) possivelmente devido a uma ação nos receptores angiotensinérgicos AT₁ dos órgãos circunventriculares prosencefálicos (ALLEN *et al.*, 1998). A depleção de sódio com furosemida associada a uma dose baixa de captopril, dose esta que inibe a enzima conversora de angiotensina apenas periféricamente, promove aumento do aporte de angiotensina I aos órgãos circunventriculares onde ela é convertida em ANG II, resultando em rápida e robusta ingestão de sódio (FITTS; MASSON, 1989; THUNHORST; JOHNSON, 1994). A ANG II quando administrada centralmente também promove indução do apetite ao sódio em ratos, camundongos, porcos e pombos (FITZSIMONS, 1998). Portanto, a ANG II proveniente do sangue e do líquido é monitorada pela lâmina terminal, que utiliza vias e sinapses angiotensinérgicas centrais na intercomunicação entre suas estruturas (FITZSIMONS, 1998). A integridade das estruturas localizadas na região préóptica periventricular anteroventral ao terceiro ventrículo (AV3V), como OVLT e MnPO parece ser necessária ao efeito natriorexigênico somente da ANG II: lesão da AV3V não abole ingestão de sódio promovida pela administração sistêmica de mineralocorticóide (DE LUCA JR. *et al.*, 1992).

1.2.1.2. Ação dos mineralocorticóides

A desoxicorticosterona (DOCA) ou a aldosterona administrada cronicamente induz apetite ao sódio em ratos intactos (RICHTER, 1956; WOLF, 1965). Ambas promovem efeito duplo em ratos adrenalectomizados: i) doses de reposição reduzem a ingestão de sódio promovida pela depleção crônica de sódio induzida pela adrenalectomia; ii) doses maiores de mineralocorticóide promovem ingestão de sódio. Estes dois efeitos dos mineralocorticóides, em ratos adrenalectomizados, determinam uma curva dose-resposta em forma de “U” (CLARK; CLAUSEN, 1943; RICHTER, 1956; WOLF, 1965; FREGLY; ROWLAND, 1985; FITZSIMONS, 1998).

A amígdala foi uma das primeiras estruturas telencefálicas reconhecida como sendo importante para o controle da ingestão de sódio (COVIAN *et al.*, 1975). São atribuídas à amígdala as funções de interpretar sinais internos (ativação de viscerosceptores e receptores localizados nos órgãos circunventriculares) e externos (como visão e olfação) para desencadear a resposta adaptativa mais apropriada (JOHNSON; THUNHORST, 1997). Um de seus núcleos, o núcleo central, por exemplo, é necessário para a ingestão de sódio, seja aquela espontânea, seja aquela induzida por mineralocorticóides ou ANG II (SCHULKIN,

1991a; GALAVERNA *et al.*, 1992; JOHNSON; THUNHORST, 1997). Por sua vez, a região medial da amígdala, onde são encontrados receptores para mineralocorticoide (MR), é um possível sítio de ação da aldosterona, pois a lesão desta área abole o apetite ao sódio promovido por desoxicorticosterona e aldosterona, mas não a ingestão de sódio induzida por ANG II (NITABACH *et al.*, 1989; SCHULKIN, 1991a; ZHANG *et al.*, 1993). Os MR estão amplamente distribuídos pelo encéfalo, entretanto, devido à ausência da enzima 11-desidrogenase de hidroxisteróide tipo 2 - que evita a ligação de glicocorticóides aos MR - na maior parte do encéfalo, inclusive na amígdala, é possível que os mineralocorticóides atuem em receptores localizados em neurônios circunscritos a poucos núcleos como, por exemplo, o núcleo do trato solitário, de onde são enviadas projeções que se dirigem para a amígdala (GEERLING; LOEWY, 2006; GEERLING *et al.*, 2006a; GEERLING *et al.*, 2006b).

1.2.1.3. Ação combinada ou sinérgica entre a angiotensina II e os mineralocorticóides

A hipótese do sinergismo explica como dois hormônios responsáveis pela conservação de sódio, aldosterona e ANG II, interagem produzindo o apetite ao sódio (EPSTEIN; SAKAI, 1987; JOHNSON; THUNHORST, 1997; WEISINGER *et al.*, 2004). A concentração desses hormônios está elevada em animais hipovolêmicos e o antagonismo da ação de apenas um ou outro hormônio reduz, enquanto o duplo antagonismo abole o apetite ao sódio (SAKAI *et al.*, 1986). O sinergismo também é evidenciado no teste paradigmático do sinergismo, o qual é feito pela administração conjunta de ANG II e aldosterona (ou DOCA) a ratos hidratados, em doses incapazes de, individualmente, induzir ingestão de sódio; por este tipo de teste pode-se induzir apetite ao sódio também em pombos e babuínos (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983; EPSTEIN; SAKAI, 1987; MASSI; EPSTEIN, 1990; SHADE *et al.*, 2002).

O tratamento crônico com mineralocorticóides modifica a ação da ANG II em áreas encefálicas relacionadas ao controle hidroeletrólítico, seja aumentando o número de sítios de ligação, seja aumentando a taxa de disparo neuronal em resposta à infusão local de ANG II por iontoforese (WILSON *et al.*, 1986; KING *et al.*, 1988; THORNTON; NICOLAIDIS, 1994). A administração aguda de aldosterona também promove aumento da taxa de disparos, tanto basais como em resposta à ANG II em neurônios septo-preópticos, provavelmente devido a um efeito não genômico do mineralocorticoide (THORNTON; NICOLAIDIS,

1994). Portanto, os mineralocorticóides podem atuar centralmente como agentes facilitadores da ingestão de sódio induzida pela ANG II.

1.3. Especificidade do apetite ao sódio

O apetite ao sódio é caracterizado pela ingestão específica de sódio e é geralmente testado pelo oferecimento de soluções hipertônicas de NaCl. Os experimentos pioneiros de Richter mostraram que adrenalectomia bilateral em ratos, um paradigma de depleção crônica de sódio na ausência de corticóides, promove aumento da ingestão diária de NaCl 0,50 M ou isotônico, em relação à água, em testes de dupla escolha (RICHTER, 1936; RICHTER, 1956). Na adrenalectomia, ratos inicialmente preferem soluções de LiCl em relação a outros sais oferecidos em concentrações isomolares, aprendendo a evitá-las devido à toxicidade (NACHMAN, 1963). Maior ingestão diária de algumas soluções sódicas (cloreto, bicarbonato, sulfato e citrato) foi observada em ratos adrenalectomizados, em relação a soluções não sódicas (LiCl, KCl, CaCl₂) oferecidas alternadamente durante 55 dias (FREGLY, 1958). A depleção aguda de sódio promovida por FURO associada à dieta hipossódica, promove aumento da ingestão de NaCl hipo- ou hipertônico (WOLF, 1982), além de preferência marcante ao NaCl hipertônico ou isotônico em relação às soluções de sacarose, Gatorade[®] isotônico ou hipertônico e suco de laranja (NOZAKI *et al.*, 2002). Portanto, o sódio é o nutriente preferido no modelo de depleção de sódio induzida por diurético.

1.3.1. Ação individual dos hormônios na preferência mineral: ingestão específica versus ingestão não-específica

Apesar de repetidamente confirmado que o animal depletado de sódio prefere esse íon, parece haver algumas circunstâncias em que essa regra não se aplica. Por exemplo, a ingestão diária de solução de KCl é aumentada quando este é o único sal disponível para ratos adrenalectomizados (RICHTER, 1956). Além disso, a resposta bifásica característica do tratamento com desoxicorticosterona (RICHTER, 1956; WOLF, 1965) também é observada quando a única solução disponível para ingestão é de KCl (RICHTER, 1956).

É pertinente lembrar que a ingestão mineral do animal adrenalectomizado é creditada a uma ação central da ANG II (SAKAI; EPSTEIN, 1990; GALAVERNA *et al.*, 1996; SCHOORLEMMER *et al.*, 2001), e que é atribuída a este hormônio a ingestão mineral específica ao sódio (AVRITH; FITZSIMONS, 1980). No entanto, esta preferência ao sódio foi verificada após infusão central de ANG II, com água, solução de NaCl e KCl oferecidas simultaneamente em concentrações isomolares (0,15, 0,30 ou 0,45 M) (AVRITH; FITZSIMONS, 1980). Tendo sido neste caso adotado o critério de isomolaridade na escolha da concentração de KCl, as soluções foram testadas em níveis de palatabilidade muito diferentes, pois as curvas de preferência obtidas em testes de única (BRESLIN *et al.*, 1993) ou dupla escolha (RICHTER, 1956; TORDOFF, 1994) não são idênticas para estes sais.

Administração de baixas doses de captopril, aumentando o aporte de ANG II central, promove ingestão tanto de soluções sódicas como não sódicas em testes realizados com apenas um bebedouro (EVERED; RICHARDSON, 1985). Além disso, conforme mostram experimentos realizados em nosso laboratório, os ratos não apresentam preferência por água ou qualquer solução mineral palatável quando oferecidas simultaneamente em testes de cinco bebedouros durante a fase inicial de hipovolemia (PEREIRA *et al.*, 2005). Nesta situação, a ingestão hidromineral pode estar sendo comandada principalmente pela ANG II, pois a modulação genômica, de longo prazo, pela aldosterona sobre seus sítios-alvo, talvez não esteja ainda completamente ativa. Em contraste com a aparente ambigüidade dos efeitos da ANG II, o tratamento com DOCA produz ingestão seletiva de soluções sódicas (LOCKE; FIELDING, 1994).

1.3.2. Interação entre mineralocorticóide e angiotensina II: mecanismo de produção de ingestão específica de sódio?

A capacidade da ANG II induzir sozinha apetite ao sódio depende da concentração e do tempo total de administração do hormônio (FITZSIMONS, 1998). Assim, a expressão do apetite ao sódio em um animal depletado de sódio está aparentemente relacionada ao grau de ativação neuronal dependente da ANG II e, talvez, da interação das ações do peptídeo com as do mineralocorticóide. A interação hormonal, então, determinaria a mudança de preferência para soluções minerais que ocorre entre a fase inicial e a fase tardia de desidratação extracelular induzida por depleção de sódio. Na fase inicial não há preferência para o sódio, sequer na forma de NaCl isotônico, conforme determinado em teste de escolha com cinco

bebedouros, contendo dois deles soluções sódicas e os demais contendo solução de potássio, solução de cálcio e água (PEREIRA *et al.*, 2005). Na fase tardia (mínimo de 10 horas) é notória a preferência por solução sódica, mesmo se hipertônica (SCHULKIN, 1991a; WEISINGER *et al.*, 2004). Esse tempo maior parece permitir que a ANG II interaja com o mineralocorticoide para produzir o apetite ao sódio (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983). Então, será que a administração dos dois hormônios promove preferência mineral similar à hipovolemia? Podemos prever que a ação sinérgica entre a ANG II e o mineralocorticoide em um animal depletado de sódio produza não apenas ingestão de NaCl hipertônico, mas também aumento seletivo na ingestão de sódio comparado a outro mineral. Assim sendo, esse comportamento seletivo poderia ser simulado no teste paradigmático do sinergismo.

1.4. Objetivo

Verificar o papel da interação entre mineralocorticoide e ANG II sobre a especificidade da ingestão de sódio quando soluções palatáveis são oferecidas.

2. Materiais, métodos e resultados

2.1. Animais

Ratos Sprague-Dawley Holtzman, com peso corporal entre 280-310 g, foram ambientados individualmente em biotério com controle do ciclo claro-escuro ajustado para 12/12 h, temperatura ambiente e umidade entre 23 ± 2 °C e $55 \pm 10\%$ respectivamente. Exceto quando descrito o contrário, os ratos tiveram acesso livre para ingestão dois ou cinco bebedouros de polipropileno, graduados a cada 1,0 ml, com bicos de aço inoxidável, um contendo água deionizada e os demais contendo uma solução mineral, montados na parte frontal das gaiolas (*ver item 2.9.2.1.*). Ração granulada padrão para roedores foi oferecida em um cocho localizado na face esquerda de cada gaiola. O oferecimento do bebedouro contendo solução mineral, em adição ao bebedouro com água previamente oferecido, ocorreu dois dias após a cirurgia e todos os experimentos foram iniciados ao menos três dias após os animais terem sido ambientados com todos os líquidos disponíveis. A disposição e o número de bebedouros utilizados, assim como as soluções oferecidas, variaram para cada experimento

conforme descrito adiante. Todos os testes foram iniciados entre as 14:00-15:00 h. A ingestão diária dos líquidos foi medida entre 10:00 h e 11:00 h; os dados dos dias de ambientação e recuperação da cirurgia foram ignorados. Os protocolos experimentais seguiram as recomendações do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pelo Comitê de Ética para uso e cuidado de animais da Faculdade de Odontologia UNESP, Araraquara.

2.2. Soluções minerais: tipos de sal e número de bebedouros utilizados

Muitos testes de especificidade ao NaCl em relação a outros minerais não levam em consideração a palatabilidade das soluções oferecidas aos animais, muitas vezes utilizando soluções isomolares ou confrontando sais em diferentes concentrações, porém em diferentes graus de palatabilidade (RICHTER, 1956; NACHMAN, 1963; SCHULKIN, 1991a). Nestas condições, o grau de palatabilidade para cada solução pode estar em níveis muito diferentes. Por exemplo, uma solução 0,30 M é duas vezes mais concentrada do que a palatável para o NaCl (0,15 M) e trinta vezes mais concentrada do que a palatável para o KCl (0,01 M), o que pode determinar um índice de rejeição maior para soluções de potássio nessa concentração (TORDOFF, 1994). Assim como a curva de preferência para soluções de NaCl segue o padrão de “U-invertido” com pico de preferência na concentração de 0,15 M para ratos (RICHTER, 1956; FREGLY; ROWLAND, 1986; BRESLIN *et al.*, 1993), outros sais (principalmente compostos por cátions monovalentes e bivalentes) também seguem este mesmo padrão, variando entre si a concentração palatável (TORDOFF, 1994). Assim, ao se escolher as soluções minerais a serem utilizadas em testes de preferência mineral, deveria ser levado em consideração a palatabilidade, e não simplesmente utilizar soluções isomolares (TORDOFF, 1994).

Uma outra possível dificuldade para se interpretar os resultados dos testes de preferência de soluções minerais seria o número de bebedouros oferecidos. A disponibilidade parece ser um fator importante para a ingestão mineral, pois o grau de preferência do NaCl em relação à água, em camundongos, parece ser influenciada pelo número de bebedouros que contém a solução (TORDOFF; BACHMANOV, 2003). Além de influenciar a preferência em relação à água, o número de bebedouros pode estar associado também a conclusões diferentes sobre o tipo de mineral que o animal prefere. Por exemplo, animais com desidratação celular ingerem quantidades parecidas de água e NaCl isotônico em testes de

dupla escolha (PEREIRA *et al.*, 2002), mas mostram nítida preferência por solução de KCl 0,01 M, sem alterar o volume total ingerido, em teste com cinco bebedouros (PEREIRA *et al.*, 2005).

Considerando então que o número de bebedouros pode influenciar a preferência mineral, foram realizados experimentos com dois bebedouros (teste de dois bebedouros), um contendo água e outro contendo solução mineral palatável, e experimentos com cinco bebedouros (teste de cinco bebedouros), um contendo água e os demais contendo soluções minerais palatáveis. As soluções minerais palatáveis utilizadas foram KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M, cada uma delas na concentração de maior preferência, determinadas em trabalhos anteriores (RICHTER, 1956; BRESLIN *et al.*, 1993; TORDOFF, 1994) ou em testes piloto realizados em nosso laboratório para o NaHCO₃. A solução aversiva utilizada foi NaCl 0,50 M. Os líquidos foram oferecidos em um bebedouro contendo água deionizada e outro bebedouro contendo solução de KCl, NaHCO₃ ou NaCl (testes de dupla-escolha), ou em um bebedouro contendo água e outros quatro bebedouros contendo, em cada um, uma solução palatável, para testar a preferência mineral quando múltiplas soluções são oferecidas simultaneamente (testes de cinco bebedouros). A escolha dos minerais está baseada em resultados da literatura. A solução de bicarbonato de sódio é ingerida em grande quantidade por ratos depletados de sódio (ROWLAND; COLBERT, 2003) e ratos repletos ou deficientes de potássio ou sódio apresentam ingestão de cloreto de potássio (RICHTER, 1956; TORDOFF, 1994; PEREIRA *et al.*, 2005). Ingestão de cloreto de cálcio foi observada após injeção subcutânea polietilenoglicol, que causa hipovolemia/seqüestro de íons do líquido extracelular (TORDOFF, 1997). Todas as soluções foram preparadas a partir do sal (Labsynth) dissolvido em água deionizada.

2.3. Cirurgia para implante de cânulas-guia

Os animais utilizados foram anestesiados com cetamina (Agener, 80 mg/kg peso corporal) combinada com xilazina (Agener, 7 mg/kg peso corporal) e posicionados em um aparelho estereotáxico (Kopf). O crânio foi nivelado entre o bregma e o lambda. Cânulas-guia de aço inoxidável (10 X 0,7 mm) foram implantadas unilateralmente no ventrículo lateral esquerdo (VL). Foram utilizadas as seguintes coordenadas: 0,3 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral à linha média e 3,9 mm abaixo da superfície cranial. As cânulas-guia foram fixadas ao crânio usando resina acrílica odontológica e parafusos. Exceto durante as injeções, um

mandril de metal foi utilizado para o preenchimento e fechamento da extremidade externa das cânulas-guia.

2.4. Drogas

As drogas utilizadas foram: furosemida (FURO PM = 330,8, 10 mg, Aldrich), dissolvida em veículo alcalino (VEÍCULO); acetato de desoxicorticosterona (DOCA, PM = 372,5, 2,5 mg, Sigma), dissolvida em veículo óleo de girassol (ÓLEO); angiotensina II (ANG II, PM = 1.046,2, 50 ng, Sigma), dissolvida em veículo salina isotônica estéril (SAL). A dose de ANG II está dentro da faixa considerada dipsogênica em experimentos prévios (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983; FITZSIMONS, 1998).

2.5. Técnicas de injeção

Uma única injeção subcutânea (sc) de DOCA ou ÓLEO, em volume total de 1,0 ml, foi feita entre 10:00 h e 11:00 h durante 3 dias consecutivos. FURO ou VEÍCULO foram injetados sc uma única vez num volume de 1 ml para cada rato em cada experimento. Um pulso de injeção intracerebroventricular (icv) foi feito após o animal ter sido gentilmente removido de sua gaiola, substituído o mandril por uma injetora 2,0 mm mais longa do que a cânula-guia acoplada a uma seringa Hamilton de 10 µl por um tubo PE-10. ANG II ou SAL foi injetada num volume total de 1,0 µl durante 30 s. Após a injeção central a injetora foi removida e a reposição do mandril em cada cânula-guia foi feita. Imediatamente após a administração das drogas relativas a cada protocolo experimental, cada rato foi recolocado gentilmente em sua respectiva gaiola individual.

2.6. Protocolos de indução do apetite ao sódio

2.6.1. Depleção de sódio por diurético (furosemida)

Animais intactos foram ambientados em gaiolas individuais com ração, um bebedouro de polipropileno (graduado em 1,0 ml) contendo água deionizada e outro contendo uma solução mineral palatável de NaCl, NaHCO₃ ou KCl (teste de dois bebedouros) ou um bebedouro contendo água deionizada e outros quatro contendo, em cada um, uma solução mineral palatável de NaCl, NaHCO₃, CaCl₂ e KCl (teste de múltipla escolha), disponíveis *ad libitum* exceto quando descrito o contrário. Cinco ou sete dias após o período de ambientação, os grupos de animais foram divididos em dois: metade recebeu injeção sc de FURO (10 mg/1 ml), metade recebeu injeção sc de VEÍCULO (1 ml). Após o tratamento, os animais retornaram às suas gaiolas, previamente lavadas para a remoção de resíduos de sódio. Durante vinte e quatro horas, os animais tiveram disponíveis água deionizada e fubá (alimento pobre em sódio). Após este período, o fubá foi removido da gaiola e foram oferecidos dois ou cinco bebedouros de vidro (graduação de 0,1 ml), com bico de aço inoxidável, contendo os mesmos líquidos do período de ambientação, montados na parte frontal da gaiola. A ingestão dos líquidos foi medida até os 120 minutos após o início dos testes. Não houve inversão dos grupos experimentais para minimizar as diferenças em relação ao teste paradigmático do sinergismo, descrito a seguir.

2.6.2. Teste paradigmático do sinergismo

Após o implante de cânula-guia no VL, os ratos foram alojados em gaiolas individuais com água e ração durante dois dias. Após este período, os animais foram ambientados com ração, um bebedouro de polipropileno (graduado em 1,0 ml) contendo água deionizada e outro contendo uma solução mineral de NaCl (0,15 M ou 0,50 M), NaHCO₃ 0,15 M ou KCl 0,01 M (teste de dois bebedouros) ou um contendo água deionizada e outros quatro contendo, cada um, uma solução mineral palatável de NaCl, NaHCO₃, CaCl₂ e KCl (teste de cinco bebedouros). Pelo menos três dias após o período de ambientação, os grupos de animais foram divididos em dois: uma metade foi tratada com DOCA (2,5 mg/1 ml) sc e a outra com ÓLEO (1 ml) sc. As injeções foram repetidas por mais duas vezes, uma vez ao dia. Quatro horas após a terceira injeção de DOCA ou ÓLEO, a ração foi removida da gaiola e os animais receberam uma injeção icv de ANG II (50 ng/1 µl) ou SAL, perfazendo quatro diferentes tratamentos (DOCA/ANG II, DOCA/SAL, ÓLEO/ANG II, ÓLEO/SAL) e, ao todo, 20 grupos experimentais. Imediatamente após a injeção central, os animais foram gentilmente recolocados em suas respectivas gaiolas. Bebedouros de vidro (graduação de 0,1 ml) com bico

de aço inoxidável, contendo os mesmos líquidos do período de ambientação, foram montados na parte frontal da gaiola. A ingestão dos líquidos foi medida até 60 ou 120 minutos após o início dos testes, dependendo do experimento. Não houve inversão de grupos para evitar um possível efeito residual do tratamento com mineralocorticóide sobre a ingestão mineral.

2.7. Análise histológica

Ao final dos experimentos nos quais foram realizadas injeções centrais, os animais foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (70 mg/kg peso corporal, Cristália) e perfundidos com formalina (10%) injetada através do ventrículo cardíaco esquerdo. Após a fixação em formalina, os encéfalos foram cortados em um micrótomo de congelamento. Seções transversais (50 μ m) foram analisadas em microscópio óptico para confirmar o posicionamento da cânula-guia e da microinjeção no interior do VL. Apenas os dados dos ratos com confirmação histológica de que a injeção ocorreu dentro do VL (*ver Figura 1*) foram utilizados para análise dos resultados, de acordo com a literatura específica (PAXINOS; WATSON, 1986).

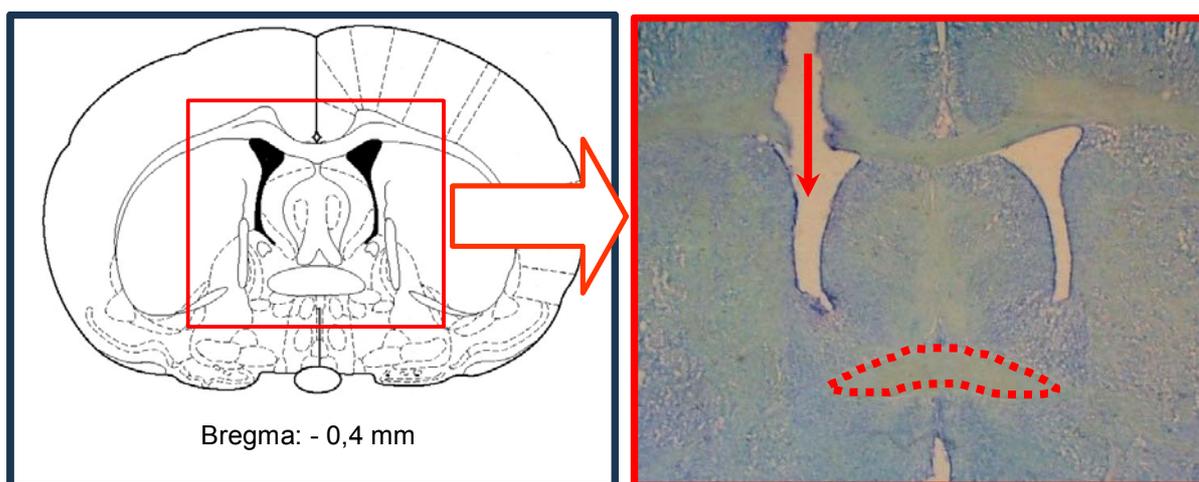


Figura 1. Esquerda: representação esquemática de um corte coronal 0,4 mm caudal ao bregma do rato, a mais próxima do sítio de injeção observado nos grupos experimentais. Direita: fotomicrografia de um corte histológico do cérebro de um animal representativo dos grupos estudados, indicando (seta vertical) o sítio de injeção no ventrículo lateral esquerdo (VL). A comissura anterior está contornada pela linha pontilhada.

2.8. Análise estatística

Os dados foram descritos como média \pm erro padrão da média. ANOVA de dois fatores com medidas repetidas foi utilizada para comparar a ingestão de líquidos durante todo o teste (fator tempo e líquido), para comparar a ingestão diária de diferentes líquidos (fator dia e líquido), para comparar a preferência pela posição do bebedouro durante os dias (fator dia e bebedouro), para comparar a ingestão de um determinado líquido em função do tempo entre diferentes tratamentos (fator tempo e tratamento), para comparar a ingestão total de líquidos em função do tempo entre diferentes tratamentos (fator tempo e tratamento) ou para comparar a ingestão de diferentes líquidos em função do tempo num mesmo tratamento (fator tempo e líquido). Quando verificada diferença estatística pela ANOVA, o teste Student-Newman-Keuls (*post hoc*) foi aplicado. O nível de significância considerado foi o de $P < 0,05$ para todos os testes.

2.9. Experimentos e Resultados

2.9.1. EXPERIMENTO 1: Seletividade da ingestão mineral na fase tardia da depleção de sódio quando soluções palatáveis estão disponíveis (teste de dois bebedouros)

- **Protocolo experimental:**

O apetite ao sódio promove ingestão específica ao sódio, vastamente demonstrado utilizando soluções de outros sais isomolares à solução de NaCl, muitas vezes hipertônica (aversiva ao rato). Será que ratos depletados de sódio apresentam ingestão específica ao sódio mesmo quando soluções palatáveis são testadas?

Para testar a preferência mineral na fase tardia da depleção de sódio, trinta e seis ratos foram ambientados com ração e dois bebedouros de polipropileno, um deles contendo água deionizada e o outro uma solução palatável (NaCl 0,15 M, NaHCO₃ 0,15 M ou KCl 0,01 M) *ad libitum*, respectivamente da direita para a esquerda do rato em posição de beber, resultando três grupos de doze ratos. Cinco dias após o período de ambientação, cada grupo foi subdividido em dois (seis ratos por grupo), e os animais foram tratados com FURO (10 mg/1 ml) sc ou

VEÍCULO (1 ml) sc. Após os tratamentos, os animais retornaram às gaiolas lavadas e tiveram disponíveis apenas água deionizada e fubá. Vinte e quatro horas após os tratamentos, o fubá foi removido das gaiolas e dois bebedouros de vidro graduados em 0,1 ml com bico de aço inoxidável, contendo os mesmos líquidos do período de ambientação, foram oferecidos aos ratos. As ingestões foram medidas aos 15, 30, 60 e 120 minutos.

▪ **Resultados:**

a) NaCl 0,15 M e água:

A ingestão de NaCl 0,15 M foi maior no grupo FURO ($25,0 \pm 2,6$ ml/120 min.; $n = 6$) em relação ao grupo VEÍCULO ($10,9 \pm 2,6$ ml/120 min.; $n = 6$) a partir dos 30 minutos de experimento [$F(3,30) = 6,2$, $P < 0,05$] (ver Figura 2, acima).

Não houve diferença na ingestão de água entre os tratamentos FURO ($0,4 \pm 0,1$ ml/120 min.; $n = 6$) e VEÍCULO ($0,2 \pm 0,0$ ml/120 min.; $n = 6$) [$F(3,30) = 1,4$, $P > 0,05$] (ver Figura 2, abaixo).

b) NaHCO₃ 0,15 M e água:

A ingestão de NaHCO₃ 0,15 M foi maior no grupo tratado com FURO ($20,0 \pm 3,2$ ml/120 min.; $n = 6$) em relação ao grupo tratado com VEÍCULO ($3,2 \pm 1,0$ ml/120 min.; $n = 6$) durante todo o experimento [$F(3,30) = 6,2$, $P < 0,05$] (ver Figura 3, acima).

Não houve diferença na ingestão de água entre os tratamentos FURO ($0,1 \pm 0,1$ ml/120 min.; $n = 6$) e VEÍCULO ($0,2 \pm 0,2$ ml/120 min.; $n = 6$) [$F(3,30) = 0,0$, $P > 0,05$] (ver Figura 3, abaixo).

c) KCl 0,01 M e água:

A ingestão de KCl 0,01 M não foi diferente entre os tratamentos FURO ($0,9 \pm 0,5$ ml/120 min.; $n = 6$) e VEÍCULO ($0,3 \pm 0,2$ ml/120 min.; $n = 6$) durante todo o experimento [$F(3,30) = 1,5$, $P > 0,05$] (ver Figura 4, acima).

Também não houve diferença na ingestão de água entre os tratamentos FURO ($1,3 \pm 0,5$ ml/120 min.; $n = 6$) e VEÍCULO ($0,3 \pm 0,1$ ml/120 min.; $n = 6$) [$F(3,30) = 0,6$, $P > 0,05$] (ver Figura 4, abaixo).

d) Comparação entre todas as soluções minerais e água:

Ambos os tratamentos promoveram aumento da ingestão das soluções de NaCl [FURO: $F(1,5) = 170,8$; VEÍCULO: $F(1,5) = 13,8$, $P < 0,05$] e NaHCO_3 0,15 M [FURO: $F(1,5) = 73,6$; VEÍCULO: $F(1,5) = 7,0$, $P < 0,05$] em relação à água, porém não houve diferença entre a ingestão de KCl 0,01 M e água independentemente do tratamento [FURO: $F(1,5) = 1,9$; VEÍCULO: $F(1,5) = 0,4$, $P < 0,05$] (ver Figura 5 A).

No grupo FURO, a ingestão de NaCl 0,15 M foi maior do que as outras soluções e a ingestão de NaHCO_3 0,15 M foi maior do que a de KCl 0,01 M [$F(2,15) = 59,4$ $P < 0,05$]. No grupo VEÍCULO, a ingestão de NaCl 0,15 M foi maior do que as outras soluções; não houve diferença entre a ingestão de NaHCO_3 0,15 M e a de KCl 0,01 M [$F(2,15) = 8,3$ $P < 0,05$]. A ingestão de água foi semelhante entre todos os grupos em ambos os tratamentos [FURO: $F(2,15) = 3,4$; VEÍCULO: $F(2,15) = 0,1$, $P < 0,05$] (ver Figura 5 A).

A ingestão total (ingestão de água + solução palatável) foi maior no grupo que tinha NaCl disponível em ambos os tratamentos; a ingestão total do grupo que tinha NaHCO_3 disponível foi maior em relação ao grupo com KCl apenas no tratamento FURO [FURO: $F(2,15) = 53,5$; VEÍCULO: $F(2,15) = 8,3$, $P < 0,05$] (ver Figura 5 B).

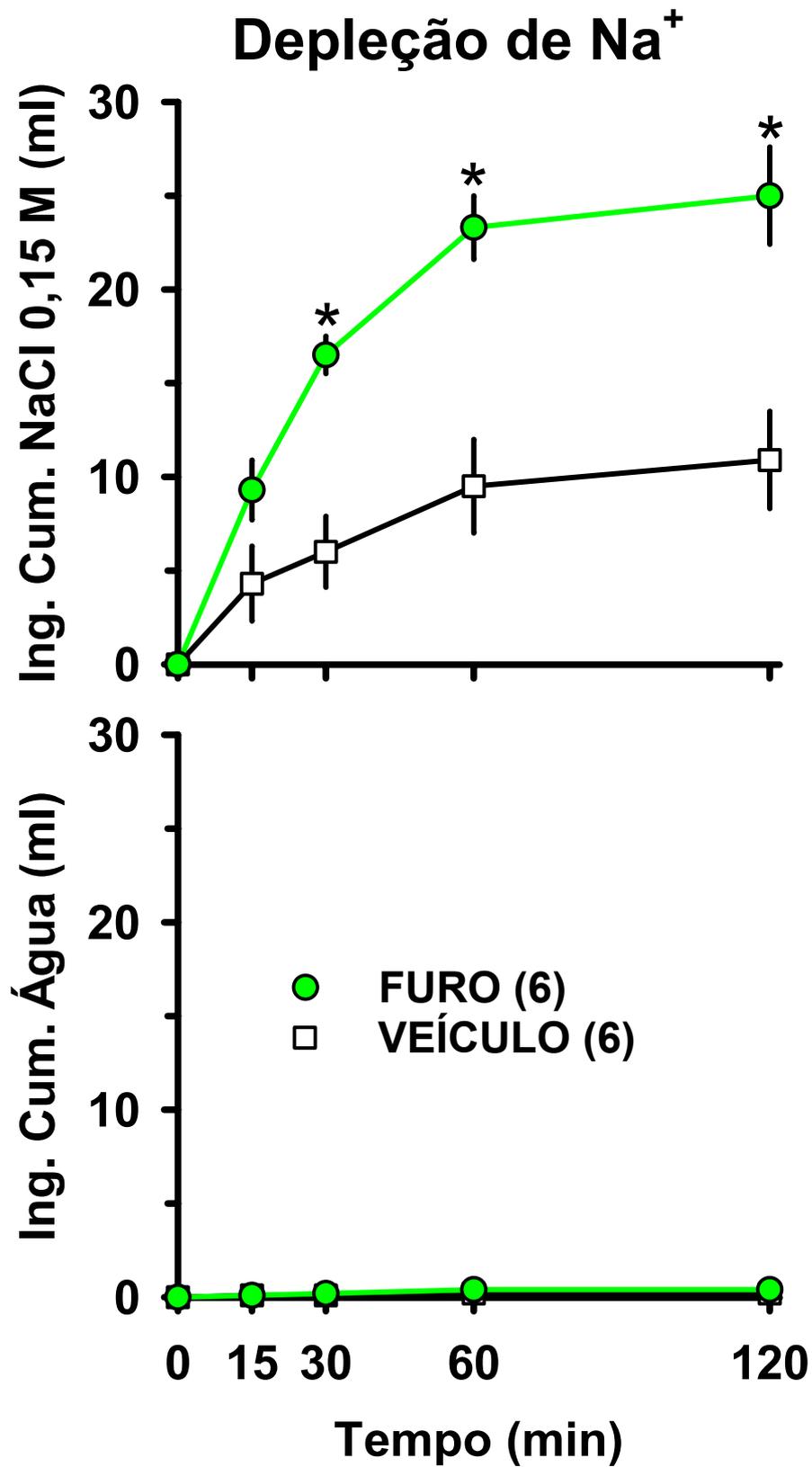


Figura 2. Ingestão de NaCl 0,15 M (acima) e água (abaixo) vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO ou VEÍCULO alcalino, em teste de dupla escolha. *Diferente de VEÍCULO.

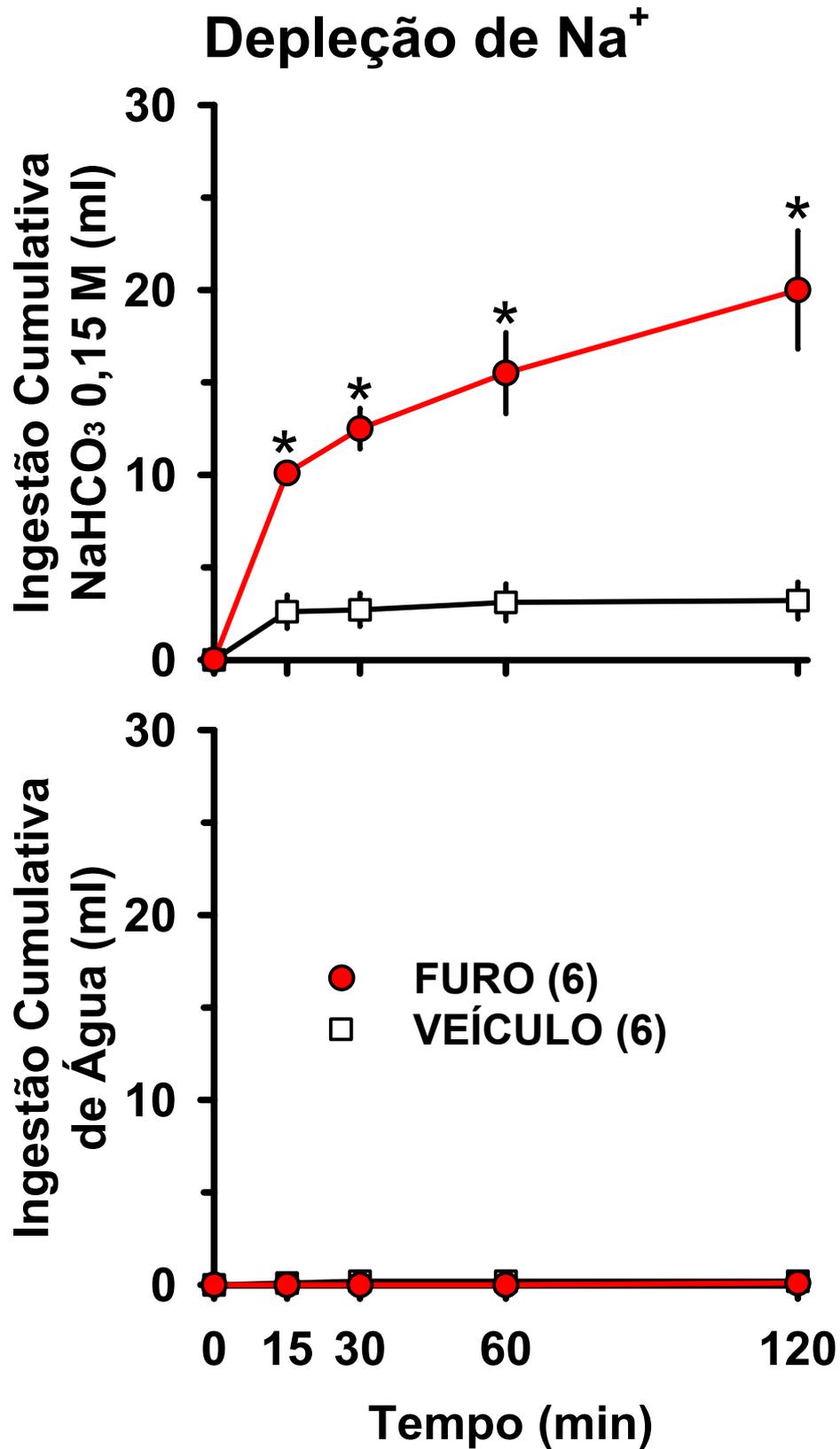


Figura 3. Ingestão de NaHCO₃ 0,15 M (acima) e água (abaixo) vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO ou VEÍCULO alcalino, em teste de dupla escolha. * Diferente de VEÍCULO.

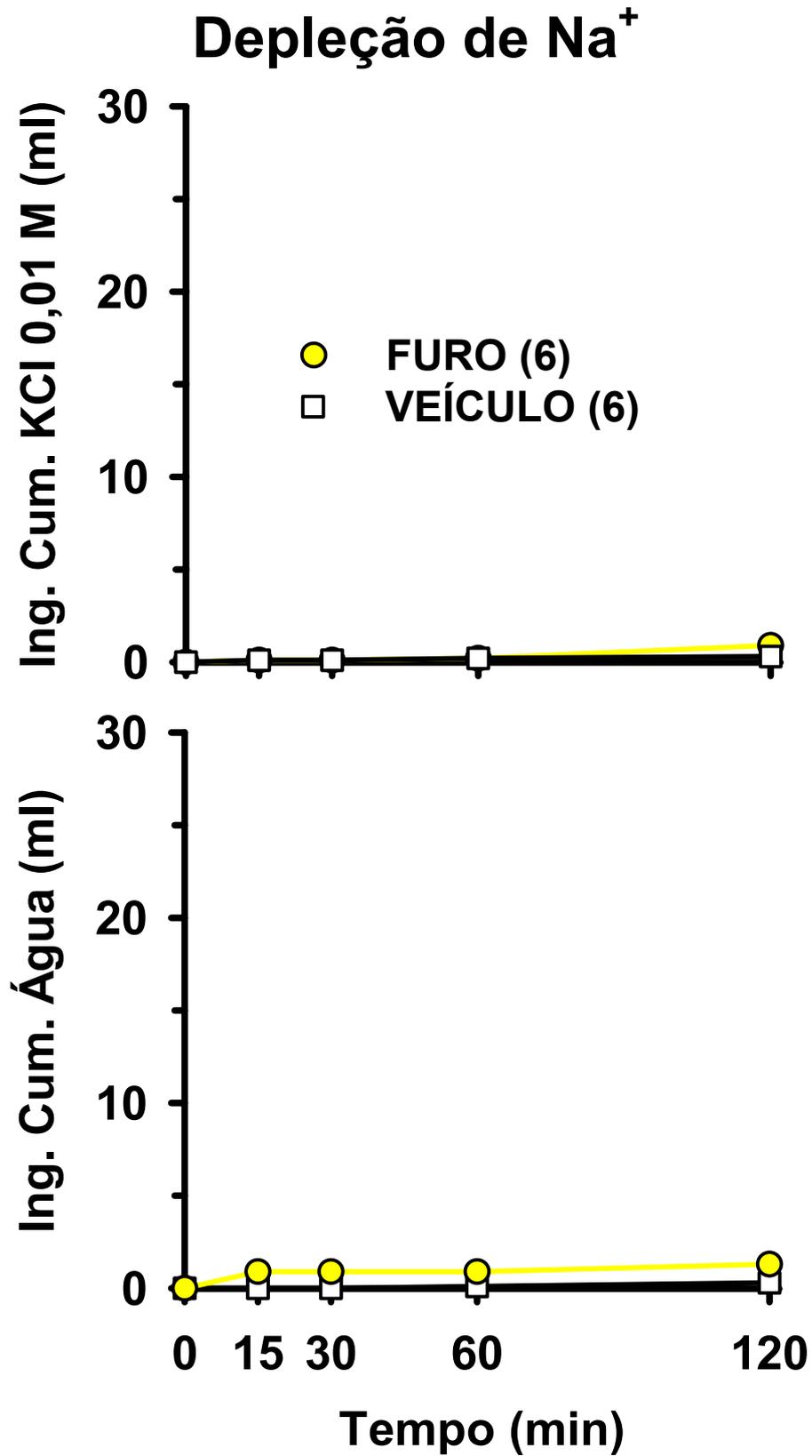
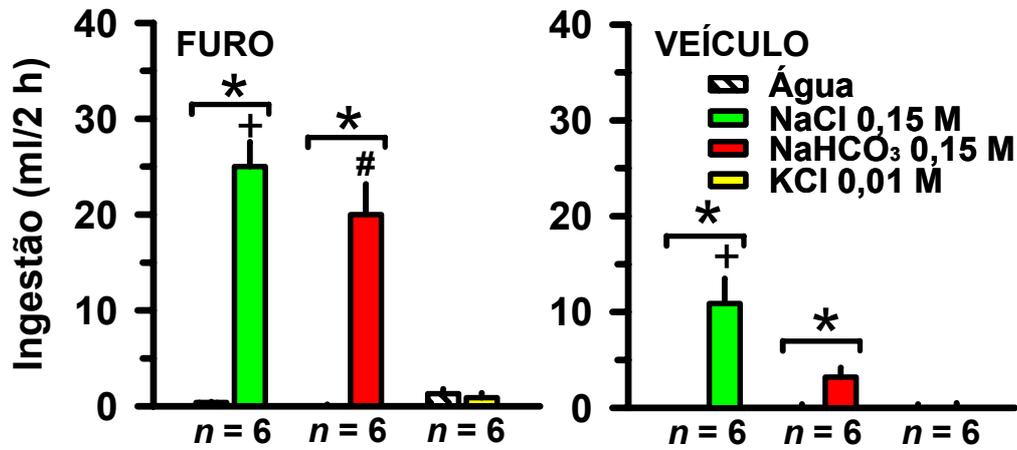


Figura 4. Ingestão de KCl 0,01 M (acima) e água (abaixo) vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO ou VEÍCULO alcalino, em teste de dupla escolha. *Diferente de VEÍCULO.

A Preferência: soluções palatáveis vs. água



B Ingestão total

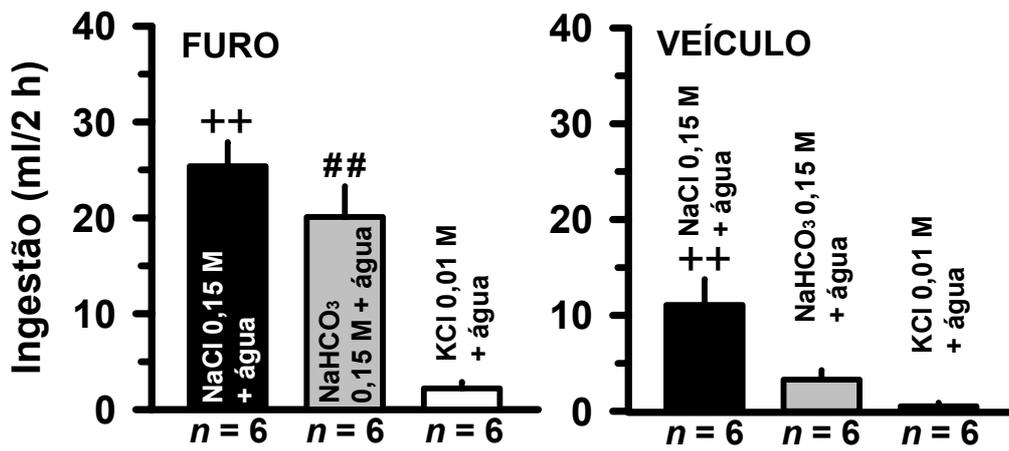


Figura 5. Ingestão de soluções minerais palatáveis vs. água (A) ou ingestão total (solução + água, B) em testes de dupla escolha, vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO (esquerda) ou VEÍCULO alcalino (direita). *Diferente da ingestão de água no mesmo grupo; + diferente da ingestão das outras soluções; # diferente da ingestão de KCl; ** diferente da ingestão total dos demais grupos; ## diferente de KCl + água.

2.9.2. EXPERIMENTO 2: Seletividade da ingestão mineral na fase tardia da depleção de sódio quando múltiplas soluções palatáveis estão disponíveis (teste de cinco bebedouros)

2.9.2.1. Ingestão diária de soluções palatáveis

- **Protocolo experimental:**

Para verificar se existe preferência por soluções minerais palatáveis quando ratos normohidratados têm a possibilidade de escolha, onze ratos foram ambientados com água deionizada e soluções minerais de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M (cinco bebedouros), posicionados nesta ordem durante todo o período experimental (grupo FIXA), da direita para a esquerda em relação ao rato em posição de beber (*ver Figura 6*). Sete dias após o período de ambientação, cinco ratos foram tratados com FURO e seis ratos receberam injeção de VEÍCULO. Foi medido diariamente o volume ingerido para cada líquido dos ratos pertencentes ao grupo FURO/FIXA ($n = 5$).

Como todas as soluções testadas simultaneamente são palatáveis, uma possível preferência por lugar na gaiola poderia ser confundida como preferência por solução. Para verificar se, em nossas condições experimentais, a ingestão mineral sofre influência da posição dos bebedouros, doze ratos foram ambientados com água deionizada e soluções minerais de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M (cinco bebedouros), alternados aleatoriamente uma vez ao dia durante todo o período experimental (grupo ALTERNADA). Sete dias após o período de ambientação, seis ratos foram tratados com furosemida e seis ratos receberam injeção de VEÍCULO. Foi medido diariamente o volume ingerido para cada líquido dos ratos pertencentes ao grupo VEÍCULO/ALTERNADA ($n = 6$).

Após os tratamentos, todos os animais retornaram às suas respectivas gaiolas, previamente lavadas para a remoção de vestígios de sódio. A ração foi substituída por alimento hipossódico (fubá) e as soluções foram substituídas por cinco bebedouros contendo água. Os animais permaneceram nestas condições por 24 horas. Após este período, foi iniciado o teste de preferência mineral em todos os ratos (*descrito no item 2.9.2.2*).

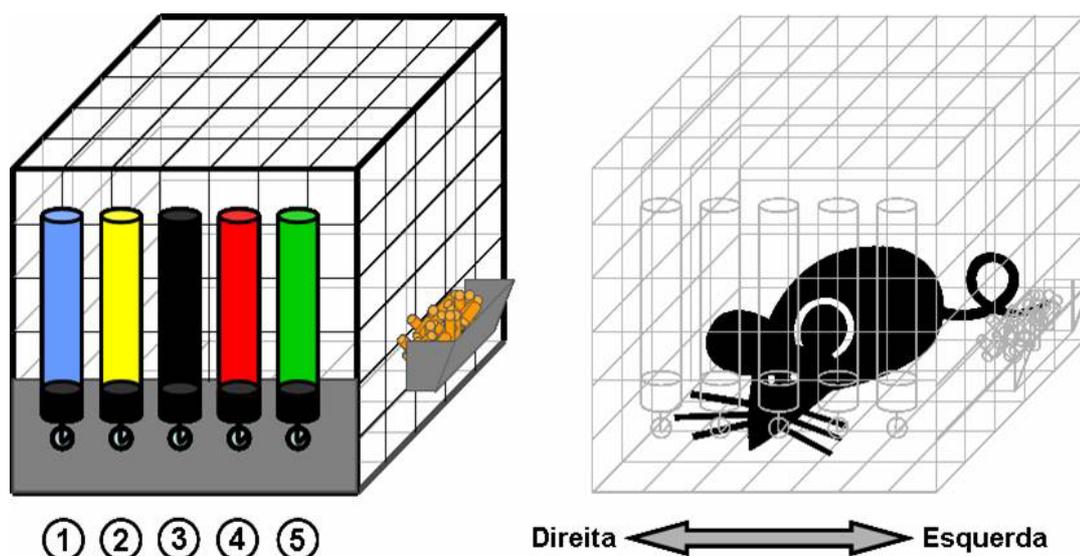


Figura 6. Desenho representativo do posicionamento dos bebedouros na gaiola. As posições 1 a 5 foram ocupadas respectivamente por bebedouros contendo água deionizada, KCl 0,01 M, CaCl_2 0,05 mM, NaHCO_3 0,15 M e NaCl 0,15 M, nesta ordem, da direita para a esquerda do rato em posição de beber, nos testes de cinco bebedouros com posicionamento fixo (grupo FIXA). A posição que cada bebedouro ocupou foi modificada diariamente nos testes de cinco bebedouros com posicionamento aleatório (grupo ALTERNADA), comum a todos os ratos do grupo. O cocho contendo ração ficou localizado durante todos os experimentos na face esquerda da gaiola em relação ao rato.

▪ Resultados:

A ingestão diária no grupo ALTERNADA ($n = 6$) foi significativamente maior para o NaHCO_3 , em relação às outras soluções minerais, apenas no dia 2 e para o CaCl_2 , em relação à água, apenas no dia 5 [$F(24,120) = 2,2$, $P < 0,05$] (ver Figura 7, acima); não foi observada uma preferência nítida e duradoura por qualquer líquido durante o período experimental. A análise para o mesmo grupo de ratos, quando considerada a ingestão em relação à posição independentemente do líquido, mostrou preferência pela posição 4 em relação às posições 1, 2 e 5 no dia 2 e para a posição 2 em relação à posição 5 no dia 5 [$F(24,120) = 2,2$, $P < 0,05$] (ver Figura 7, abaixo); porém, estas diferenças apenas coincidem com as diferenças entre líquidos (ver Figura 7, acima), ou seja, não caracterizam uma preferência específica por qualquer posição durante todo período de leituras.

No grupo FIXA também não foi verificada preferência por qualquer líquido/posição durante os sete dias de leituras [$F(24,96) = 1,1$, $P > 0,05$] (ver Figura 8).

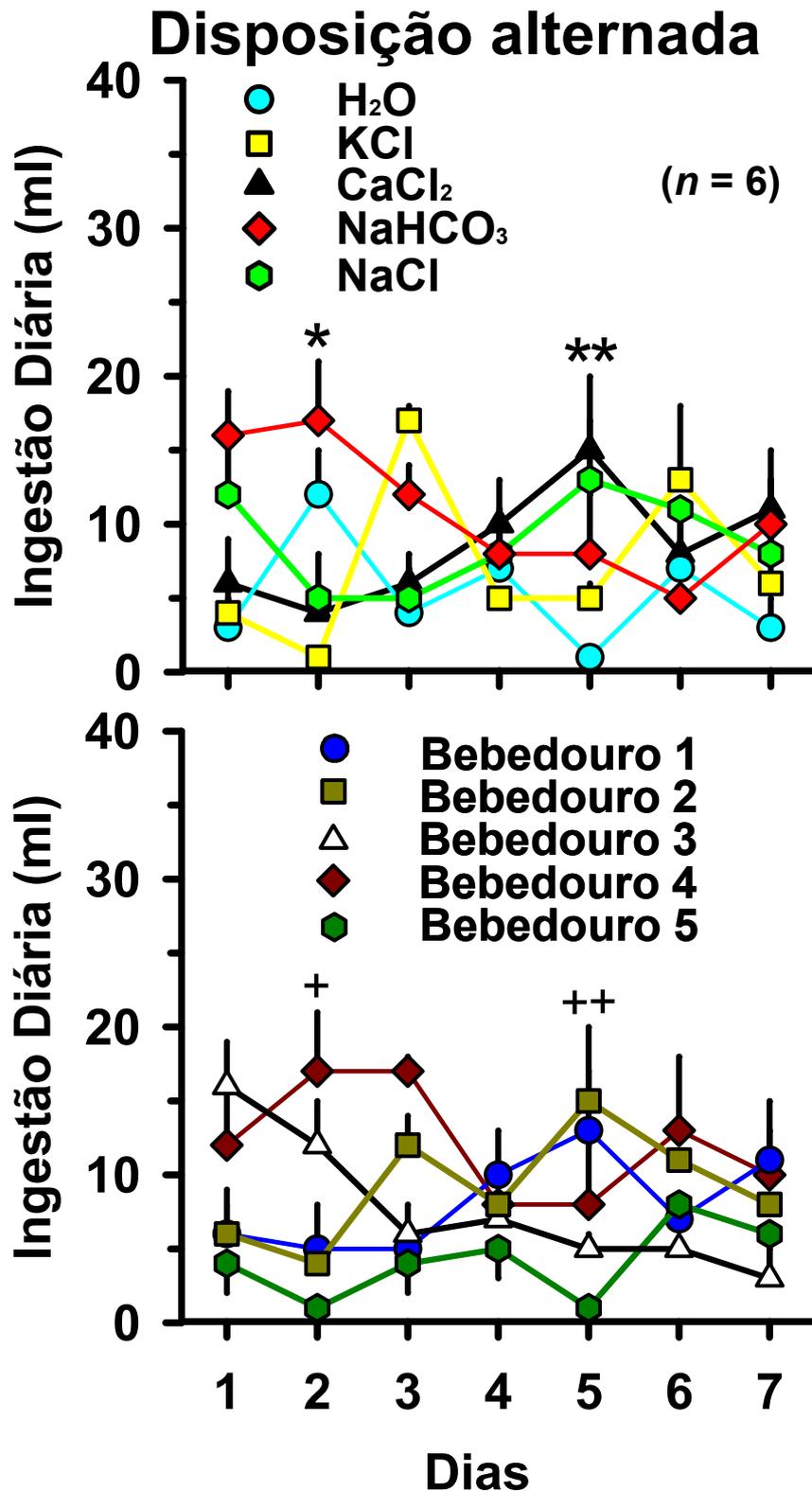


Figura 7. Ingestão diária de água, KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M durante 7 dias em ratos normohidratados (acima) e ingestão diária relativa à posição (1 a 5), independente do líquido presente, no mesmo grupo de ratos normohidratados (abaixo). A posição relativa de cada bebedouro durante os 7 dias de disponibilidade de soluções minerais foi alternada aleatoriamente uma vez ao dia. *Diferente das demais soluções; **diferente da água; +diferente dos bebedouros 1, 2 e 5; ++diferente do bebedouro 5.

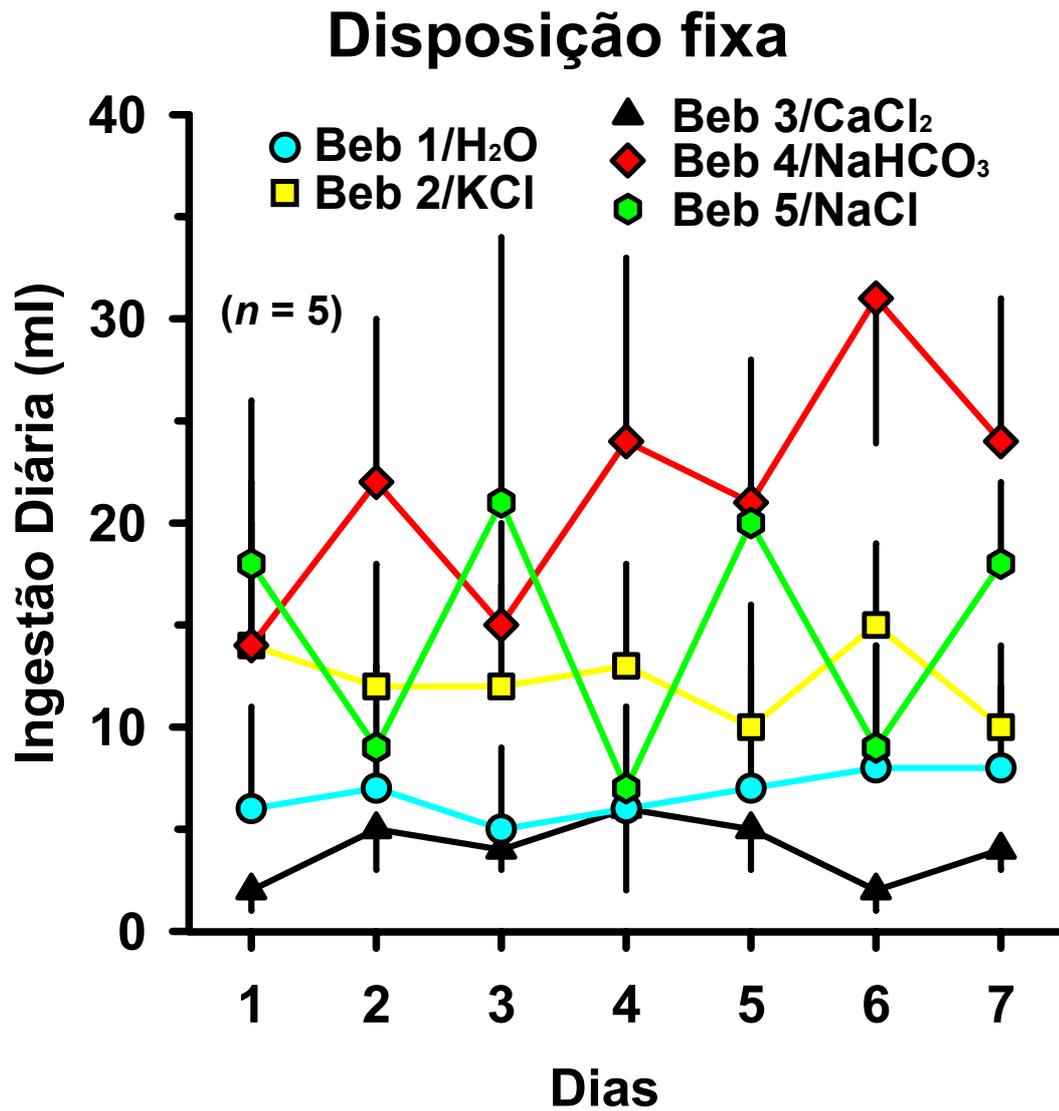


Figura 8. Ingestão diária de água, KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M durante 7 dias em ratos normohidratados. A posição dos bebedouros durante os 7 dias de disponibilidade de soluções minerais foi mantida fixa.

2.9.2.2. Teste de preferência mineral com oferecimento simultâneo de múltiplas soluções palatáveis após depleção de sódio

▪ **Protocolo experimental:**

A desidratação intracelular promovida pela hiperosmolaridade em ratos induz ingestão de KCl quando outras soluções minerais estão disponíveis (cinco bebedouros) e de NaCl isotônico em testes de dupla escolha, quando esta é a única solução mineral disponível, em adição à água (PEREIRA *et al.*, 2002; PEREIRA *et al.*, 2005). Sabendo que os ratos normovolêmicos não preferem nenhuma das soluções, será que a ingestão mineral na fase tardia da depleção de sódio é específica ao sódio em testes com cinco bebedouros, como ocorreu em testes com dois bebedouros (*Experimento 1*)? A disposição das soluções na gaiola influencia o padrão de ingestão mineral induzido pela depleção de sódio?

Para verificar a preferência mineral na fase tardia da depleção de sódio, foram oferecidos aos mesmos animais depletados de sódio e controles (*ver item 2.9.1.1.*) cinco bebedouros de vidro graduados em 0,1 ml com bico de aço inoxidável contendo, em cada um, água deionizada ou uma das soluções palatáveis, imediatamente após a remoção da ração e dos bebedouros de polipropileno. Os bebedouros de vidro foram montados na gaiola seguindo a mesma ordem adotada durante todo o período de ambientação para o grupo FIXA. A ordem dos bebedouros oferecidos ao grupo ALTERNADA foi modificada aleatoriamente uma vez ao dia e comum a todos os ratos, procedimento adotado durante os sete dias de leituras diárias. As ingestões foram medidas aos 15, 30, 60 e 120 minutos. Não houve inversão do esquema de posicionamento entre os dois grupos para evitar que o incremento da ingestão de sódio, que normalmente ocorre após várias depleções de sódio, pudesse ter influência sobre os resultados.

▪ **Resultados:**

A depleção de sódio promoveu grande ingestão de sódio independente da disposição dos bebedouros adotada. O grupo FIXA/FURO apresentou maior ingestão de ambas as soluções sódicas (NaCl: $22,2 \pm 4,5$ ml/120 min.; NaHCO₃: $8,8 \pm 2,2$ ml/120 min.) em relação às soluções não sódicas (CaCl₂: $0,2 \pm 0,0$ ml/120 min.; KCl: $0,3 \pm 0,2$ ml/120 min.) e água ($0,1 \pm 0,0$ ml/120 min.) a partir dos 30 minutos de experimento; a ingestão de NaCl 0,15 M

foi maior do que ingestão de NaHCO_3 0,15 M durante a última hora do experimento [$F(12,48) = 12,5$, $P < 0,05$] (ver Figura 9, acima). A ingestão de NaCl 0,15 M ($16,3 \pm 4,9$ ml/120 min.) e NaHCO_3 0,15 M ($11,8 \pm 4,5$ ml/120 min.) apresentada pelo grupo ALTERNADA/FURO foi maior do que a ingestão dos demais líquidos (CaCl_2 0,05 mM e água: $0,3 \pm 4,1$ ml/120 min.; KCl 0,01 M: $0,1 \pm 0,1$ ml/120 min.) [$F(12,60) = 2,3$, $P < 0,05$] (ver Figura 10, acima).

De um modo geral, os grupos controles apresentaram uma leve indução da ingestão de sódio em relação às soluções não sódicas e água. O grupo FIXA/VEÍCULO apresentou maior ingestão de NaCl 0,15 M ($6,4 \pm 2,7$ ml/120 min.) em relação aos demais líquidos disponíveis (NaHCO_3 0,15 M, KCl 0,01 M e água: $0,2 \pm 0,1$ ml/120 min.; CaCl_2 0,05 mM: $0,1 \pm 0,0$ ml/120 min.) [$F(12,60) = 4,6$, $P < 0,05$] (ver Figura 9, abaixo). A ingestão de NaCl 0,15 M ($3,6 \pm 1,6$ ml/120 min.) no grupo ALTERNADA/VEÍCULO foi maior do que a ingestão de KCl 0,01 M, CaCl_2 0,05 mM e água ($0,1 \pm 0,0$ ml/120 min.), exceto para a ingestão de NaHCO_3 0,15 M ($2,2 \pm 0,8$ ml/120 min.) [$F(4,20) = 4,2$, $P < 0,05$] (ver Figura 10, abaixo).

Não houve diferença entre os grupos ALTERNADA/FURO e FIXA/FURO para nenhum dos líquidos oferecidos [água: $F(1,9) = 2,8$; KCl : $F(1,9) = 1,5$; CaCl_2 : $F(1,9) = 0,5$; NaHCO_3 : $F(1,9) = 0,3$; NaCl : $F(1,9) = 0,3$; $P > 0,05$]. Com exceção ao bicarbonato de sódio, não houve diferença entre os grupos ALTERNADA/VEÍCULO e FIXA/VEÍCULO para os demais líquidos oferecidos [água: $F(1,10) = 0,3$, $P > 0,05$; KCl : $F(1,10) = 0,0$, $P > 0,05$; CaCl_2 : $F(1,10) = 1,2$, $P > 0,05$; NaHCO_3 : $F(1,10) = 5,3$, $P < 0,05$; NaCl : $F(1,10) = 0,4$, $P > 0,05$].

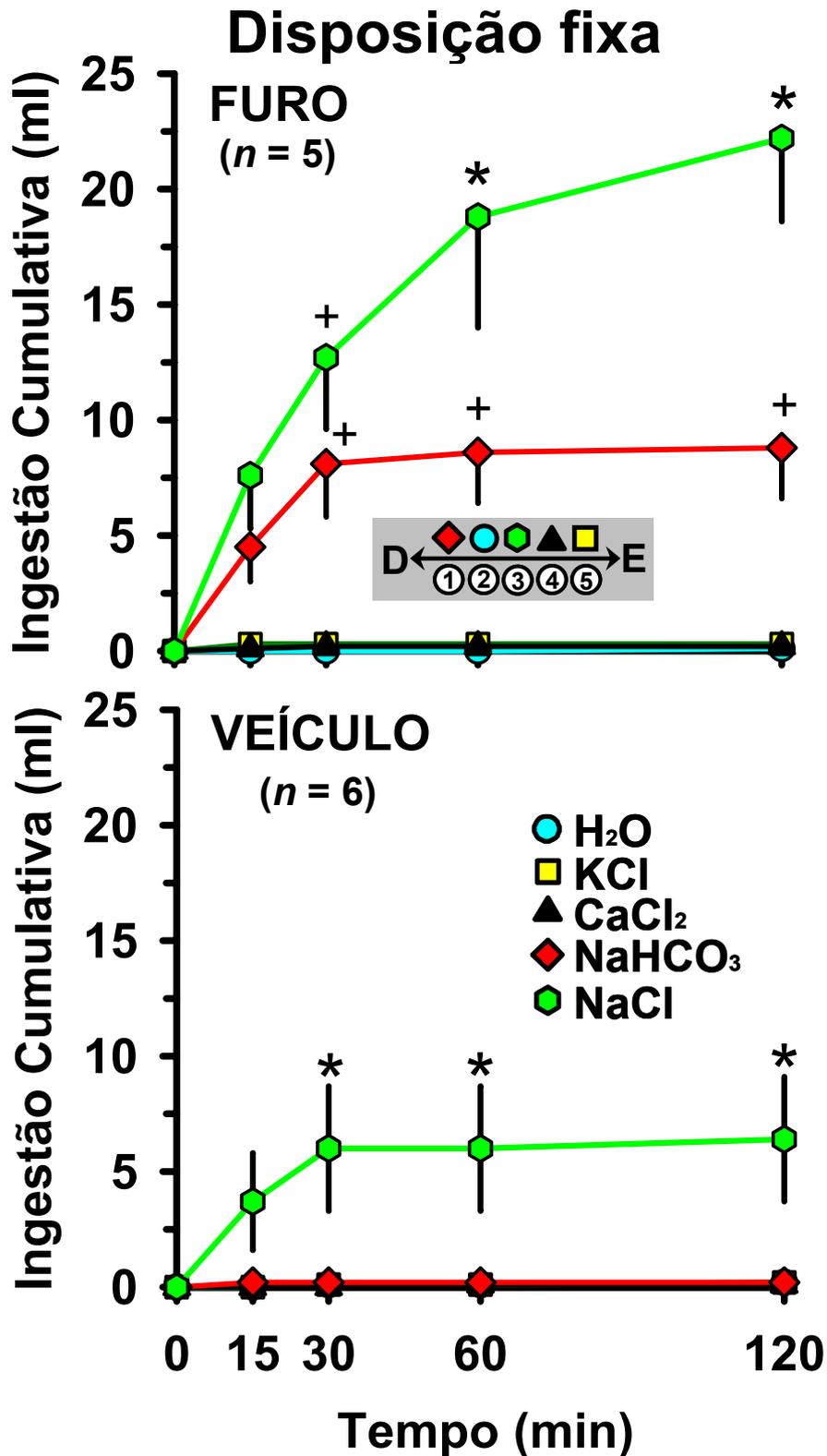


Figura 9. Ingestão de soluções palatáveis vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO (acima) ou VEÍCULO alcalino (abaixo), em teste de cinco bebedouros. Os números de 1 a 5 representam a disposição dos bebedouros em relação ao lado direito (D) e esquerdo (E) do rato em posição de beber (ver figura 6). Os símbolos representam a posição das soluções durante o experimento, que foi similar ao período de ambientação. ⁺Diferente de água e soluções não sódicas; *diferente dos demais líquidos.

Disposição alternada

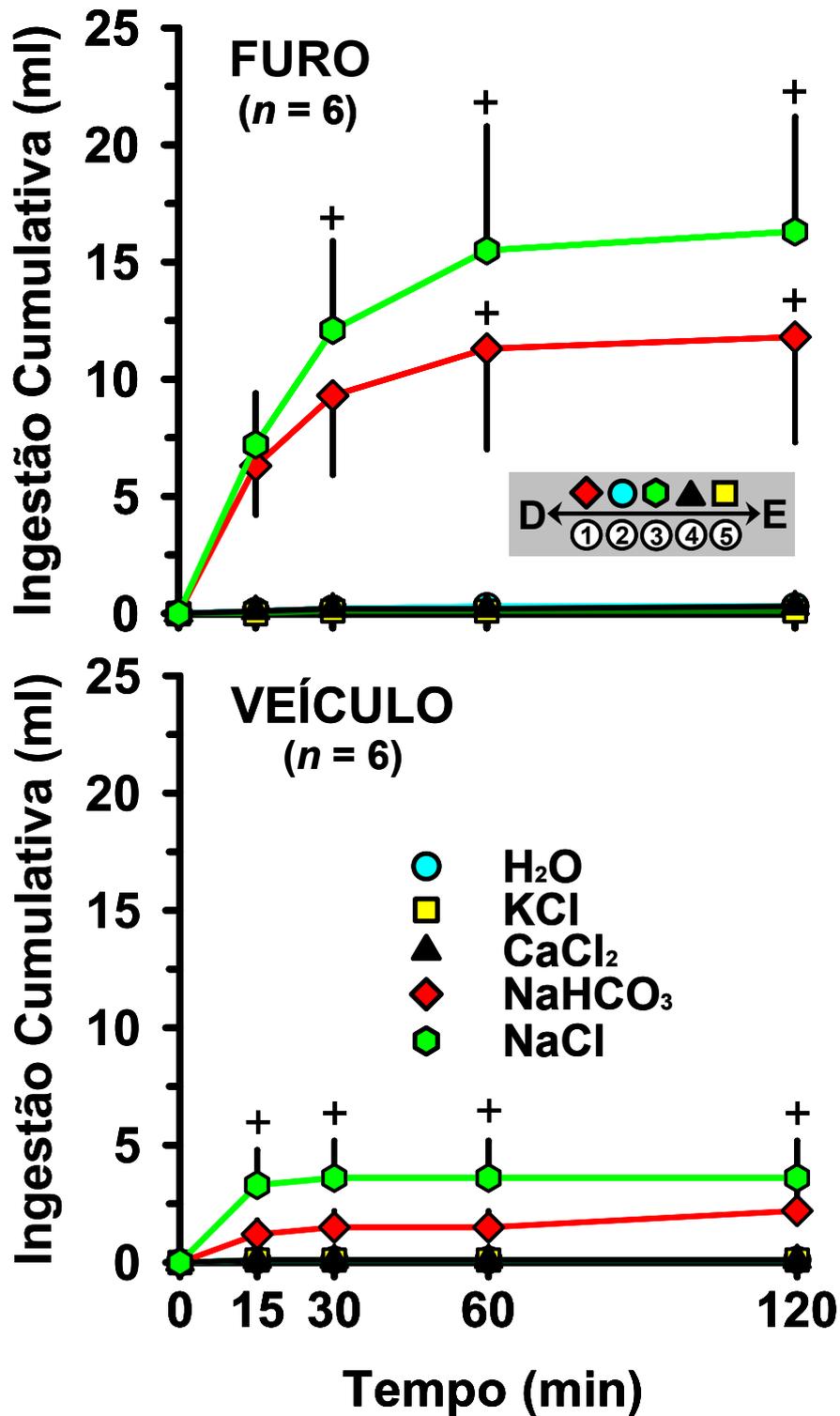


Figura 10. Ingestão de múltiplas soluções palatáveis vinte e quatro horas após injeção (sc) de 10 mg de FURO (acima) ou VEÍCULO alcalino (abaixo), em teste de cinco bebedouros. Os números de 1 a 5 representam a disposição dos bebedouros em relação ao lado direito (D) e esquerdo (E) do rato em posição de beber (ver figura 6). Os símbolos representam a posição das soluções durante o experimento, escolhida aleatoriamente. ⁺Diferente de água e soluções não sódicas.

2.9.3. EXPERIMENTO 3: Efeito da palatabilidade sobre a seletividade da ingestão mineral promovida pelo tratamento com mineralocorticóide

2.9.3.1. Influência da concentração da solução sobre a indução da ingestão de NaCl promovida por mineralocorticóide

▪ Protocolo experimental

Um dos requisitos para a indução do apetite ao sódio no paradigma do sinergismo mineralocorticóide/ANG II é a utilização de ambos os hormônios em doses incapazes de induzirem, sozinhos, ingestão de sódio (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983). No entanto, a concentração de NaCl utilizada nos primeiros testes de sinergismo (0,50 M) é aversiva ao rato (RICHTER, 1956; FLUHARTY; EPSTEIN, 1983). Será que o tratamento com mineralocorticóide, numa dose insuficiente para a indução da ingestão de NaCl hipertônico (concentração aversiva), seria capaz de induzir a ingestão de NaCl isotônico (concentração palatável)?

Para verificar se o tratamento com DOCA promove algum efeito sobre a ingestão diária de NaCl, aversivo ou palatável, um grupo de ratos ($n = 6$) foi ambientado com dois bebedouros, um deles contendo água e o outro NaCl 0,50 M, respectivamente da direita para a esquerda do rato em posição de beber, enquanto outro grupo ($n = 6$) foi ambientado com água e NaCl 0,15 M. Após o período de ambientação, a ingestão diária dos líquidos foi medida durante 9 dias. Cada grupo recebeu uma injeção sc de DOCA (2,5 mg) no 4º, 5º e 6º dia.

▪ Resultados

As injeções de DOCA não promoveram aumento na ingestão diária de água nem de NaCl 0,50 M, sendo a ingestão diária de água maior do que a de NaCl 0,50 M durante todos os dias [$F(1,5) = 149,0, P < 0,05$] (ver *Figura 11*).

A ingestão diária de água foi maior do que a de NaCl 0,15 M nos três primeiros dias de leitura (anterior ao início do tratamento com DOCA) e nos três últimos dias de leitura (após o final do período de tratamento com DOCA). Entretanto, o tratamento com DOCA gradualmente aumentou a ingestão de NaCl 0,15 M ao mesmo tempo em que foi diminuída a ingestão de água [$F(8,40) = 4,7, P < 0,05$] (ver *Figura 12*).

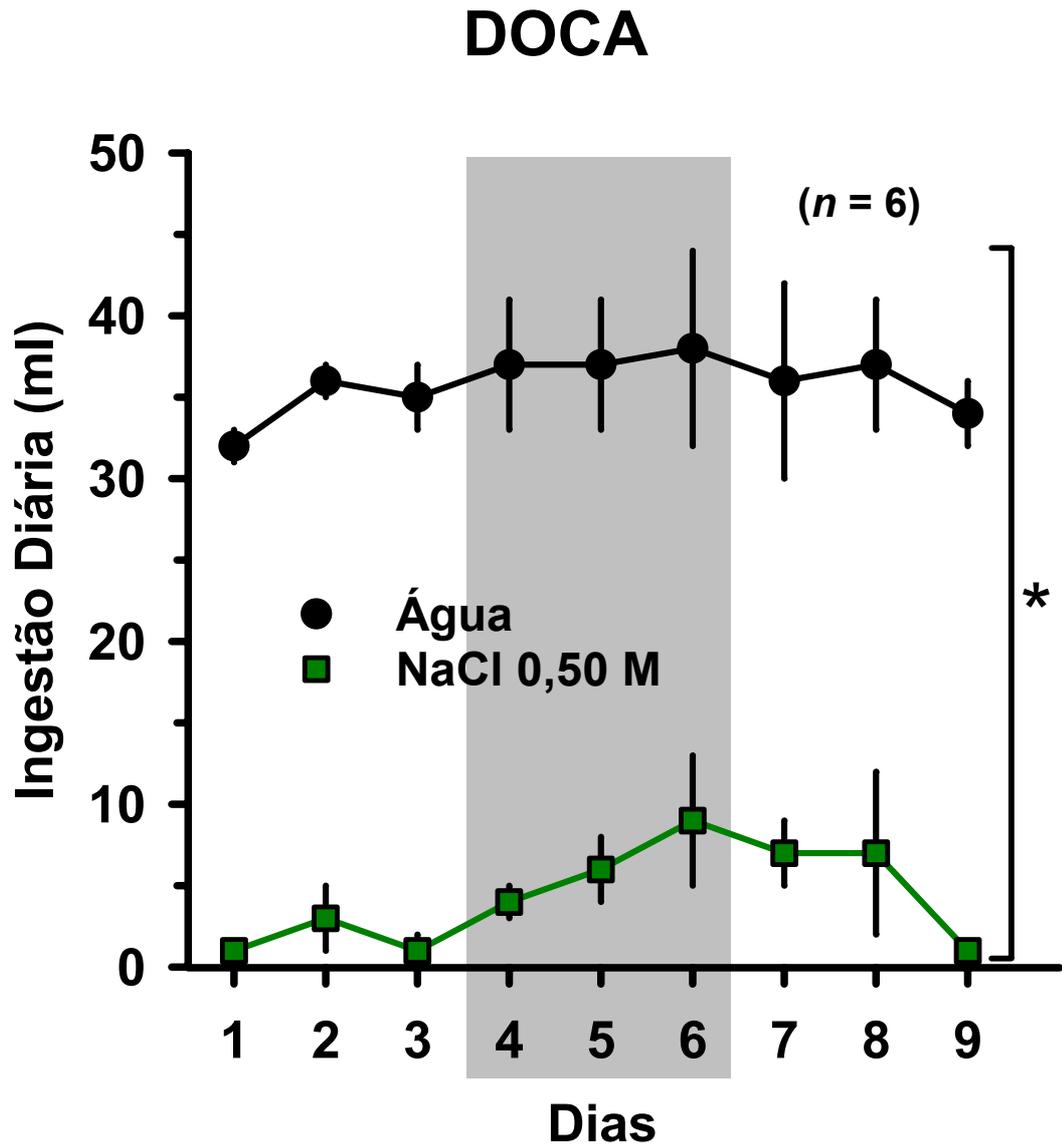


Figura 11. Efeito do tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc durante 3 dias (área hachurada) sobre a ingestão de NaCl hipertônico 0,50 M e água. *Diferente durante todos os dias de leituras.

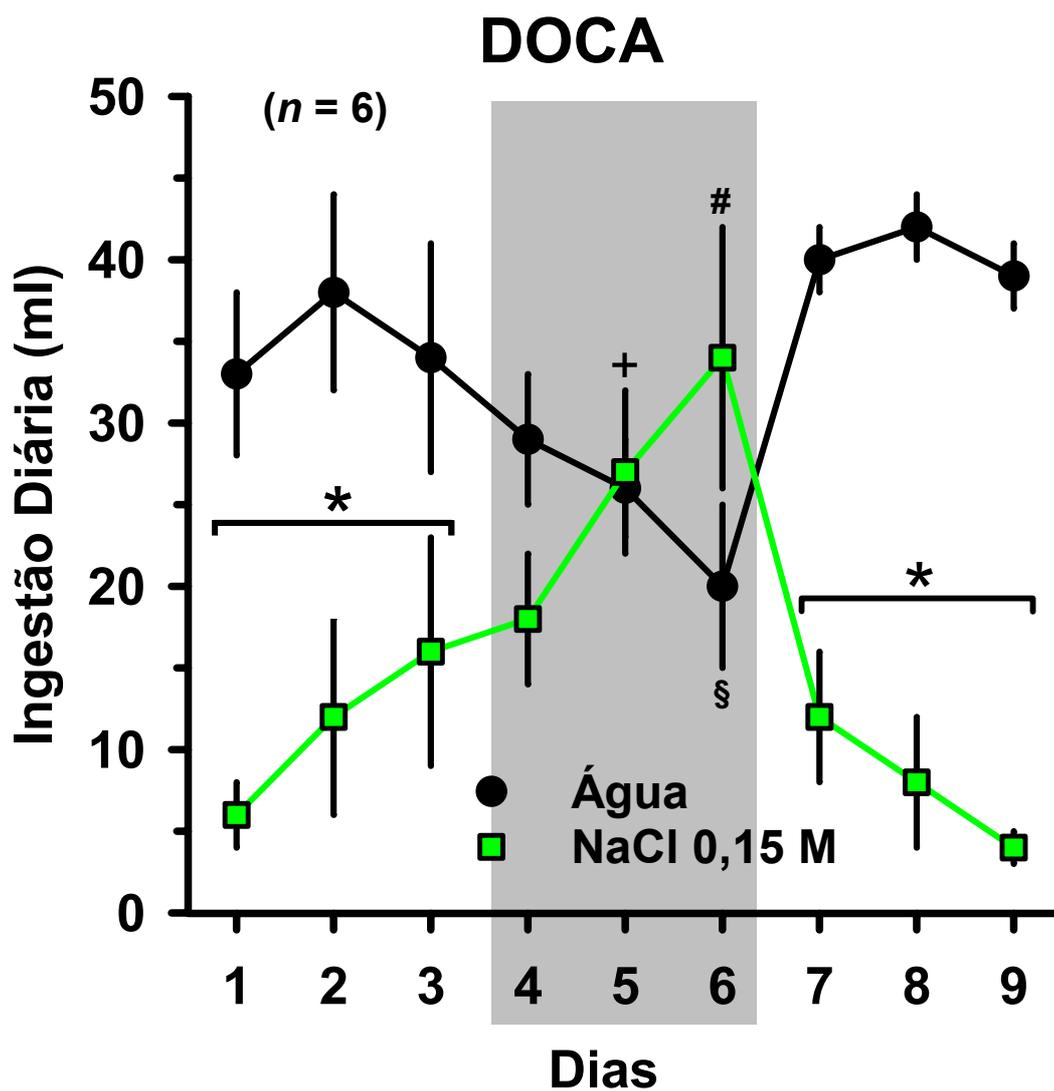


Figura 12. Efeito do tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias (área hachurada) sobre a ingestão de NaCl 0,15 M e água. *Significativamente diferente de água; +Diferente da ingestão de NaCl dos dias 1, 8 e 9; #Diferente da ingestão de NaCl dos dias 1-4 e 7-9; §Diferente da ingestão de água dos dias 7-9.

2.9.3.2. Teste da seletividade ao sódio promovida pelo tratamento com DOCA

▪ Protocolo experimental

Como os presentes resultados sugerem que a palatabilidade da solução pode influenciar a ingestão de NaCl induzida por DOCA (*ver item 2.9.3.1.*), será que esta ingestão mineral é específica ao sódio?

Para testar a especificidade da ingestão mineral promovida pela DOCA, dois grupos de ratos foram ambientados com NaHCO₃ 0,15 M (sal sódico sem Cl⁻) em um grupo ($n = 6$) ou KCl 0,01 M (sal não sódico com Cl⁻) no outro grupo ($n = 8$).

Após o período de ambientação, a ingestão dos líquidos foi medida durante 9 dias. Cada grupo recebeu uma injeção sc de DOCA (2,5 mg) no 4º, 5º e 6º dia.

▪ Resultados

A ingestão de NaHCO₃ palatável foi similar à de água durante todos os dias. Não houve alteração na ingestão diária de água que acompanhou o bicarbonato de sódio. A ingestão de NaHCO₃, após as três injeções de DOCA, foi maior apenas em relação aos dois últimos dias do período de leitura (8º e 9º dias), apesar da tendência ao aumento em relação aos dias de pré-tratamento. Não houve alteração na ingestão diária de água que acompanhou o bicarbonato de sódio [$F(8,40) = 2,6$ $P < 0,05$] (*ver Figura 13*).

Não houve alteração na ingestão diária de KCl palatável nem de água que acompanhou esta solução; a ingestão de KCl 0,01 M foi semelhante à ingestão de água durante todos os dias [$F(8,56) = 2,0$, $P < 0,05$] (*ver Figura 14*).

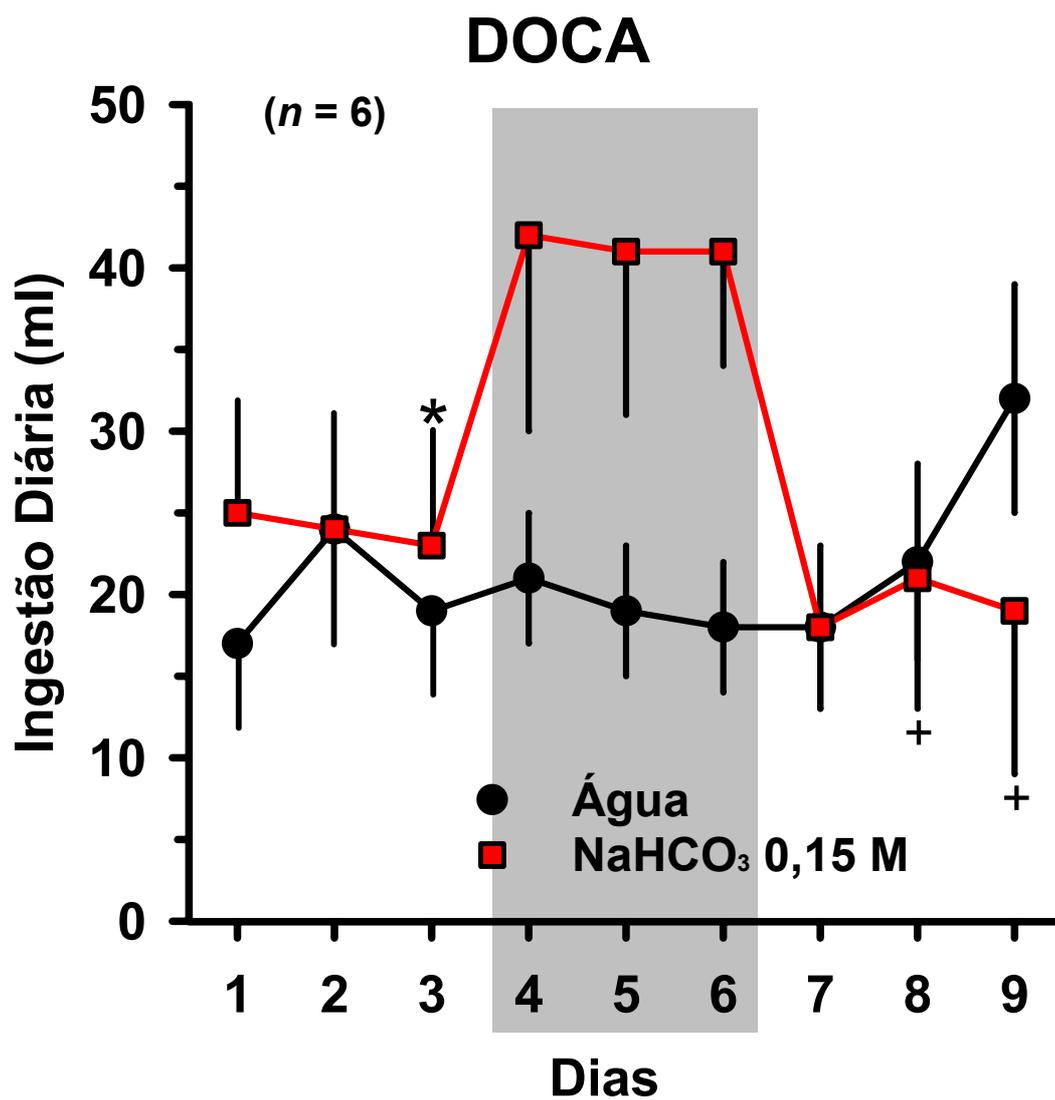


Figura 13. Efeito do tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias (área hachurada) sobre a ingestão de NaHCO₃ 0,15 M e água. *Menor do que a ingestão de NaHCO₃ do dia 4; +menor do que a ingestão de NaHCO₃ dos dias 4-6.

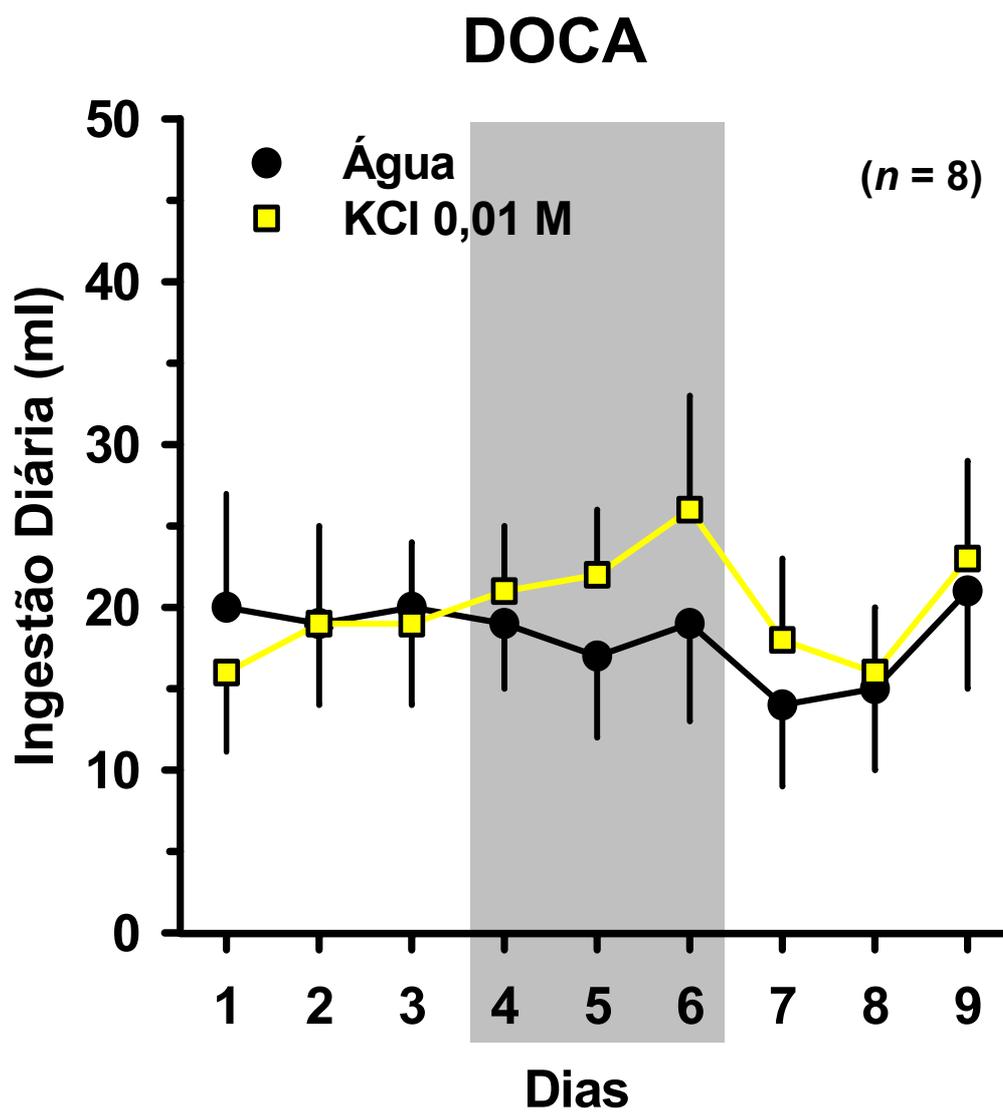


Figura 14. Efeito do tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias (área hachurada) sobre a ingestão de KCl 0,01 M e água.

2.9.4. EXPERIMENTO 4: Ingestão de NaCl hipertônico/aversivo induzida pelo sinergismo (experimento confirmatório)

▪ Protocolo experimental

O tratamento com DOCA utilizado não promoveu aumento da ingestão de NaCl aversivo (*ver Figura 11*). Será que a combinação entre o tratamento com mineralocorticoide e a ANG II (dose baixa) promove ingestão de NaCl hipertônico, conforme o paradigma do sinergismo?

Para verificar se as doses de DOCA (2,5 mg X 3 dias) e ANG II (50 ng) quando combinadas, nas condições experimentais do nosso laboratório, são capazes de induzir apetite ao sódio como proposto na literatura, foi realizado o experimento confirmatório descrito a seguir. Vinte e cinco ratos foram ambientados com dois bebedouros, montados na parte frontal da gaiola, um contendo água deionizada e o outro contendo solução de NaCl 0,50 M, respectivamente da direita para a esquerda do rato em posição de beber. Após o período de ambientação, o grupo inicial de animais foi dividido em dois, uma metade recebeu injeção sc de DOCA e a outra metade recebeu injeção sc de ÓLEO no 4º, 5º e 6º dia. Quatro horas após a terceira injeção de DOCA ou ÓLEO (6º dia), a ração foi removida, os bebedouros de polipropileno foram substituídos por bebedouros de vidro graduados (0,1 ml) contendo os mesmos líquidos do período de ambientação, e injetada centralmente a ANG II ou SAL. Então, os animais foram recolocados em suas gaiolas e a ingestão dos líquidos foi medida aos 15, 30 e 60 minutos de experimento.

▪ Resultados

A ingestão de NaCl 0,50 M observada no grupo DOCA/ANG II ($4,7 \pm 0,9$ ml/60 min., $n = 8$) foi aproximadamente cinco vezes maior do que a ingestão (praticamente nula) apresentada pelo grupo ÓLEO/ANG II ($0,8 \pm 0,4$ ml/60 min., $n = 7$) e pelos demais grupos controles (DOCA/SAL: $0,2 \pm 0,1$ ml/60 min., $n = 5$; ÓLEO/SAL: $0,2 \pm 0,1$ ml/60 min., $n = 5$) [$F(6,42) = 18,8$, $P < 0,05$] (*ver Figura 15, acima*).

Não houve diferença na ingestão de água entre os grupos tratados com ANG II (DOCA/ANG II: $18,4 \pm 1,1$ ml/60 min.; ÓLEO/ANG II: $15,1 \pm 3,1$ ml/60 min.) nem entre os grupos tratados com SAL (DOCA/SAL: $0,1 \pm 0,3$ ml/60 min.; ÓLEO/SAL: $0,7 \pm 0,2$ ml/60

min.), porém ambos os grupos tratados com ANG II apresentaram ingestão de água maior do que os grupos tratados com SAL durante todo o experimento [$F(6,42) = 17,8, P < 0,05$] (ver *Figura 15, abaixo*).

Estes resultados mostram que tanto a DOCA como a ANG II, sozinhas, nas doses utilizadas, não induzem a ingestão de NaCl hipertônico, que ocorre somente quando os dois hormônios atuam conjuntamente. Então, o protocolo utilizado está de acordo com o critério proposto para a indução do apetite ao sódio pela ação sinérgica destes dois hormônios (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983).

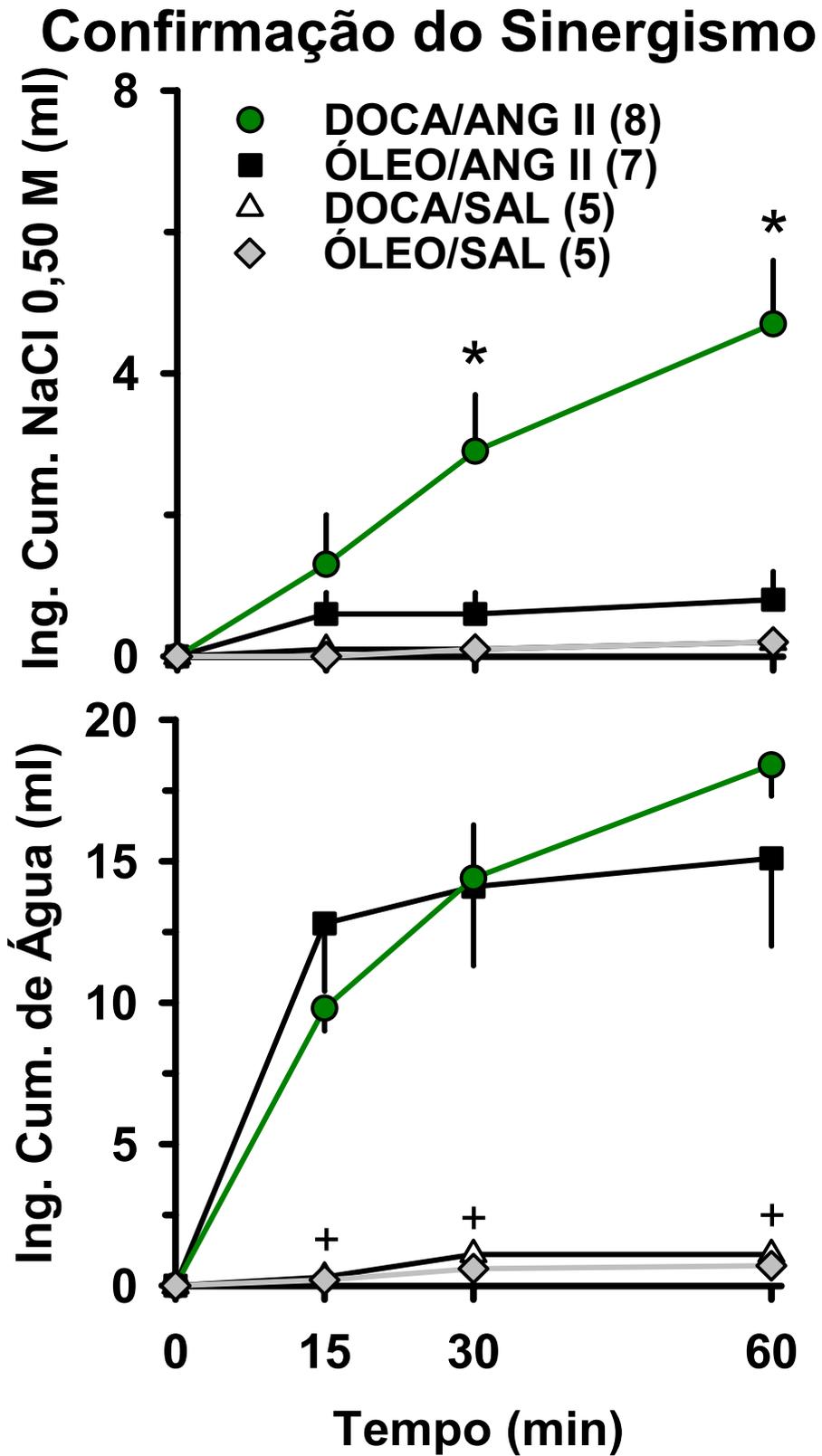


Figura 15. Efeito da injeção central de ANG II 50 ng ou SAL (1 μ l), após tratamento com DOCA 2,5 mg ou ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de NaCl hipertônico 0,50 M (acima) ou água (abaixo). *Diferente dos demais grupos; +menor do que os grupos tratados com ANG II. O número de animais está entre parênteses.

2.9.5. EXPERIMENTO 5: seletividade da ingestão mineral no protocolo do sinergismo DOCA/ANG II quando uma solução palatável e água estão disponíveis (teste de dois bebedouros)

▪ Protocolo experimental

O efeito da DOCA sobre a ingestão mineral é específico ao sódio e, pelo menos para o NaCl, dependente da concentração da solução testada (*presentes resultados*). Sendo a DOCA um dos hormônios utilizados no paradigma experimental do sinergismo, é possível que o efeito da ANG II sobre a ingestão mineral também seja dependente da concentração da solução testada. Além disso, a ação sinérgica entre mineralocorticóide e ANG II é considerada responsável pelo surgimento tardio do apetite ao sódio em relação à sede nos animais depletados de sódio (SAKAI *et al.*, 1986; EPSTEIN; SAKAI, 1987). Assim, surgiram duas perguntas: 1) Será que a dose de ANG II utilizada (50 ng), que não induziu ingestão de NaCl hipertônico (*ver Figura 15*), é capaz de induzir ingestão específica de NaCl palatável? 2) Será que a ingestão mineral induzida pela ação conjunta de DOCA e ANG II é seletiva ao sódio, semelhante à depleção de sódio?

Um grupo composto por 76 ratos foi ambientado com dois bebedouros, um contendo água e o outro uma solução mineral (NaCl 0,15 M, NaHCO₃ 0,15 M ou KCl 0,01 M), originando três grupos experimentais baseados na solução disponível. Os bebedouros foram montados na parte frontal das gaiolas individuais, respectivamente da direita para a esquerda do rato em posição de beber. Cada grupo experimental foi novamente subdividido em quatro outros grupos, de acordo com o tratamento ao qual seriam submetidos posteriormente (DOCA/ANG II, ÓLEO/ANG II, DOCA/SAL ou ÓLEO/SAL). O número de animais de cada grupo está descrito no item Resultados. Após o período de ambientação, os ratos receberam injeção sc de DOCA (2,5 mg) ou ÓLEO no 4º, 5º e 6º dia. Quatro horas após a terceira injeção de DOCA ou ÓLEO (6º dia), a ração foi removida, os bebedouros de polipropileno foram substituídos por bebedouros de vidro e os animais foram tratados com ANG II (50 ng) ou SAL icv. Então, os animais foram recolocados em suas gaiolas e a ingestão dos líquidos foi medida aos 15, 30, 60 e 120 minutos de experimento.

▪ Resultados

a) NaCl 0,15 M e água:

Houve diferença na ingestão de NaCl 0,15 M em função do tempo entre os tratamentos DOCA/ANG II ($n = 7$), ÓLEO/ANG II ($n = 7$), DOCA/SAL ($n = 6$) e ÓLEO/SAL ($n = 6$) [$F(3,88) = 31,5$, $P < 0,05$]. A ANG II sozinha induziu ingestão de NaCl 0,15 M (ÓLEO/ANG II = $9,2 \pm 1,8$ ml/120 min. vs. DOCA/SAL = $1,7 \pm 0,2$ ml/120 min. e ÓLEO/SAL = $1,1 \pm 0,6$ ml/120 min.), que foi potenciada em 2,5 vezes pelo tratamento DOCA/ANG II ($24,5 \pm 6,7$ ml/120 min.) dos 30 min. aos 120 min. (ver Figura 16, acima). A diferença entre os grupos DOCA/SAL e ÓLEO/SAL não foi significativa.

Também houve diferença na ingestão de água entre os tratamentos [$F(3,88) = 89,6$, $P < 0,05$]. O grupo tratado com DOCA/ANG II ($5,8 \pm 1,4$ ml/120 min.) ingeriu menos água do que o grupo ÓLEO/ANG II ($3,2 \pm 1,8$ ml/120 min.). A ingestão de água foi semelhante entre os grupos tratados com SAL (DOCA/SAL = $0,6 \pm 0,3$ ml/120 min. vs. ÓLEO/SAL = $0,6 \pm 0,4$ ml/120 min.). A ANG II induziu ingestão de água em relação aos grupos tratados com SAL (ver Figura 16, abaixo).

b) NaHCO₃ 0,15 M e água:

Houve diferença na ingestão de NaHCO₃ 0,15 M, em função do tempo, entre os tratamentos DOCA/ANG II ($n = 7$), ÓLEO/ANG II ($n = 6$), DOCA/SAL ($n = 5$) e ÓLEO/SAL ($n = 5$) [$F(3,76) = 62,9$, $P < 0,05$]. A ANG II sozinha induziu ingestão de NaHCO₃ 0,15 M (ÓLEO/ANG II = $14,6 \pm 2,1$ ml/120 min. vs. DOCA/SAL = $1,0 \pm 0,7$ ml/120 min. e ÓLEO/SAL = $2,4 \pm 1,1$ ml/120 min.), que foi potenciada aproximadamente duas vezes pelo tratamento DOCA/ANG II ($17,0 \pm 1,8$ ml/120 min.) dos 15 aos 60 min., não havendo diferença entre os grupos tratados com ANG II aos 120 min. A diferença entre os grupos DOCA/SAL e ÓLEO/SAL não foi significativa (ver Figura 17, acima).

Os grupos tratados com ANG II apresentaram aumento da ingestão de água em relação aos grupos tratados com SAL (DOCA/ANG II = $9,9 \pm 1,5$ ml/120 min. e ÓLEO/ANG II = $12,5 \pm 2,4$ ml/120 min. vs. DOCA/SAL = $0,4 \pm 0,0$ ml/120 min. e ÓLEO/SAL = $1,2 \pm 0,4$ ml/120 min.) [$F(3,76) = 57,7$, $P < 0,05$]. Os grupos tratados com ANG II (ver Figura 17, abaixo), assim como entre os grupos tratados com SAL, apresentaram ingestão de água semelhante entre si.

c) KCl 0,01 M e água:

Houve diferença na ingestão de KCl 0,01 M entre os grupos tratados com ANG II [DOCA/ANG II ($n = 8$), ÓLEO/ANG II ($n = 7$)] em relação aos grupos que receberam injeção de SAL [DOCA/SAL ($n = 6$) e ÓLEO/SAL ($n = 6$)] [$F(3,92) = 74,0$, $P < 0,05$]. Os tratamentos ÓLEO/ANG II e DOCA/ANG II induziram ingestão de quantidades semelhantes de KCl 0,01 M ($11,9 \pm 1,2$ e $9,8 \pm 1,9$ ml/120 min., respectivamente) ao longo de todo o teste, que foram maiores do que as ingestões de KCl 0,01 M induzidas por ÓLEO/SAL ($0,5 \pm 0,3$ ml/120 min.) e DOCA/SAL ($0,8 \pm 0,4$ ml/120 min.), semelhantes entre si (*ver Figura 18, acima*).

A ingestão de água no grupo DOCA/ANG II ($5,5 \pm 1,0$ ml/120 min.) foi maior do que nos demais grupos, não havendo diferença entre estes (ÓLEO/ANG II = $3,1 \pm 0,9$ ml/120 min.; DOCA/SAL = $0,6 \pm 0,2$ ml/120 min.; ÓLEO/SAL = $0,5 \pm 0,3$ ml/120 min.) [$F(3,92) = 34,3$, $P < 0,05$] (*ver Figura 18, abaixo*).

d) Comparação entre todas as soluções minerais e água:

O tratamento DOCA/ANG II aumentou a ingestão das soluções de NaCl [$F(3,18) = 8,7$, $P < 0,05$] e NaHCO₃ 0,15 M [$F(3,18) = 4,3$, $P < 0,05$], mas não alterou a ingestão de KCl 0,01 M [$F(3,21) = 1,4$, $P < 0,05$], em relação à ingestão de água. A ingestão de NaCl 0,15 M foi maior do que a ingestão de KCl 0,01 M; não houve diferença entre a ingestão de NaCl 0,15 M e NaHCO₃ 0,15 M, nem entre NaHCO₃ 0,15 M e KCl 0,01 M [$F(6,57) = 5,5$, $P < 0,05$]. A ingestão de água foi significativamente maior no grupo que tinha NaHCO₃ como solução disponível, em relação aos outros grupos [$F(6,57) = 3,4$, $P < 0,05$] (*ver Figura 19 A, esquerda*).

O tratamento ÓLEO/ANG II aumentou a ingestão de KCl 0,01 M [$F(3,18) = 6,5$, $P < 0,05$], sem alterar a ingestão de soluções sódicas [NaCl 0,15 M: $F(3,18) = 1,3$, $P > 0,05$; NaHCO₃ 0,15 M: $F(3,15) = 3,3$, $P > 0,05$], em relação à ingestão de água. Não houve diferença entre a ingestão das soluções palatáveis [$F(6,51) = 6,0$, $P > 0,05$]. A ingestão de água foi significativamente menor no grupo que tinha KCl como solução disponível, em relação aos outros grupos [$F(6,51) = 10,8$, $P < 0,05$] (*ver Figura 19 A, direita*).

A ingestão total (água + solução palatável) foi maior nos grupos que tiveram soluções sódicas disponíveis (*ver Figura 19 B*); tanto na presença como na ausência de DOCA a ingestão de KCl + água foi significativamente menor do que NaCl + água e NaHCO₃ + água,

além de não ter havido diferença entre NaCl + água e NaHCO₃ + água aos 120 minutos de experimento [DOCA/ANG: $F(6,57) = 5,7$; ÓLEO/ANG II: $F(6,51) = 11,5$, $P < 0,05$].

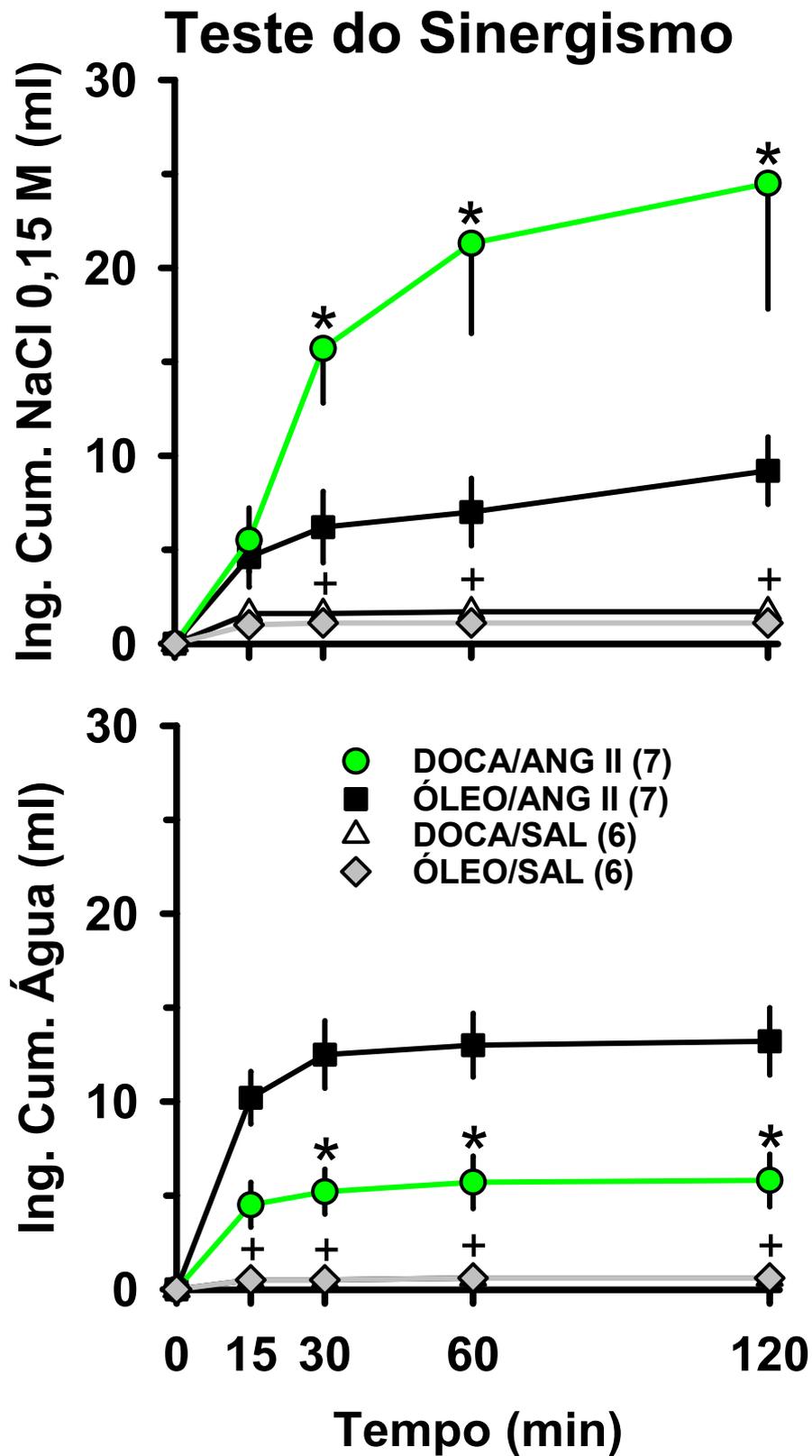


Figura 16. Efeito da injeção central de ANG II 50 ng (1 μ l), após tratamento com DOCA 2,5 mg ou ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de NaCl 0,15 M (acima) ou água (abaixo). *Diferente do grupo ÓLEO/ANG II; ⁺Menor do que os grupos tratados com ANG II. O número de animais está entre parênteses.

Teste do Sinergismo

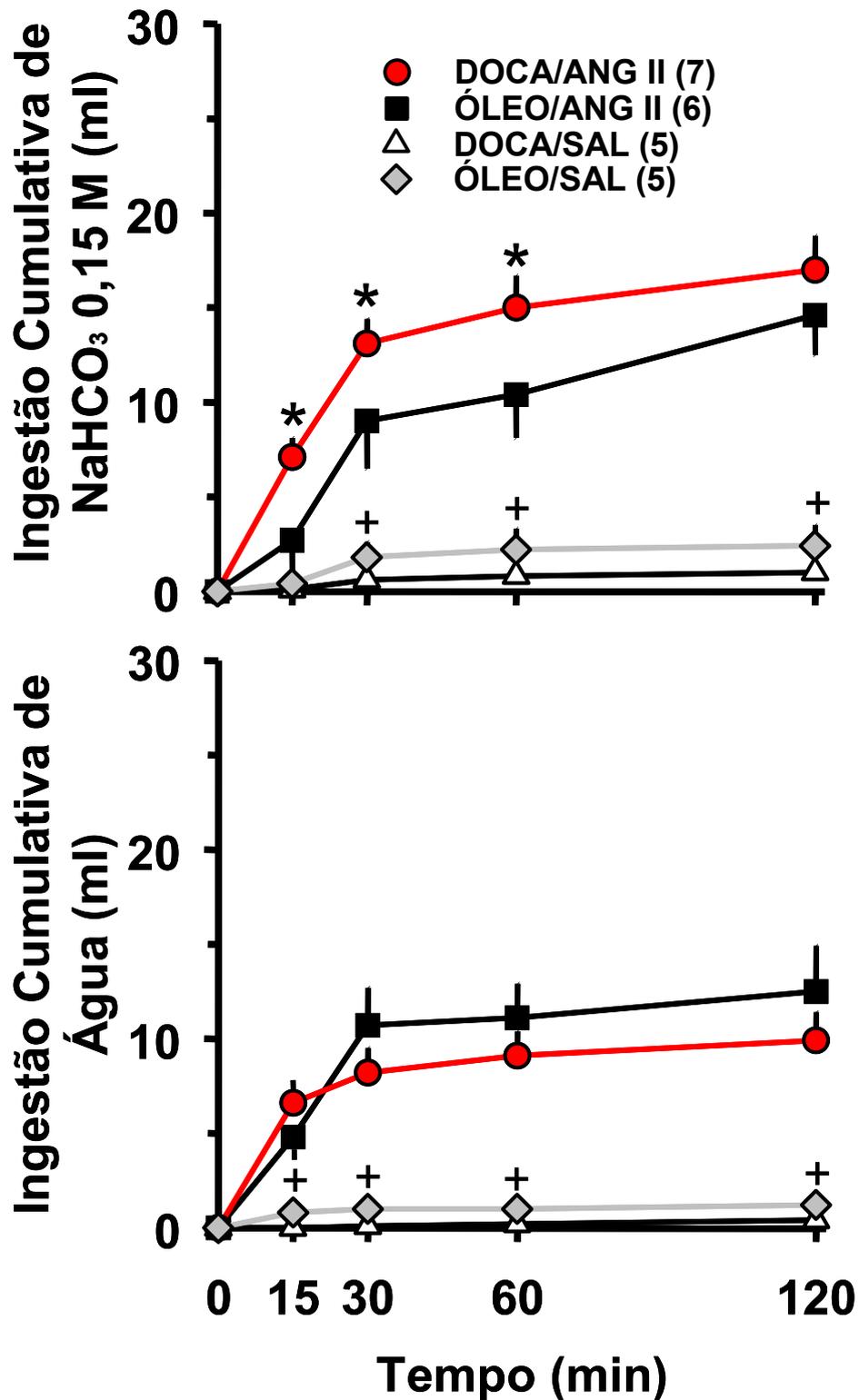


Figura 17. Efeito da injeção central de ANG II 50 ng (1 μ l), após tratamento com DOCA 2,5 mg ou ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de NaHCO₃ 0,15 M (acima) ou água (abaixo). *Diferente dos demais grupos; +menor do que os grupos tratados com ANG II. O número de animais está entre parênteses.

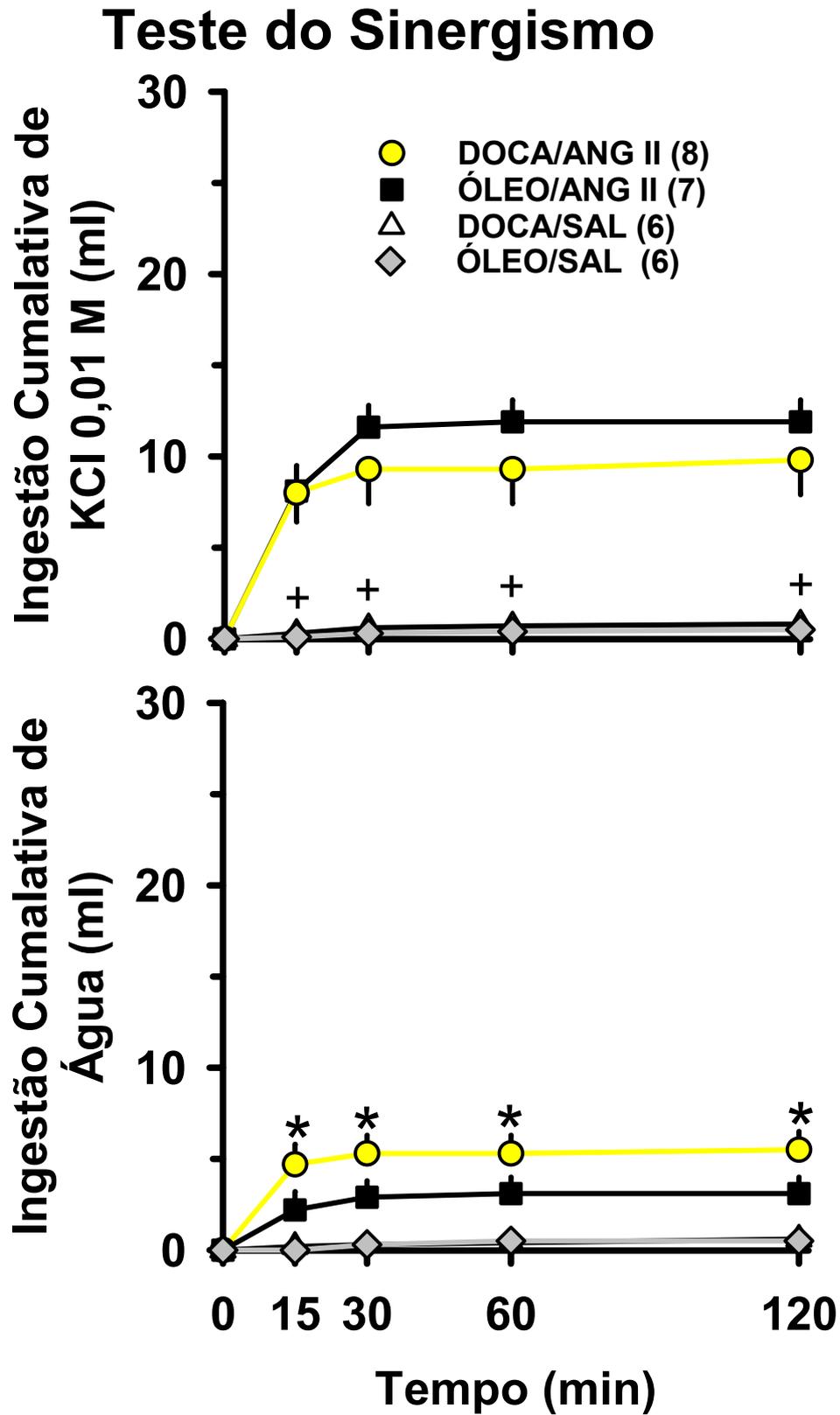
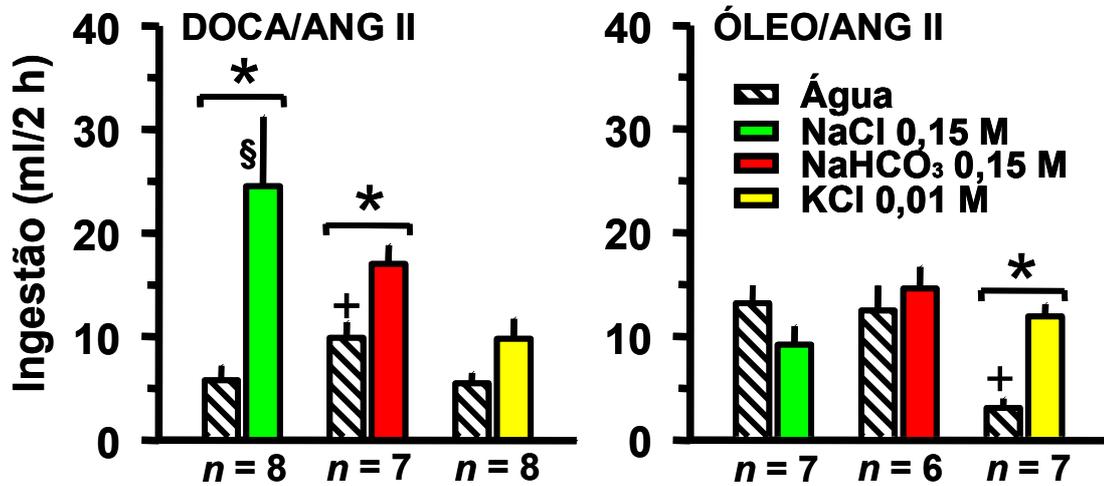


Figura 18. Efeito da injeção central de ANG II 50 ng (1 μ l), após tratamento com DOCA 2,5 mg ou ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de KCl 0,01 M (acima) ou água (abaixo). ⁺Diferente dos grupos tratados dos grupos tratados com ANG II; ^{*}diferente dos demais grupos. O número de animais está entre parênteses.

A Preferência: soluções palatáveis vs. água



B Ingestão total

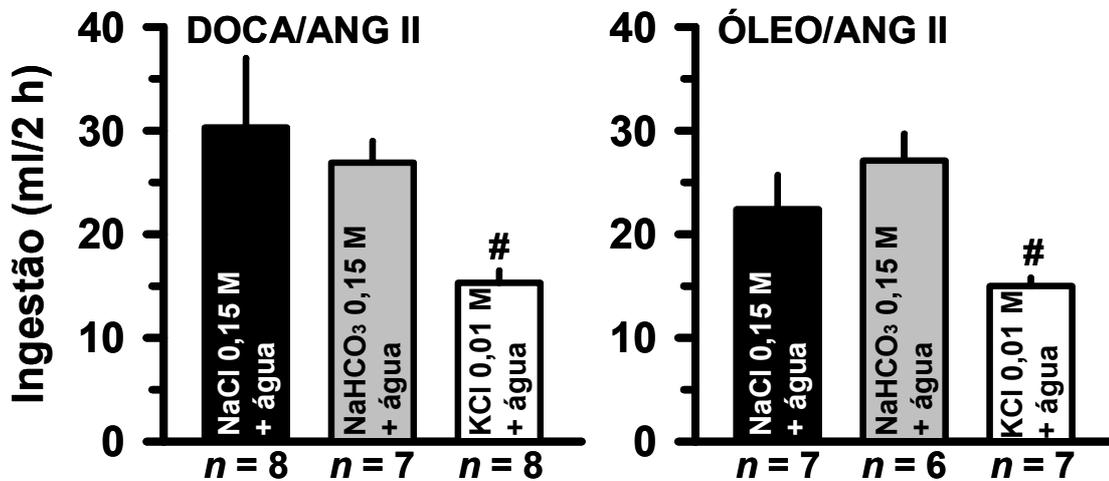


Figura 19. Soluções minerais palatáveis vs. água (A) ou ingestão total (solução + água, B) em testes de dupla escolha em animais tratados com DOCA 2,5 mg (esquerda) ou ÓLEO (direita), durante 3 dias, e ANG II 50 ng. *Diferente da ingestão de água no mesmo grupo; †diferente da ingestão de água dos demais grupos; §diferente da ingestão de KCl; #diferente da ingestão total dos demais grupos.

2.9.6. EXPERIMENTO 6: Seletividade da ingestão mineral no protocolo do sinergismo DOCA/ANG II quando múltiplas soluções palatáveis e água estão disponíveis (teste de cinco bebedouros)

▪ Protocolo experimental

Os ratos nitidamente preferiram soluções sódicas após a depleção de sódio, em testes com dois ou cinco bebedouros, assim como no teste paradigmático do sinergismo (*presentes resultados*). Porém estes dois métodos de indução do apetite ao sódio diferem quanto ao padrão de ingestão de KCl, absolutamente rejeitado pelo rato depletado de sódio, ainda quando foi o único sal disponível, mas ingerido pelos animais tratados com DOCA/ANG II. Sendo assim, a preferência ao sódio no teste paradigmático do sinergismo seria observada se os animais tivessem possibilidade de escolha (teste de cinco bebedouros)?

Para determinar a preferência mineral no protocolo do sinergismo (testes de cinco bebedouros), trinta e seis ratos foram inicialmente ambientados com água e soluções minerais de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M, nesta mesma disposição, da direita para a esquerda do rato em posição de beber (*ver Figura 6*). Após o período de ambientação, os animais foram separados em quatro grupos experimentais de acordo com o tratamento que iriam receber: grupo DOCA/ANG II ($n = 12$), grupo ÓLEO/ANG II ($n = 11$), grupo DOCA/SAL ($n = 7$) grupo ÓLEO/SAL ($n = 6$). DOCA (2,5 mg) ou ÓLEO foram injetados sc uma vez ao dia durante três dias consecutivos. Quatro horas após a última injeção de DOCA ou ÓLEO, os bebedouros de polipropileno e a ração foram removidos. Então foram oferecidos cinco bebedouros de vidro contendo os mesmos líquidos disponíveis no período de ambientação. Cada animal então recebeu uma injeção icv de ANG II (50 ng) ou SAL. A ingestão dos líquidos foi medida aos 15, 30 e 60 minutos.

▪ Resultados

a) Preferência mineral em cada grupo experimental

A ingestão de NaHCO₃ 0,15 M no grupo DOCA/ANG II, aos 60 minutos de experimento, foi maior do que os demais líquidos (água: $2,4 \pm 0,9$ ml/60 min., KCl: $1,9 \pm 1,0$ ml/60 min., CaCl₂: $2,4 \pm 0,6$ ml/60 min., NaHCO₃: $9,1 \pm 2,0$ ml/60 min., NaCl: $4,7 \pm 2,0$

ml/60 min.) [$F(8,80) = 6,5, P < 0,05$] (ver Figura 20, acima). Considerando-se a ingestão total de soluções não sódicas (somatória da ingestão das soluções de KCl e CaCl₂), de soluções sódicas (somatória da ingestão das soluções de NaHCO₃ e NaCl) e o total de água ingerida, a ingestão de soluções sódicas foi maior do que a dos demais líquidos disponíveis (água: $2,4 \pm 0,9$ ml/60 min.; soluções não sódicas: $4,3 \pm 1,4$ ml/60 min.; soluções sódicas: $13,8 \pm 2,5$ ml/60 min.) [$F(4,40) = 8,5, P < 0,05$] (ver Figura 20, abaixo).

O grupo tratado com ÓLEO/ANG II também apresentou maior ingestão de NaHCO₃ em relação aos demais líquidos a partir dos 30 minutos de experimento (água: $3,6 \pm 0,9$ ml/60 min., KCl: $2,0 \pm 0,6$ ml/60 min., CaCl₂: $3,4 \pm 1,1$ ml/1 h, NaHCO₃: $8,0 \pm 2,2$ ml/60 min., NaCl: $2,1 \pm 1,0$ ml/60 min.) [$F(8,88) = 4,5, P < 0,05$] (ver Figura 21, acima). A somatória da ingestão de soluções sódicas também foi maior do que a somatória da ingestão de soluções não sódicas e água, a partir dos 30 minutos de experimento (água: $3,6 \pm 0,9$ ml/60 min.; soluções não sódicas: $5,4 \pm 1,4$ ml/60 min.; soluções sódicas: $10,0 \pm 2,1$ ml/60 min.) [$F(4,44) = 7,5, P < 0,05$] (ver Figura 21, abaixo).

O grupo tratado com DOCA/SAL também apresentou pequena ingestão de NaHCO₃ 0,15 M (NaHCO₃: $2,2 \pm 1,1$ ml/60 min.), porém significativamente maior em relação aos demais líquidos a partir dos 30 minutos de experimento (água: $0,0 \pm 0,0$ ml/60 min., KCl: $0,1 \pm 0,0$ ml/60 min., CaCl₂: $0,0 \pm 0,0$ ml/1 h, NaCl: $0,1 \pm 0,1$ ml/60 min.) [$F(8,88) = 4,5, P < 0,05$] (ver Figura 22, acima). Não houve diferença entre a somatória da ingestão das soluções sódicas, não sódicas e água (água $0,0 \pm 0,0$ ml/60 min.; soluções não sódicas: $0,1 \pm 0,0$ ml/60 min.; soluções sódicas: $2,3 \pm 1,2$ ml/60 min.) [$F(4,24) = 2,7, P > 0,05$] (ver Figura 22, abaixo).

O grupo controle ÓLEO/SAL não apresentou preferência por qualquer um dos líquidos disponíveis (água: $0,1 \pm 0,1$ ml/60 min., KCl: $0,3 \pm 0,2$ ml/60 min., CaCl₂: $0,3 \pm 0,2$ ml/60 min., NaHCO₃: $0,5 \pm 0,5$ ml/60 min., NaCl: $0,1 \pm 0,1$ ml/60 min.) [$F(8,40) = 0,5, P > 0,05$] (ver Figura 23, acima). Também não houve diferença entre a somatória da ingestão das soluções sódicas, não sódicas e água (água $0,1 \pm 0,1$ ml/60 min.; soluções não sódicas: $0,6 \pm 0,4$ ml/60 min.; soluções sódicas: $0,7 \pm 0,6$ ml/60 min.) [$F(4,20) = 2,2, P > 0,05$] (ver Figura 23, abaixo).

b) Análise da ingestão de cada líquido entre os tratamentos

- Água: o grupo ÓLEO/ANG II ingeriu mais água em relação aos grupos tratados com SAL. Não houve diferença entre os demais grupos [$F(3,32) = 3,9, P < 0,05$].

- KCl 0,01 M: não houve diferença entre os quatro grupos experimentais para a ingestão de KCl [$F(3,32) = 1,5, P > 0,05$].

- CaCl_2 0,05 mM: a ingestão de CaCl_2 foi maior no grupo ÓLEO/ANG II em relação ao grupo DOCA/SAL. Não houve diferença entre os demais grupos [$F(3,32) = 3,1, P < 0,05$].

- NaHCO_3 0,15 M: não houve diferença entre os grupos tratados com ANG II, assim como com os grupos tratados com SAL. Ambos os grupos tratados com ANG II ingeriram mais NaHCO_3 em relação aos grupos DOCA/SAL e ÓLEO/SAL [$F(3,32) = 4,4, P < 0,05$].

- NaCl 0,15 M: não houve diferença entre os grupos experimentais para a ingestão de NaCl [$F(3,32) = 2,4, P > 0,05$].

- Soluções não sódicas ($\text{KCl} + \text{CaCl}_2$): o grupo ÓLEO/ANG II ingeriu mais soluções não sódicas do que os grupos tratados com SAL. Não houve diferença entre os demais grupos [$F(3,32) = 3,5, P < 0,05$].

- Soluções sódicas ($\text{NaHCO}_3 + \text{NaCl}$): não houve diferença entre os grupos tratados com ANG II, assim como com os grupos tratados com SAL. Ambos os grupos tratados com ANG II ingeriram mais soluções sódicas em relação aos grupos DOCA/SAL e ÓLEO/SAL [$F(3,32) = 8,6, P < 0,05$].

c) Teste de preferência mineral com cinco bebedouros: protocolo do sinergismo versus depleção de sódio

Para esta análise foi utilizado o grupo depletado de sódio FURO/FIXA (*Experimento 2*), além dos grupos DOCA/ANG II e ÓLEO/ANG II do teste paradigmático do sinergismo. Os três grupos possuem em comum o número e o posicionamento dos bebedouros. A ingestão de NaCl 0,15 M foi significativamente maior no FURO/FIXA em relação ao grupo DOCA/ANG II e DOCA ÓLEO [$F(2,25) = 7,8, P < 0,05$]. Não houve diferença entre os grupos para ingestão de água [$F(2,25) = 2,6, P > 0,05$], KCl 0,01 M [$F(2,25) = 0,7, P > 0,05$], CaCl_2 0,05 mM [$F(2,25) = 2,0, P > 0,05$] e NaHCO_3 0,15 M [$F(2,25) = 0,1, P > 0,05$] (*ver Figura 24, acima*).

Em relação à ingestão das soluções não-sódicas, não houve diferença entre os grupos experimentais [$F(2,25) = 2,0, P > 0,05$]. A ingestão de soluções sódicas foi maior no grupo FURO/FIXA em relação aos demais grupos [$F(2,25) = 6,5, P < 0,05$]. Não houve diferença na ingestão total entre os grupos [$F(2,25) = 0,6, P < 0,05$] (*ver Figura 24, abaixo*).

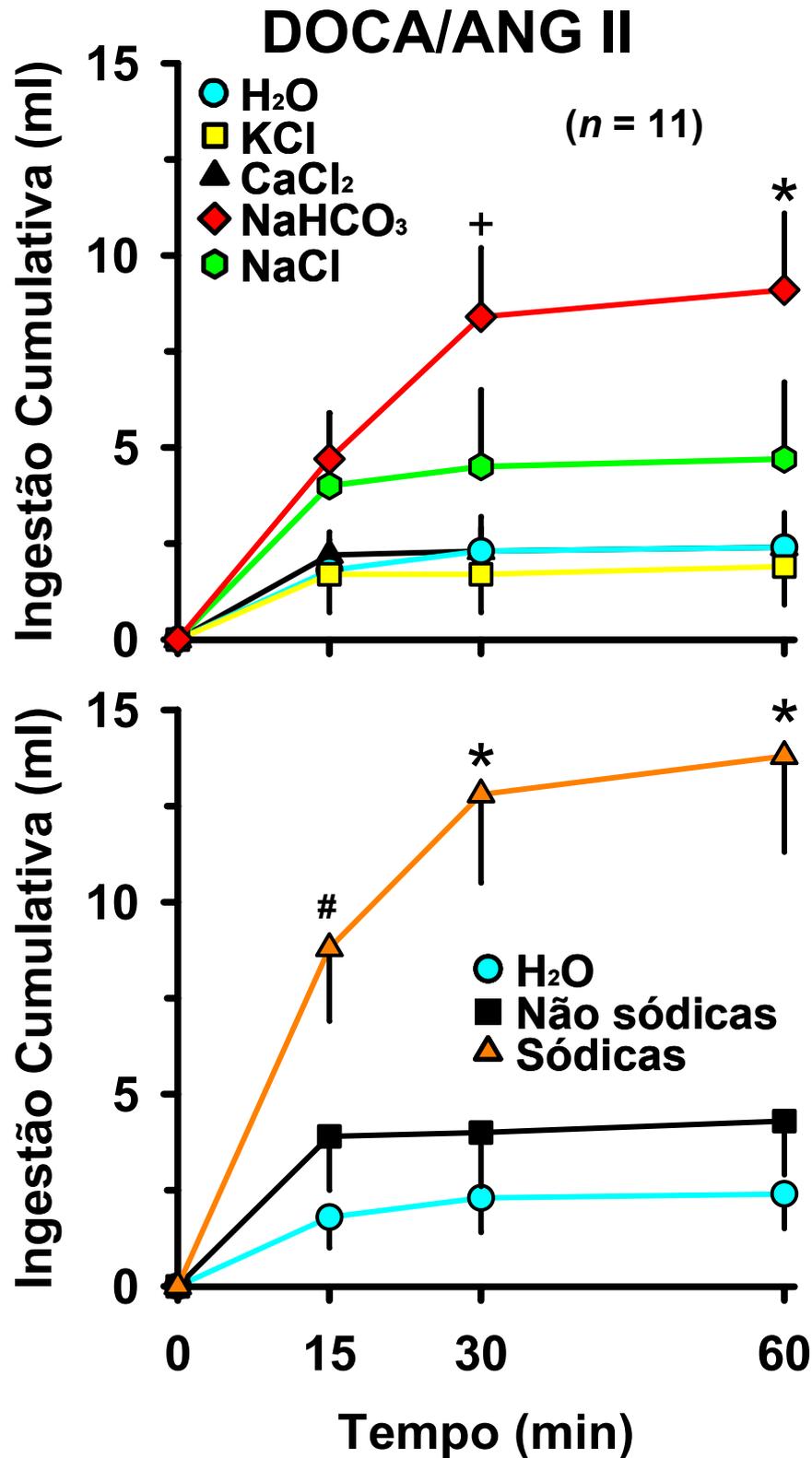


Figura 20. Efeito da injeção icv de ANG II 50 ng (1 μ l), após tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de água e soluções palatáveis de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M, acima, ou sobre a ingestão de água e ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl) e não sódicas (KCl + CaCl₂), abaixo. Teste realizado com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros. #Diferente de água; +Diferente de H₂O, KCl e CaCl₂; *Diferente dos demais líquidos.

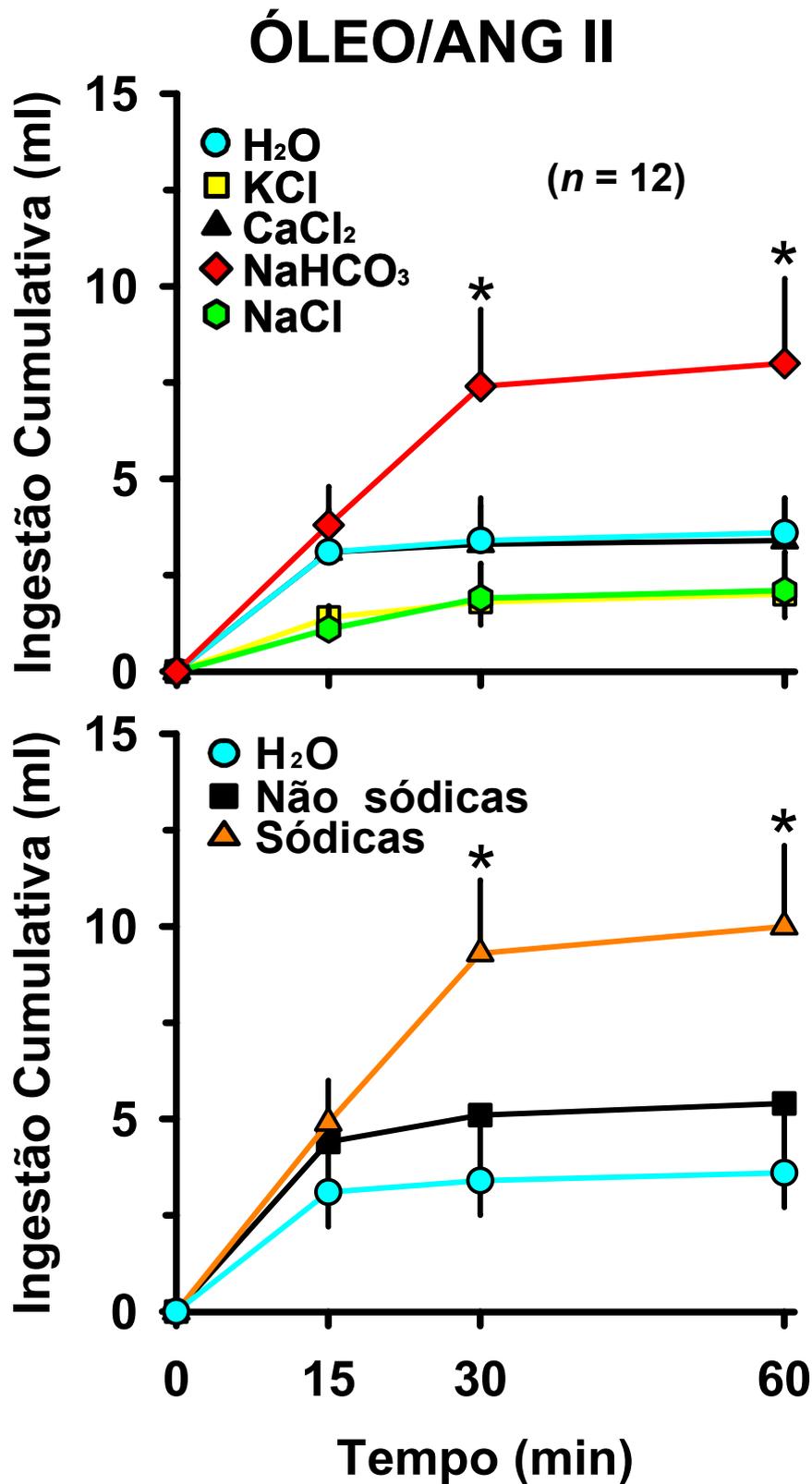


Figura 21. Efeito da injeção icv de ANG II 50 ng (1 μ l), após tratamento com ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de água e soluções palatáveis de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M, acima, ou sobre a ingestão de água e ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl) e não sódicas (KCl + CaCl₂), abaixo. Teste realizado com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros. *Diferente dos demais líquidos.

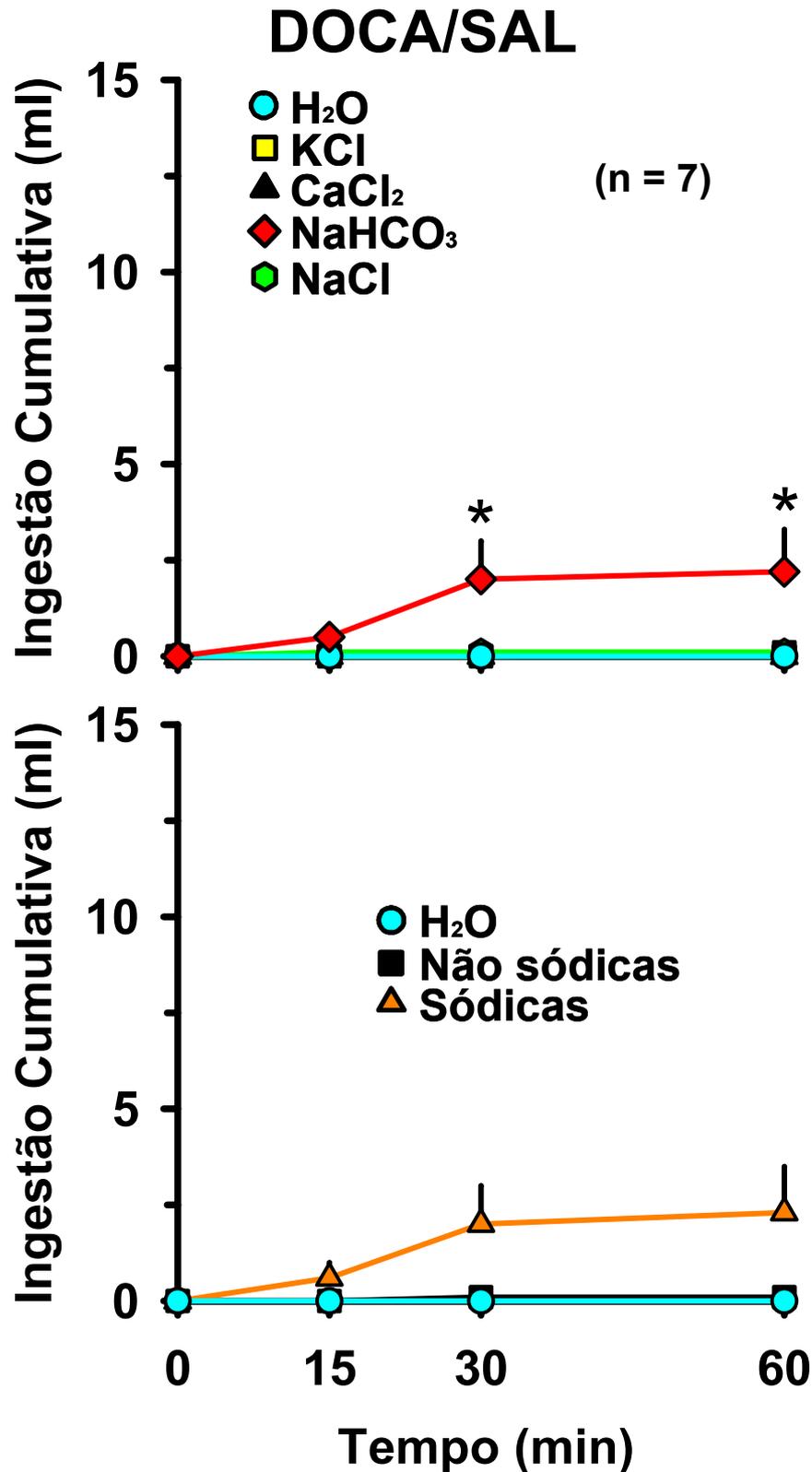


Figura 22. Efeito da injeção icv de SAL (1 μ l), após tratamento com DOCA 2,5 mg (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de água e soluções palatáveis de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M, acima, ou sobre a ingestão de água e ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl) e não sódicas (KCl + CaCl₂), abaixo. Teste realizado com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros. *Diferente dos demais líquidos.

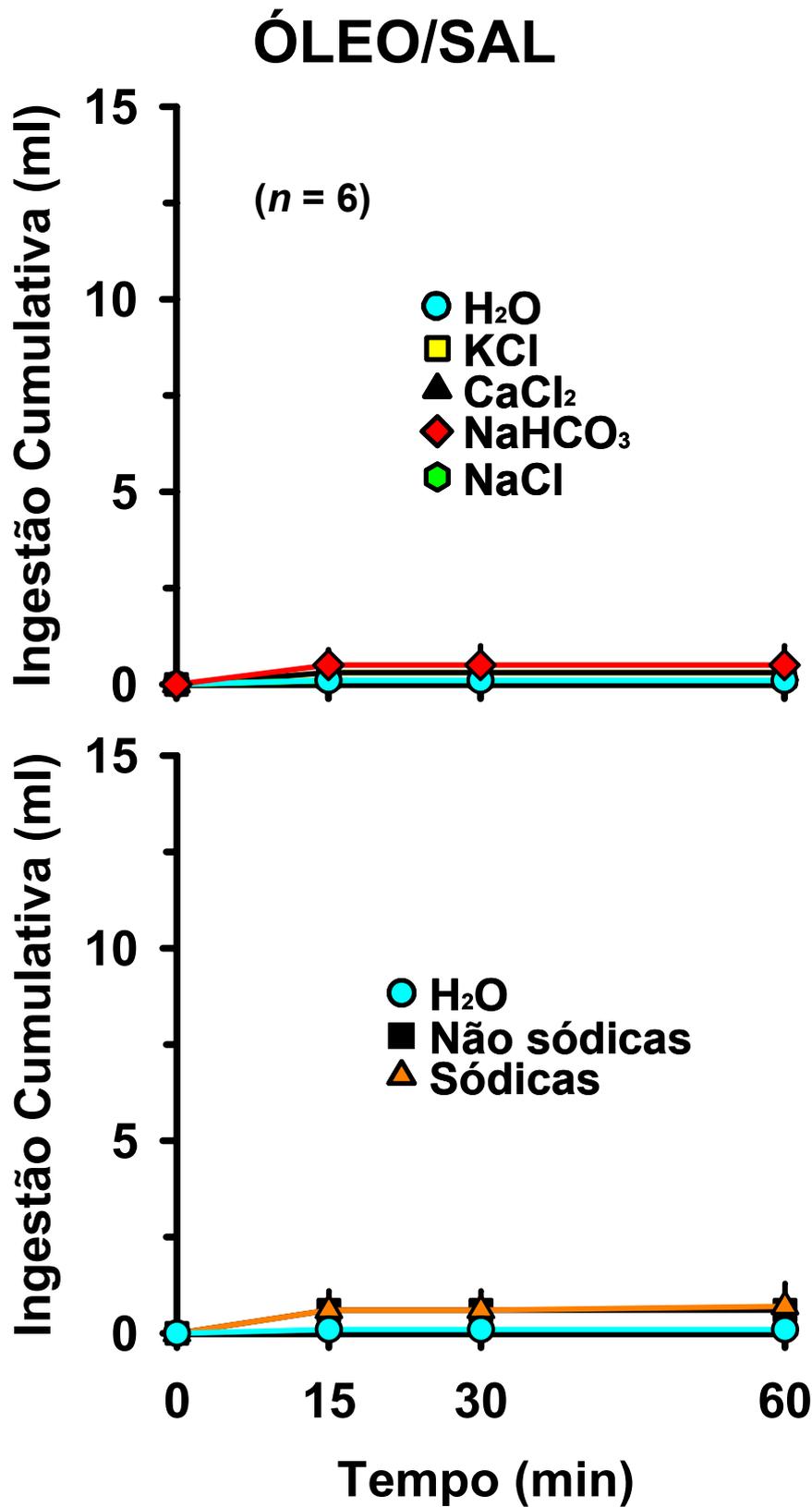


Figura 23. Efeito da injeção icv de SAL (1 μ l), após tratamento com ÓLEO (1 ml) sc por 3 dias, sobre a ingestão de água e soluções palatáveis de KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M (acima) ou sobre a ingestão de água e ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl) e não sódicas (KCl + CaCl₂). Teste realizado com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros.

Sinergismo vs. depleção de Na⁺

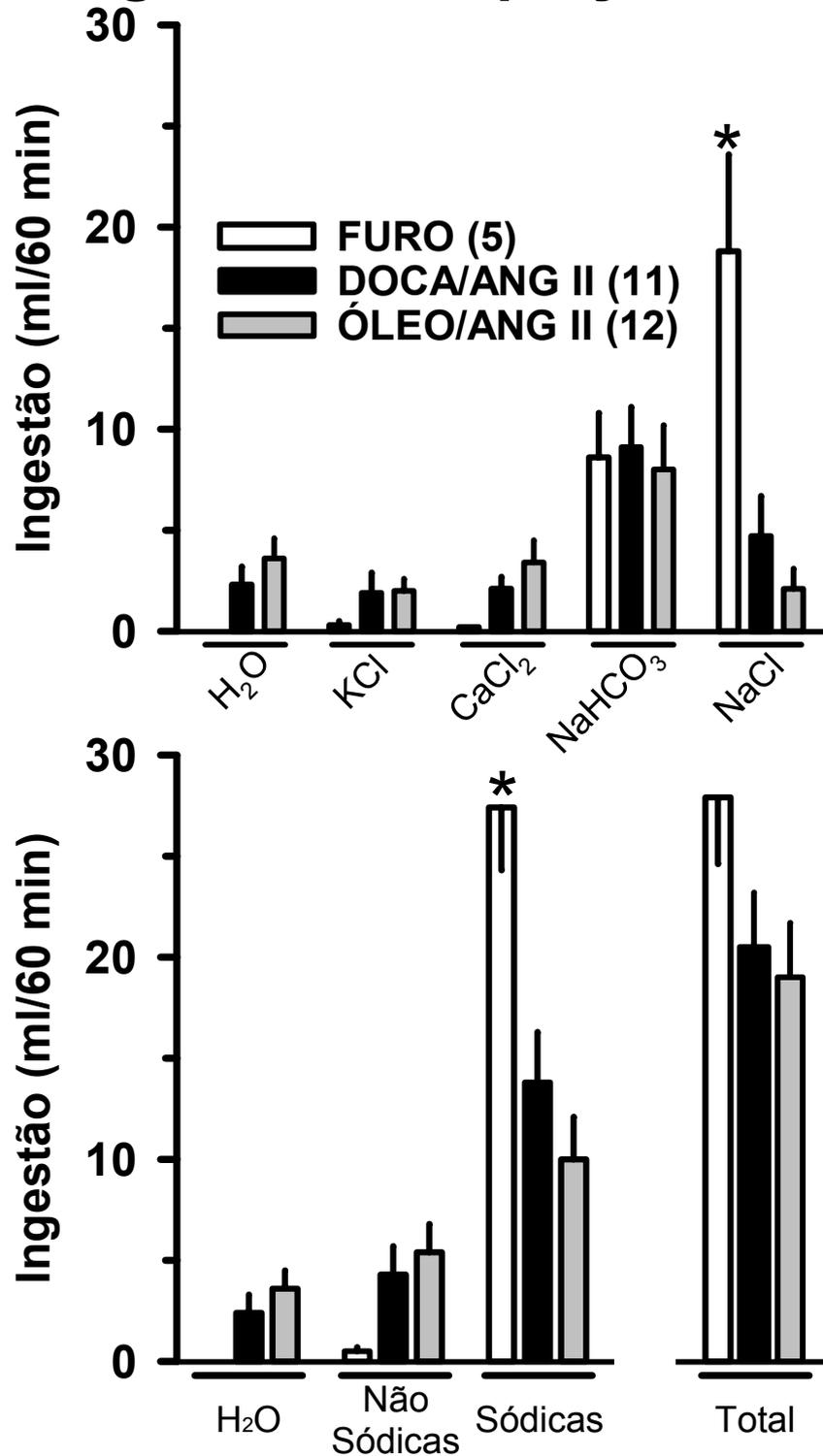


Figura 24. Comparação da preferência mineral obtida nos grupos FURO/FIXA (experimento 1), ÓLEO/ANG II e DOCA/ANG II. Acima: ingestão de água e soluções palatáveis (KCl 0,01 M, CaCl₂ 0,05 mM, NaHCO₃ 0,15 M e NaCl 0,15 M). Abaixo: ingestão de água, ingestão total calculada de soluções palatáveis sódicas (NaHCO₃ + NaCl), não sódicas (KCl + CaCl₂) e total. Testes realizados com o oferecimento simultâneo de cinco bebedouros (figuras 9, 20 e 21). *Diferente dos demais grupos.

3. Discussão e conclusão

Em testes de preferência mineral com o oferecimento de soluções minerais palatáveis, os presentes resultados confirmam a preferência ao sódio em ratos hipovolêmicos, porém o padrão de ingestão mineral não foi idêntico ao observado para os ratos submetidos ao tratamento com mineralocorticóide e ANG II, hormônios responsáveis pelo surgimento do apetite ao sódio observado algumas horas após a hipovolemia (SAKAI *et al.*, 1986). Além disso, tanto a dose de DOCA como de ANG II utilizadas nestes experimentos, incapazes de induzir a ingestão de NaCl hipertônico (aversivo), promoveram ingestão mineral específica ao sódio, no caso do mineralocorticóide, e não específica aos sais testados, no caso do peptídeo.

A especificidade da ingestão reativa de sódio, que ocorre em animais depletados desse íon (SCHULKIN, 1991a; FITZSIMONS, 1998), mesmo quando soluções palatáveis não sódicas são oferecidas (*Experimentos 1 e 2*), foi em parte confirmada através do teste paradigmático do sinergismo, feito pela combinação de um tratamento sistêmico com um mineralocorticóide (DOCA) previamente a uma injeção icv de ANG II. Quando esse teste foi executado com dois bebedouros, um contendo água e um contendo solução mineral palatável (NaCl 0,15 M, NaHCO₃ 0,15 M ou KCl 0,01 M) ocorreu potenciação apenas das soluções contendo sódio. Além disso, efeito preferencial sobre soluções sódicas, embora não tão nítido como no teste de dupla escolha, ocorreu quando o teste paradigmático do sinergismo foi executado com cinco bebedouros, um contendo água e os demais contendo as respectivas soluções minerais palatáveis. Tanto a ausência de preferência mineral espontânea (diária) como a preferência por soluções sódicas, induzida pela depleção de sódio, não dependem do posicionamento dos bebedouros na gaiola. Nenhuma das cinco posições de bebedouros disponíveis foi preferida pelos ratos (*ver Figuras 7-10*), assim como não existiu preferência por nenhuma posição quando cinco bebedouros contendo água foram oferecidos após privação hídrica (CONSTÂNCIO, resultados não publicados). Os tratamentos com DOCA e ANG II utilizados no teste paradigmático do sinergismo são incapazes de, individualmente, promover ingestão de NaCl 0,50 M, que foi observada somente quando os dois tratamentos são associados (*presentes resultados*), como observado nos primeiros experimentos de sinergismo entre estes dois hormônios (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983; SAKAI *et al.*, 1987).

Os resultados com dois bebedouros confirmam a importância de se utilizar soluções com graus comparáveis de palatabilidade (TORDOFF, 1994). Além da ingestão de soluções sódicas isotônicas, a ANG II induziu também a ingestão de KCl 0,01 M, ao contrário de

trabalhos anteriores em que a ANG II não teve efeito sobre a ingestão de KCl isomolar ao NaCl, em testes de dois bebedouros em que um bebedouro continha água e o outro o sal dissolvido (AVRITH; FITZSIMONS, 1980). Além disso, a adrenalectomia promove aumento da ingestão de solução de KCl quando ela é a única solução mineral disponível em teste de um bebedouro (RICHTER, 1956). Considerando que a ANG II medeia a ingestão de NaCl em ratos adrenalectomizados (SAKAI; EPSTEIN, 1990; GALAVERNA *et al.*, 1996; SCHOORLEMMER *et al.*, 2001), podemos perguntar se a ingestão de KCl nesses animais seria devida ao peptídeo. Por outro lado, é possível que a ANG II seja responsável pela ingestão de soluções de NaCl e de NaHCO₃ em animais tratados cronicamente com o diurético hidroclorotiazida, que apresentam elevada atividade de renina plasmática e, paradoxalmente, reduzida concentração plasmática de aldosterona (ROWLAND; COLBERT, 2003).

Se por um lado a ingestão induzida pela ANG II central é inespecífica (não exclusiva a nenhum sal) e em volumes semelhantes para as três soluções minerais palatáveis em testes de dois bebedouros, por outro lado uma preferência ao bicarbonato de sódio foi observada quando múltiplas soluções palatáveis foram oferecidas no teste de cinco bebedouros (*ver Figura 21, acima*). Esse tipo de inconsistência ocorre também na desidratação intracelular: infusão intravenosa de NaCl hipertônico induz ingestão de água e NaCl isotônico em testes com dois bebedouros (PEREIRA *et al.*, 2002), porém a ingestão de NaCl é praticamente nula em testes de cinco bebedouros com soluções palatáveis, sendo que os ratos passam a preferir KCl (PEREIRA *et al.*, 2005). No entanto, os ratos hipovolêmicos não ingeriram soluções sem íon sódio independentemente do número de bebedouros em ambos os testes, mostrando que a ingestão mineral é específica (exclusiva) ao sódio (*presentes resultados*). Estas observações sugerem que o efeito preferencial da ANG II pela ingestão de sódio na forma de NaHCO₃ não é exclusiva; talvez o peptídeo esteja sinalizando “ingestão de sódio ou mineral”; portanto, a ingestão de outro mineral que não sódio, como o potássio por exemplo, poderia estar satisfazendo o sinal do peptídeo. Semelhante à proposta de que o sódio possa servir de marcador para a busca de outros minerais necessitados (SCHULKIN, 1991b), é possível então que o inverso também seja verdadeiro, ou seja, a não seletividade ao sódio na fase inicial da hipovolemia seria um indicador de busca por mineral, que gradualmente seria especificada ao sódio.

Diferentemente dos resultados obtidos no teste paradigmático do sinergismo, o padrão de ingestão para as soluções sódicas e de KCl foram semelhantes nos testes de depleção de sódio induzida por furosemida com dois ou cinco bebedouros. Neste modelo experimental de

indução do apetite ao sódio, as concentrações plasmáticas de ANG II e aldosterona permanecem elevadas durante horas (ROWLAND; MORIAN, 1999), talvez por isso a preferência ao sódio, mais pronunciada ao NaCl, seja observada mesmo quando o rato tem a possibilidade de escolha (*Experimento 2*). Neste caso, como a ingestão induzida é específica ao sódio, a preferência às soluções sódicas foi observada quando outras soluções foram oferecidas simultaneamente, e o KCl foi absolutamente rejeitado mesmo sendo o único sal oferecido ao rato (*ver Figura 4*). Assim, os presentes resultados sugerem que os testes de dois ou cinco bebedouros permitem a investigação de aspectos diferentes da preferência mineral e são, portanto, testes complementares entre si.

Trabalhos anteriores de nosso laboratório com testes de cinco bebedouros mostraram aumento não-específico na ingestão mineral e água, nas primeiras horas após a injeção de furosemida (PEREIRA *et al.*, 2005). Os presentes resultados sugerem, portanto, que em algum momento depois dessas primeiras horas o sinal para ingestão passa ser específico para o sódio. O surgimento tardio da especificidade de ingestão para o sódio no animal hipovolêmico é coerente com uma ação da ANG II inicial e mais rápida, dependente de transdução de membrana, e uma ação mais lenta do mineralocorticóide dependente de expressão gênica tardia (THORNTON *et al.*, 1985; ROWLAND; MORIAN, 1999). Talvez a ANG II, um fator dipsogênico e natriorexigênico, esteja produzindo um apetite genérico por mineral, melhor satisfeito quando o NaHCO₃ esteve disponível no teste paradigmático do sinergismo. O mineralocorticóide, um fator aparentemente apenas natriorexigênico, quando aumentado, ajudaria o sinal da ANG II a se tornar ainda mais seletivo para o sódio, conforme claramente mostram os resultados com o teste paradigmático de dois bebedouros. No teste de cinco bebedouros esse efeito estaria atenuado, mas ainda presente, uma vez que a ingestão total de sódio aumentou no início do teste. Assim, é possível que o tratamento prévio com a DOCA modifique o sinal ativado pela ANG II, o que no animal depletado de sódio pode corresponder a uma ação da aldosterona ajudando a converter esse sinal de ingestão não-específica para ingestão específica de sódio. Talvez este mecanismo explique a ausência de preferência mineral na fase inicial da hipovolemia (PEREIRA *et al.*, 2005) e a rejeição absoluta às soluções não sódicas 24 horas após a depleção de sódio (presentes resultados). Essa conclusão é consistente com o conceito clássico de que o apetite ao sódio é caracterizado por uma ingestão de NaCl hipertônico; enquanto rejeitado nas primeiras horas de depleção de sódio, ele é avidamente ingerido mais tarde (STRICKER; JALOWIEC, 1970).

Além da atuação dos mineralocorticóides e da ANG II na indução do apetite ao sódio (SAKAI *et al.*, 1986), as diferenças observadas no padrão de preferência mineral entre o teste

paradigmático do sinergismo e a hipovolemia podem ser devidas ao aspecto multifatorial dos mecanismos envolvidos na produção da ingestão de sódio no animal hipovolêmico. Além dos hormônios assunto do presente trabalho, os glicocorticóides e a redução da carga nos sistemas cardiovasculares de baixa pressão também atuam facilitando a ingestão de sódio (SAKAI *et al.*, 1996; JOHNSON; THUNHORST, 1997; DANIELS; FLUHARTY, 2004).

Também não podemos descartar a desativação de mecanismos inibitórios, que poderiam estar contribuindo para a expressão da especificidade do apetite ao sódio. O NPBL é considerado uma importante área de controle inibitório sobre a ingestão de sódio por intermediar e integrar as informações de áreas anteriores e posteriores encefálicas, sendo as vias serotoninérgicas do NPBL responsáveis pela inibição do apetite ao sódio induzido pela hipovolemia ou mesmo originado por estímulos considerados estritamente dipsogênicos (DE LUCA JR *et al.*, 2004). No animal hipovolêmico com acesso à água, representado no modelo diurético aqui utilizado, ocorre, por exemplo, diluição do líquido extracelular, o que pode remover uma influência inibitória da pressão osmótica sobre o apetite ao sódio (VERBALIS *et al.*, 1993; STRICKER; VERBALIS, 1996; WEISINGER *et al.*, 2004).

O tratamento com DOCA não alterou a ingestão diária de NaCl aversivo nem de KCl 0,01 M, mas promoveu aumento da ingestão diária de NaCl 0,15 M e uma ligeira tendência ao aumento da ingestão diária de NaHCO₃ 0,15 M. Estes resultados sugerem que a DOCA induz ingestão de sódio, com resultado mais pronunciado ao NaCl, de acordo com resultados da literatura (LOCKE; FIELDING, 1994). A ineficácia em promover ingestão de NaCl hipertônico, tanto pela ANG II como pela DOCA, reforça a sugestão de que a concentração da solução testada é um fator de grande importância em testes de preferência mineral. Cada sal em solução possui sua concentração de maior palatabilidade, ou seja, aquela que está no ápice da curva de preferência, normalmente em forma de “U-invertido” (TORDOFF, 1994). A solução de NaCl 0,50 M está em um dos extremos de preferência.

Os presentes resultados sugerem uma ressalva ao critério para a existência do sinergismo mineralocorticóide e ANG II, onde ambos os hormônios são usados em doses que não induzam ingestão de sódio (FLUHARTY; EPSTEIN, 1983), critério esse formulado a partir de observações feitas apenas sobre a ingestão de NaCl 0,50 M, que é extremamente aversivo aos ratos (RICHTER, 1956). Considerando a ingestão de NaCl hipertônico no teste paradigmático do sinergismo, os hormônios apresentaram ação sinérgica, pois sozinhos não foram capazes de induzir ingestão de sódio. Porém os presentes resultados sugerem que o apetite ao sódio não segue um padrão tudo-ou-nada: a ingestão inespecífica de soluções minerais palatáveis, desencadeada pela ANG II, é modulada pelo mineralocorticóide e

possivelmente por outros fatores discutidos anteriormente, produzindo ingestão específica ao sódio. Assim, é possível que o sinergismo contribua também para aumentar uma ingestão de sódio já presente, como ocorre com soluções isotônicas, além de torná-la específica.

Em suma, os resultados da literatura e os aqui apresentados sugerem que uma interação entre ANG II e mineralocorticóide contribui para a expressão de duas características do apetite ao sódio, a ingestão de soluções hipertônicas de NaCl e também a seletividade pelo íon sódio.

Referências bibliográficas

ALLEN, A.M.; MOELLER, I.; JENKINS, T.A.; ZHUO, J.; ALDRED, G.P.; CHAI, S.Y.; MENDELSON, F.A.O. Angiotensin receptors in the nervous system. **Brain Res Bull.** v. 47, n. 1, p. 17-28, 1998.

AVRITH, D.B.; FITZSIMONS, J.T. Increased sodium appetite in the rat induced by intracranial administration of components of the renin-angiotensin system. **J Physiol.** v. 301, p. 349-364, 1980.

BRESLIN, P.A.S.; KAPLAN, J.M.; SPECTOR, A.C.; ZAMBITO, C.M.; GRILL, H.J. Lick rate analysis of sodium taste-state combinations. **Am J Physiol.** v. 264, n. 2 Pt 2, p. R312-R318, 1993.

CLARK, W.G.; CLAUSEN, D.F. Dietary "self-selection" and appetites of untreated and treated adrenalectomized rats. **Am J Physiol.** v. 139, p. 70-79, 1943.

COVIAN, M.R.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; GENTIL, C.G.; SAAD, W.A.; CAMARGO, L.A.; SILVA NETO, C.R. Central control of salt balance. In: G.J. MOGENSEN, F.R. CALARESU (Eds.). **Neural integration of PHYSIOLOGICAL MECHANISMS and BEHAVIOUR (J.A.F. Stevenson Memorial Volume)**. University of Toronto Press, 1975. pp. 267-282.

DANIELS, D.; FLUHARTY, S.J. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. **Physiol Behav.** v. 81, n. 2, p. 319-337, 2004.

DE LUCA JR., L.A.; GALAVERNA, O.; SCHULKIN, J.; YAO, S.Z.; EPSTEIN, A.N. The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. **Brain Res Bull.** v. 28, n. 1, p. 73-87, 1992.

DE LUCA JR., L.A.; VIVAS, L.M.; MENANI, J.V. Controle neuroendócrino da ingestão de água e sódio. In: J.A. ANTUNES-RODRIGUES, A.C. MOREIRA, L.L.K. ELIAS, M. DE CASTRO (Eds.). **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. pp. 116-134.

EPSTEIN, A.N. Prospectus: Thirst and Salt Appetite. **Neurobiology of Food and Fluid Intake**. New York: Plenum Publishers, 1990. pp. 489-512.

EPSTEIN, A.N.; SAKAI, R.R. Angiotensin-aldosterone synergy and salt intake. In: J.P. BUCKLEY, C.M. FERRARIO (Eds.). **Brain Peptides and catecholamines in cardiovascular regulation**. New York: Raven Press, 1987. pp. 337-345.

EVERED, M.; RICHARDSON, M. The short-term effect of captopril on salt and water intake in the rats is not taste-specific. **Eur J Pharmacol.** v. 116, n. 3, p. 249-255, 1985.

FINDLAY, A.L.; EPSTEIN, A.N. Increased sodium intake is somehow induced in rats by intravenous angiotensin II. **Horm Behav.** v. 14, n. 1, p. 86-92, 1980.

FITTS, D.A.; MASSON, D.B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behav Neurosci.** v. 103, n. 4, p. 865-872, 1989.

FITZSIMONS, J.T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev.** v. 78, n. 3, p. 583-686, 1998.

FLUHARTY, S.J.; EPSTEIN, A.N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. **Behav Neurosci.** v. 97, n. 5, p. 746-758, 1983.

FREGLY, M.J. Specificity of the sodium chloride appetite of adrenalectomized rats; substitution of lithium chloride for sodium chloride. **Am J Physiol.** v. 195, p. 645-653, 1958.

FREGLY, M.J.; ROWLAND, N.E. Hormonal and Neural Mechanisms of Sodium Appetite. **News Physiol Sci.** v. 1, n. 2, p. 51-54, 1986.

FREGLY, M.J.; ROWLAND, N.E. Role of renin-angiotensin-aldosterone system in NaCl appetite of rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 248, n. 1, p. R1-11, 1985.

GALAVERNA, O.; DE LUCA JR, L.A.; SCHULKIN, J.; YAO, S.Z.; EPSTEIN, A.N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res Bull.** v. 28, n. 1, p. 89-98, 1992.

GALAVERNA, O.; POLIDORI, C.; SAKAI, R.R.; LIENARD, F.; CHOW, S.Y.; FLUHARTY, S.J. Blockade of central angiotensin II type 1 and type 2 receptors suppresses adrenalectomy-induced NaCl intake in rats. **Regul Pept.** v. 66, n. 1-2, p. 47-50, 1996.

GEERLING, J.C.; ENGELAND, W.C.; KAWATA, M.; LOEWY, A.D. Aldosterone Target Neurons in the Nucleus Tractus Solitarius Drive Sodium Appetite. **J Neurosci.** v. 26, n. 2, p. 411-417, 2006a.

GEERLING, J.C.; KAWATA, M.; LOEWY, A.D. Aldosterone-sensitive neurons in the rat central nervous system. **J Comp Neurol.** v. 494, n. 3, p. 515-527, 2006b.

GEERLING, J.C.; LOEWY, A.D. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: Bidirectional connections with the central nucleus of the amygdala. **J Comp Neurol.** v. 497, n. 4, p. 646-657, 2006.

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, 1997.

KING, S.J.; HARDING, J.W.; MOE, K.E. Elevated salt appetite and brain binding of angiotensin II in mineralocorticoid-treated rats. **Brain Res.** v. 448, n. 1, p. 140-149, 1988.

LOCKE, K.W.; FIELDING, S. Enhancement of salt intake by choline chloride. **Physiol Behav.** v. 55, n. 6, p. 1039-1046, 1994.

MASSI, M.; EPSTEIN, A.N. Angiotensin/aldosterone synergy governs the salt appetite of the pigeon. **Appetite.** v. 14, n. 3, p. 181-192, 1990.

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

NACHMAN, M. Taste preferences for lithium chloride by adrenalectomized rats. **Am J Physiol.** v. 205, n. 2, p. 219-221, 1963.

NITABACH, M.N.; SCHULKIN, J.; EPSTEIN, A.N. The medial amygdala is part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. **Behav Brain Res.** v. 35, n. 2, p. 127-134, 1989.

NOZAKI, P.N.; PEREIRA, D.T.B.; MOURA, F.V.; MENANI, J.V.; DE LUCA JR., L.A. Ingestion of hypertonic NaCl vs. palatable drinks by sodium-depleted rats. **Physiol Behav.** v. 75, n. 4, p. 443-448, 2002.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates.** 2. ed. New York: Academic Press, 1986.

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, n. 2, p. 99-106, 2005.

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. 76, n. 4-5, p. 501-505, 2002.

RICHTER, C.P. Salt appetite of mammals: its dependence on instinct and metabolism. In: M. AUTUORI (Ed.). **L'Instinct dans le Comportement des Animaux et de l'Homme.** Paris: Masson, 1956. pp. 577-632.

RICHTER, C.P. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. **Am J Physiol.** v. 115, p. 155-161, 1936.

ROLLS, B.; ROLLS, E. **Thirst.** Cambridge: Cambridge University Press, 1982.

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.

ROWLAND, N.E.; MORIAN, K.R. Roles of aldosterone and angiotensin in maturation of sodium appetite in furosemide-treated rats. **Am J Physiol.** v. 276, n. 5 Pt 2, p. R1453-R1460, 1999.

SAKAI, R.R.; EPSTEIN, A.N. Dependence of adrenalectomy-induced sodium appetite on the action of angiotensin II in the brain of the rat. **Behav Neurosci.** v. 104, n. 1, p. 167-176, 1990.

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

SAKAI, R.R.; MA, L.Y.; ZHANG, D.M.; MCEWEN, B.S.; FLUHARTY, S.J. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. **Neuroendocrinology.** v. 64, n. 6, p. 425-429, 1996.

SAKAI, R.R.; NICOLAIDIS, S.; EPSTEIN, A.N. Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin II and aldosterone. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 251, n. 4, p. R762-R768, 1986.

SCHOORLEMMER, G.H.M.; JOHNSON, A.K.; THUNHORST, R.L. Circulating angiotensin II mediates sodium appetite in adrenalectomized rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 281, n. 3, p. R723-R729, 2001.

SCHULKIN, J. **Sodium hunger: the search for a salty taste.** Cambridge: Cambridge University Press, 1991a.

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

SHADE, R.E.; BLAIR-WEST, J.R.; CAREY, K.D.; MADDEN, L.J.; WEISINGER, R.S.; DENTON, D.A. Synergy between angiotensin and aldosterone in evoking sodium appetite in baboons. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 283, n. 5, p. R1070-R1078, 2002.

STRICKER, E.M.; JALOWIEC, J.E. Restoration of intravascular fluid volume following acute hypovolemia in rats. **Am J Physiol.** v. 218, n. 1, p. 191-196, 1970.

STRICKER, E.M.; VERBALIS, J.G. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. **Regul Pept.** v. 66, n. 1-2, p. 83-85, 1996.

THORNTON, S.N.; JEULIN, A.; DE BEAUREPAIRE, R.; NICOLAIDIS, S. Iontophoretic application of angiotensin II, vasopressin and oxytocin in the region of the anterior hypothalamus of the rat. **Brain Res Bull.** v. 14, p. 211-215, 1985.

THORNTON, S.N.; NICOLAIDIS, S. Long-term mineralocorticoid-induced changes in rat neuron properties plus interaction of aldosterone and ANG II. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 266, n. 2, p. R564-R571, 1994.

THRASHER, T.N.; KEIL, L.C. Regulation of drinking and vasopressin secretion: role of organum vasculosum laminae terminalis. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 253, p. R108-R120, 1987.

THUNHORST, R.L.; JOHNSON, A.K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. **Am J Physiol.** v. 266, n. 2 Pt 2, p. R458-R465, 1994.

TORDOFF, M.G. Voluntary intake of calcium and other minerals by rats. **Am J Physiol.** v. 267, n. 2 Pt 2, p. R470-R475, 1994.

TORDOFF, M.G. Polyethylene glycol-induced calcium appetite. **Am J Physiol.** v. 273, n. 2 Pt 2, p. R587-R596, 1997.

TORDOFF, M.G.; BACHMANOV, A.A. Mouse taste preference tests: why only two bottles? **Chem Senses.** v. 28, n. 4, p. 315-324, 2003.

VERBALIS, J.G.; BLACKBURN, R.E.; OLSON, B.R.; STRICKER, E.M. Central oxytocin inhibition of food and salt ingestion: a mechanism for intake regulation of solute homeostasis. **Regul Pept.** v. 45, n. 1-2, p. 149-154, 1993.

WEISINGER, R.S.; BLAIR-WEST, J.R.; BURNS, P.; CHEN, N.; WEISINGER, H.S. Neurobiology of sodium appetite. In: E.M. STRICKER, S.C. WOODS (Eds.). **Handbook of behavioral neurobiology.** 2. ed. New York: Plenum, 2004. pp. 547-587.

WEISINGER, R.S.; DENTON, D.; DI NICOLANTONIO, R.; MCKINLEY, M.J.; MULLER, A.F.; TARJAN, E. Role of angiotensin in sodium appetite of sodium-depleted sheep. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.** v. 253, p. 482-488, 1987.

WILSON, K.M.; SUMNERS, C.; HATHAWAY, S.; FREGLY, M.J. Mineralocorticoids modulate central angiotensin II receptors in rats. **Brain Res.** v. 382, n. 1, p. 87-96, 1986.

WOLF, G. Refined salt appetite methodology for rats demonstrated by assessing sex differences. **J Comp Physiol Psychol.** v. 96, n. 6, p. 1016-1021, 1982.

WOLF, G. Effect of deoxycorticosterone on sodium appetite of intact and adrenalectomized rats. **Am J Physiol.** v. 208, n. 6, p. 1281-1285, 1965.

ZHANG, D.M.; EPSTEIN, A.N.; SCHULKIN, J. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. **Brain Res.** v. 600, n. 1, p. 20-26, 1993.