

Universidade Federal de São Carlos

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

PIPGCF UFSCar/UNESP

EMILSON DONIZETE PEREIRA JUNIOR

**RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E AUTONÔMICAS INDUZIDAS
PELA PRIVAÇÃO HÍDRICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

ARARAQUARA

2022

Universidade Federal de São Carlos
Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas
PIPGCF UFSCar/UNESP

EMILSON DONIZETE PEREIRA JUNIOR

**RESPOSTAS COMPORTAMENTAIS E AUTONÔMICAS INDUZIDAS
PELA PRIVAÇÃO HÍDRICA EM RATOS ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas PIPGCF UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências Fisiológicas.
Orientadora: Carina Aparecida F. Andrade

ARARAQUARA

2022



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

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

Folha de Aprovação

Defesa de Tese de Doutorado do candidato Emilson Donizete Pereira Junior, realizada em 13/09/2022.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Carina Aparecida Fabrício de Andrade (UNESP)

Prof. Dr. Laurival Antonio de Luca Junior (UNESP)

Profa. Dra. Sandra Lia do Amaral Cardoso (UNESP)

Profa. Dra. Ana Carolina Thomaz Takakura (USP)

Prof. Dr. Lisandra Brandino de Oliveira (UFOP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas.

DEDICATÓRIA

*À Deus, aos meus pais, Emilson e Alessandra e irmã
Mirele, à todos meus familiares, amigos e professores
por todo apoio e incentivo em todos os momentos.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente pelo dom da vida o qual permite nossa existência, nossa consciência, a todo tempo dando forças, proteção, saúde e razão para o existir, sem Ele, nada sou.

Aos meus pais Emilson e Alessandra que sempre apoiaram incondicionalmente minhas escolhas, dando suporte à minha procura pela felicidade, além de toda base e educação familiar.

A minha irmã Mirele e demais familiares que sempre me apoiaram nessa caminhada, pelas orações, conselhos e amizade.

A professora Dra. Carina A. Fabricio de Andrade, pessoa incrível, por toda orientação, confiança, paciência, acolhimento, dedicação e incansável disposição em transmitir seu conhecimento.

Aos meus coorientadores professor Dr. Laurival de Luca Junior e José Vanderlei Menani.

Aos demais professores do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara e do programa interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas pelos ensinamentos.

Aline, Jéssica, Gabriela, Marcos, Bolival por estarem sempre juntos nessa caminhada, toda amizade, parceria, apoio e companheirismo, desde o começo.

Aos meus amigos da pós Lucas Gomes, Lucas Barreto, Gabriel, Diulie, Celina, Isabela, Rayssa, Letícia Além, Carol, Bruna, Isabela, Juliana, Luiz e outros.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara.

Aos demais colegas e amigos do laboratório e do Programa de Pós-graduação.

Á todos aqueles que cruzaram meu caminho e atuaram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste trabalho.

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

À agência de fomento Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq processo 164858/2018-0). Esse estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Brasil – Código de financiamento nº CAPES-PRINT - 88887.570034/2020-0.

*Entregue teu caminho ao Senhor, confia
nEle e o mais Ele fará.*

Salmos 37:5

RESUMO

O excesso de NaCl ingerido pode facilitar o surgimento e desenvolvimento de doenças crônicas, inclusive a hipertensão. O aumento na palatabilidade ao sal é geralmente a razão para consumo excessivo de NaCl. Ratos espontaneamente hipertensos (*Spontaneously hypertensive rats* – SHR), modelo animal para o estudo da hipertensão primária, ingerem maior quantidade de NaCl quando comparados às linhagens normotensas. Contudo, ainda era desconhecido se a elevada preferência ao NaCl observada em SHRs estaria relacionada a alterações na palatabilidade a esse íon. Considerando que SHRs teriam aumento da palatabilidade ao NaCl, seria importante avaliar também se essa alteração seria específica para o gosto salgado. Além disso, não havia informações na literatura se a estimulação gustatória poderia induzir respostas autonômicas cardiovasculares, bem como se episódios de desidratação poderiam alterar o perfil da palatabilidade e comportamento semelhante a ansiedade e atividade locomotora em SHRs.

Assim sendo, os objetivos do presente estudo foram investigar: a) a palatabilidade ao NaCl 0,3 M; b) o perfil de palatabilidade ao gosto doce e amargo; c) as respostas autonômicas cardiovasculares induzidas pela estimulação gustatória; d) o perfil de comportamentos semelhante à ansiedade e atividade locomotora, em ratos normotensos e SHRs em condição basal e após ciclo de privação hídrica e reidratação parcial (PH-RP). Para tanto, SHRs e ratos normotensos da linhagem Holtzman foram submetidos ao procedimento cirúrgico de: a) implante de cânula intraoral (IO), para o teste de reatividade gustatória (TRG); b) implante de cânula na artéria femoral, para registro de pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC); c) implante de cânula em direção ao ventrículo lateral (VL), para administração intracerebroventricular (icv).

A infusão de NaCl 0,3 M IO produziu maior número de respostas hedônicas sem diferença no número de respostas aversivas em SHRs, quando comparado com normotensos. O bloqueio central de receptores angiotensinérgicos AT1 (losartana 100 ng/1 µl i.c.v.) aboliu a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo protocolo de PH-RP, enquanto reduziu, apenas transitoriamente (primeiros 30 minutos do teste de 60 minutos) o número de respostas hedônicas ao sabor salgado, sem alterações nas respostas aversivas. Losartana i.c.v. também reduziu, somente transitoriamente (primeiros 30 minutos), o número de respostas hedônicas ao sabor salgado, em SHRs hidratados. Assim como para o gosto salgado, SHRs apresentaram um número similar de respostas hedônicas para sacarose 2% IO e um número similar para respostas aversivas à quinina IO, seja após PH-RP ou na condição hidratada. Além disso, essas respostas hedônicas e aversivas foram maiores quando comparadas com

ratos normotensos. A infusão IO dos diferentes gostos produziu um aumento na PAM e um aumento na FC para sacarose 2%, NaCl 0,5 M e quinina em ratos normotensos e quinina para SHRs, sendo esse efeito pressor maior em SHRs, para todos os gostos. A administração de prazosin (antagonista de receptores adrenérgicos α_1 , 1 mg/ml/kg i.v.) aboliu o efeito pressor induzido pela infusão IO de todas as soluções testadas, em ambas às linhagens de ratos. Além disso, a PH-RP produziu o mesmo perfil de respostas pressoras a infusão IO de NaCl 0,3 M e água destilada em comparação a condição hidratada, tanto em animais normotensos quanto em SHRs. Entretanto, o efeito pressor foi maior em SHRs do que em normotensos, independentemente das condições do balanço hidroeletrólítico.

No teste do labirinto em cruz elevado (LCE) e o campo aberto (CA), os SHRs apresentam maior permanência nos braços abertos e um aumento na atividade locomotora central, bem como o número de entradas e tempo gasto no centro do aparato do campo aberto, sugerindo um padrão de comportamento do tipo menos ansioso que os ratos normotensos. A PH-RP não produziu nenhuma alteração em comparação ao respectivo basal no comportamento semelhante à ansiedade de animais normotensos e SHRs. Entretanto, após o período correspondente ao teste do apetite ao NaCl foi observado um aumento na atividade locomotora total, bem como na velocidade média percorrida em ratos normotensos. Em SHRs, após o término do apetite ao sódio, foi observado uma diminuição significativa no tempo gasto nos braços abertos do LCE, diminuição na atividade locomotora periférica, central, número de entradas e permanência no centro do aparato do CA, além de um aumento no tempo gasto na periferia, quando comparado a sua condição basal (hidratado).

Em suma, os resultados mostram que ratos SHRs apresentam um intenso apetite e palatabilidade ao NaCl independente das condições do balanço hidroeletrólítico e, parte desse efeito, é devido ativação de receptores angiotensinérgicos AT1 centrais. Assim como para o gosto salgado, SHRs tem um aumento nas respostas hedônicas para sacarose, e um aumento no número de respostas aversivas para o gosto amargo. Esses resultados sugerem que as recompensas ao gosto não correspondem a uma diminuição da palatabilidade a um gosto típico aversivo. O protocolo de PH-RP não alterou o comportamento relacionado à ansiedade e atividade locomotora em ratos normotensos e SHRs. Os presentes resultados também sugerem que o componente afetivo do paladar induz respostas cardiovasculares mediadas pelo sistema nervoso simpático.

Palavras-chave: sódio, palatabilidade, hipertensão, desidratação.

ABSTRACT

Excess ingested NaCl can facilitate the onset and development of chronic diseases, including hypertension. The increase in salt palatability is usually the reason for excessive consumption of NaCl. Spontaneously hypertensive rats (SHRs), an animal model for the study of primary hypertension, ingest a greater amount of sodium when compared to normotensive strains. However, it was still unknown whether the increased preference for NaCl observed in SHRs would be related to changes in palatability to this ion. Considering that SHRs might have increased NaCl palatability, it would be important to investigate whether this effect would be specific for salty taste. Furthermore, there was no information in the literature whether gustatory stimulation could induce cardiovascular autonomic responses, as well as whether episodes of dehydration could alter the palatability profile and anxiety-like behavior and locomotor activity in SHRs.

Therefore, the objectives of the present study were to investigate the: a) palatability to 0.3 M NaCl; b) sweet and bitter taste palatability profile; c) autonomic responses induced by gustatory stimulation; d) anxiety-like behavior and locomotor activity, in normotensive rats and SHRs under basal conditions and after a cycle of water deprivation and partial rehydration (WD-PR). Thus, SHRs and Holtzman normotensive rats were submitted to surgical procedures to implant of: a) an intraoral (IO) cannula, for taste reactivity test (TRT); femoral artery cannula, for mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) recordings; c) intracerebroventricular cannula, for central administration into the lateral ventricle (LV).

Intraoral (IO) infusion of 0.3 M NaCl produced a greater number of hedonic responses with no difference in the number of aversive responses in SHRs when compared with normotensive rats. Central blockade of AT1 angiotensinergic receptors (adrenergic receptor antagonist, losartan 100 ng/1 μ l i.c.v.) abolished the ingestion of 0.3 M NaCl induced by the (WD-PR) protocol, while it reduced, only transiently (first 30 minutes of the 60-minute test) the number of hedonic responses to salty taste, with no changes in aversive responses. Losartana i.c.v. also reduced, only transiently (first 30 minutes), the number of hedonic responses to salty taste in euhydrated SHRs. Just like the salty taste, SHRs showed a similar number of hedonic responses to 2% sucrose IO and a similar number of aversive responses to quinine IO, either after WD-PR or in the euhydrated condition. Furthermore, these hedonic and aversive responses were greater when compared to normotensive rats.

The IO infusion of the different tastes produced an increase in MAP and an increase in HR for 2% sucrose, 0.5M NaCl and quinine in normotensive rats and quinine for SHRs, this pressor effect was greater in SHRs, for all tastes. The administration of prazosin

(1 mg/ml/kg i.v.) abolished the pressor effect induced by the IO infusion of all solutions tested, in both strains of rats. Furthermore, WD-PR produced the same profile of pressor responses to IO infusion of 0.3 M NaCl and distilled water compared to the euhydrated condition, both in normotensive animals and in SHRs. However, the pressor effect was greater in SHRs than in normotensives, regardless of the conditions of fluid and electrolyte balance.

In the elevated plus maze (EPM) and open field (OF) test, SHRs show longer stay in the open arms and an increase in central locomotor activity, as well as the number of entries and time spent in the center of the open field apparatus, suggesting a less anxious pattern of behavior than normotensive rats. WD-PR produced no change compared to the respective baseline in anxiety-like behavior of normotensive animals and SHRs. However, after the period corresponding to the sodium appetite test, an increase in total locomotor activity was observed, as well as in the average speed covered in normotensive rats. In SHRs, after the end of sodium appetite, a significant decrease was observed in the time spent in the open arms of the EPM, a decrease in peripheral and central locomotor activity, number of entries and permanence in the center of the OF apparatus, in addition to an increase in the time spent on the periphery, when compared to your baseline condition (euhydrated).

In summary, the results show that SHRs rats have an intense appetite and palatability to NaCl regardless of the conditions of the hydroelectrolyte balance, and part of this effect is due to the activation of central AT1 angiotensinergic receptors. As with salty taste, SHRs have an increase in hedonic responses to sucrose, and an increase in the number of aversive responses to bitter taste. This suggests that the enhanced response of SHRs to taste rewards does not correspond to a decreased response to a typical aversive taste. The WD-PR protocol did not alter anxiety-related behavior and locomotor activity in normotensive rats and SHRs. The present results also suggest that the affective component of taste induces cardiovascular responses mediated by the sympathetic nervous system.

Key words: sodium, palatability, hypertension, dehydration.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: PAM e FC em SHR s e ratos normotensos antes e após tratamento com Furosemida + Captopril (FURO + CAP s.c.)	46
Tabela 1.2: Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em SHR s hidratados tratados com salina ou losartana i.c.v.....	52
Tabela 1.3: Alterações na PAM e FC em SHR s após injeções i.c.v. de salina ou losartana, na condição hidratados e após privação hídrica – reidratação parcial.....	54
Tabela 4.1: Linhagens e condições experimentais do teste de LCE e CA	111
Tabela 4.2: Análise estatística dos resultados dos testes de LCE	113
Tabela 4.3: Análise estatística dos resultados dos testes de CA	118
Tabela 4.4: Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos SHR s e normotensos submetidos ao protocolo de PH-RP (ml/100 g pc)	120
Tabela 4.5: Peso corporal (g) de SHR s e ratos normotensos	120

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.1:** Número de respostas **A)** hedônicas e **B)** aversivas para infusão IO de NaCl 0,3 M antes e após 60 min do protocolo de furosemida + captopril (FURO + CAP) e nos tempos 30 e 60 min após livre acesso à água e NaCl 0,3 M em ratos normotensos e SHRs tratados com FURO + CAP s.c. Valores são representados como média \pm EPM \circ e \blacktriangle , valores individuais para ratos normotensos e SHRs respectivamente. N = número de ratos 43
- Figura 1.2:** Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0.3 M e **B)** água (ml/100 g p.c.) de ratos normotensos e SHRs que passaram pelo teste de reatividade gustatória para NaCl 0,3 M após tratamento com furosemida + captopril (FURO + CAP). Valores são representados como média \pm EPM. N = número de ratos 44
- Figura 1.3:** Número de respostas **A)** hedônicas e **B)** e aversivas para infusão intraoral ao NaCl 0,3 M antes (0 min) e após 30 e 60 min de livre acesso ao NaCl 0,3 M e água em SHRs tratados com salina ou losartana i.c.v. (100 ng/1 μ l) após privação hídrica- reidratação parcial. Valores são representados como média \pm EPM; \circ e \blacktriangle , dado individual para salina e losartana i.c.v., respectivamente. N = número de ratos 48
- Figura 1.4:** Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0.3 M e **B)** água (ml/100 g p.c.) durante o teste da ingestão de sódio com salina ou losartana i.c.v. (100 ng/1 μ l) em ratos que passaram pelo teste de reatividade gustatória para NaCl 0,3 M após privação hídrica – reidratação parcial. Valores são representados como média \pm EPM. N = número de ratos 49
- Figura 1.5:** Número de respostas **A)** hedônicas e **B)** aversivas para infusão IO de NaCl 0,3 M na condição hidratado em SHRs após tratamento i.c.v. de losartana (100 ng/1 μ l) ou salina com livre acesso à água e NaCl. Valores são representados como média \pm EPM; \circ e \blacktriangle , dado individual para salina e losartana i.c.v., respectivamente. N = número de ratos 51
- Figura 2.1:** Ingestão cumulativa de **A)** NaCl 0.3 M e **B)** água durante o teste de apetite ao sódio em ratos normotensos e SHRs após 24 h de privação hídrica – reidratação parcial. Valores são representados como média \pm EPM. N = número de ratos 69
- Figura 2.2:** Número de respostas **A)** hedônicas e **B)** aversivas para infusão IO de sacarose 2% na condição hidratado, antes (0 min) e ao final do teste do apetite ao sódio em ratos normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de 24 h de privação hídrica – reidratação parcial (PH-RP). Valores são representados como média \pm EPM. N = número de ratos..... 71
- Figura 2.3:** Número de respostas **A)** hedônicas e **B)** aversivas para infusão IO de sulfato de quinina 1,4 mM, na condição hidratado, antes (0 min) e ao final do teste do apetite ao sódio em ratos normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de 24 h de privação hídrica – reidratação parcial (PH-RP). Valores são representados como média \pm EPM. N = número de ratos 73
- Figura 2.4:** Número de respostas **A)** hedônicas e **B)** aversivas para infusão IO de NaCl 0,3 M na condição hidratado, antes (0 min) e ao final do teste do apetite ao sódio em ratos normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de 24 h de privação hídrica – reidratação parcial (PH-RP). Valores são representados como média \pm EPM. N = número de ratos..... 75
- Figura 2.5:** Número de respostas **A)** hedônicas e **B)** aversivas para infusão IO de NaCl 0,5 M na condição hidratado, antes (0 min) e ao final do teste do apetite ao sódio em ratos

normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de 24 h de privação hídrica – reidratação parcial (PH-RP). Valores são representados como média \pm EPM. N = número de ratos..... 77

Figura 2.6: Número de respostas **A)** hedônicas e **B)** aversivas para infusão IO de água destilada na condição hidratado, antes (0 min) e ao final do teste do apetite ao em ratos normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de 24 h de privação hídrica – reidratação parcial (PH-RP). Valores são representados como média \pm EPM. N = número de ratos..... 79

Figura 3.1: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de sacarose 2% após injeções de prazosina (1 mg/kg, i.v.). Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo..... 94

Figura 3.2: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de sulfato de quinina 1,4 mM após injeções de prazosina (1 mg/kg, i.v.) Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo..... 95

Figura 3.3: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de NaCl 0,3 M após injeções de prazosina (1 mg/kg, i.v.). Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo..... 96

Figura 3.4: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de NaCl 0,5 M após injeções de prazosina (1 mg/kg, i.v.). Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo..... 97

Figura 3.5: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de água destilada após injeções de prazosina (1 mg/kg, i.v.). Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo..... 98

Figura 3.6: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante protocolo de PH-RP. Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo..... 100

Figura 3.7: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de NaCl 0,3 M em diferentes condições do balanço hidromineral. Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo..... 101

Figura 3.8: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de água destilada em diferentes condições do balanço hidromineral. Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo..... 102

Figura 4.1: Comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado em ratos normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de PH-RP. **A)**, número de entradas nos braços fechados. **B)**, percentual do número entradas nos braços abertos. **C)**, percentual do tempo gasto nos braços abertos. **D)**, tempo gasto no centro. As barras representam a média \pm EPM, N = número de animais por grupo..... 114

Figura 4.2: Atividade locomotora e comportamentos relacionados à ansiedade no campo aberto em ratos normotensos e SHRs, submetidos ao protocolo de PH-RP. **A)**, atividade locomotora total (metros); **B)**, atividade locomotora na periferia do aparato (metros); **C)**, atividade locomotora no centro do aparato (metros); **D)**, tempo gasto no centro do aparato (segundos); **E)**, tempo gasto na periferia (segundos); **F)**, número de entradas no centro; **G)**,

velocidade média percorrida (metros por segundo). As barras representam a média \pm EPM, N = número de animais por grupo 117

Figura 5.1: Expressão de RNA Giot1 no SON por meio da hibridização in situ RNA *Scope* em combinação com RNAm de AVP e RNAm de OXT para marcação de neurônios magnocelulares AVP e OXT nas condições **A)** Hidratados, **B)**, após 72 h de privação hídrica (PH), **C)**, após 72 h de privação hídrica seguido por 4 h de reidratação (R 4 h), **D)**, após 72 h de privação hídrica seguido por 8 h de reidratação (R 8 h), **E)** após 72 h de privação hídrica seguido por 24 h de reidratação (RH 24 h), DAPI: azul, AVP: vermelho, OT: verde, Giot1: branco..... 130

Figura 5.2. Gráficos mostrando expressão gênica de RNA Giot1 em ratos hidratados e após 72 h de privação hídrica (PH) no **A)** citoplasma de neurônios AVP, **B)** expressão de RNA Giot1 no núcleo de neurônios AVP, **C)** expressão de RNA Giot1 no citoplasma de neurônios OT, **D)** expressão de RNA Giot1 no núcleo de neurônios OT, **E)** expressão de RNA Giot1 no citoplasma de neurônios AVP vs. neurônios OT na condição hidratado, **F)** expressão de RNA Giot1 no citoplasma de neurônios AVP vs. neurônios OT no grupo PH, **G)** expressão de RNA Giot1 no núcleo de neurônios AVP vs. neurônios OT na condição hidratados, **H)** expressão de RNA Giot1 no núcleo de neurônios AVP vs. neurônios OT no grupo PH, **I)** expressão de RNA Giot1 no núcleo vs. citoplasma de neurônios AVP em ratos hidratados e PH e **J)** expressão de RNA Giot1 no núcleo vs. citoplasma de neurônios OT em ratos hidratados e PH. Barra de escalas representa 10 μ m. Foram utilizados número de 5 amostras por grupo. Valores são representados como média \pm EPM, sendo considerado $p < 0,05$ 131

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANG I – angiotensina I
ANG II – angiotensina II
ANOVA – análise de variância
ANP – peptídeo natriurético atrial
AP – área postrema
AT1 – receptor de angiotensina do subtipo AT1
AVP - vasopressina
AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo
BPM – batimentos por minuto
ECA – enzima conversora de angiotensina
EPM – erro padrão da média
FC – frequência cardíaca
g – grama(s)
h – hora(s)
HTZ – Holtzman
i.c.v. – intracerebroventricular
IO – intraoral
kg – quilograma(s)
M – molar (número de mols/litro)
mg – miligrama(s)
min – minutos
ml – mililitro(s)
mmHg – milímetros de mercúrio
m/s – metros por segundo
MnPO – núcleo pré-óptico mediano
mOsm – miliosmol(es)
NaCl – cloreto de sódio
ng – nanograma (s)
NMC – neurônios magnocelulares
NPBL – núcleo parabraquial lateral
NPV – núcleo paraventricular
SON – núcleo supra-óptico

NTS – núcleo do trato solitário
OCVs – órgãos circumventriculares
OSF – órgão subfornical
OT – ocitocina
OVLT – órgão vascular da lâmina terminal
OVX – ovariectomia
P.C. – peso corporal
PAM – pressão arterial média
Pg – picograma(s)
PH – privação hídrica
PVN – núcleo paraventricular
RP – reidratação parcial
s - segundos
s.c. – subcutâneo/subcutaneamente
SHRs – ratos espontaneamente hipertensos
SNC – sistema nervoso central
SON – núcleo supraóptico
TRG – teste de reatividade gustatória
VEI – veículo
VL – ventrículo lateral
 μg – micrograma(s)
 μl – microlitro(s)
 μm – micrometro (s)

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	17
PROPOSIÇÃO	30
CAPÍTULOS	
1. Palatabilidade ao sódio em ratos espontaneamente hipertensos.....	31
2. Perfil de palatabilidade em ratos espontaneamente hipertensos submetidos ao protocolo de privação hídrica – reidratação parcial.	61
3. Alterações na pressão arterial induzidas por estímulos gustatórios em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos.....	85
4. Desidratação e comportamento semelhante à ansiedade em ratos normotensos e espontaneamente hipertensos	106
5. Padrão de expressão de RNA hipotalâmico não codificante induzido por desidratação em neurônios do núcleo supra-óptico.....	124
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	135
BIBLIOGRAFIA	140
APÊNDICE	155

Introdução

INTRODUÇÃO

A água compõe cerca de 60% do corpo de um indivíduo adulto. O total de água está distribuído entre os compartimentos intracelular e o extracelular. Um terço desta água corpórea se localiza no líquido extracelular (LEC) e os outros dois terços restantes no líquido intracelular (LIC). A composição iônica nos compartimentos celulares são as mesmas, contudo a concentração de cada íon é diferente. O íon sódio está em maior concentração no LCE, numa variação em torno de 138 a 146 mmol/l, o que contribui amplamente para determinação da osmolaridade do LEC (GUYTON; HALL, 2000; VERBALIS, 2003). As concentrações de sódio e de outros eletrólitos nos líquidos corporais são determinadas pela diferença entre os ganhos e as perdas destes solutos, bem como pelos ganhos e perdas de água (MCKINLEY; JOHNSON, 2004).

A todo o momento o equilíbrio hidroeletrólítico sofre perturbações por alterações na concentração de solutos, falta ou excesso de consumo de líquidos e eletrólitos ou perdas, decorrentes de diversos fatores como diarreias, hemorragias ou sudorese excessiva. Essas alterações de volume e osmolaridade são detectadas por receptores específicos, e cuja ativação irá desencadear respostas neuroendócrinas a fim de restabelecer o equilíbrio hidromineral. (JOHNSON; EDWARDS, 1990; MCKINLEY; JOHNSON, 2004; MENANI; DE LUCA; JOHNSON, 2014).

Barorreceptores, que inervam a parede vascular, e osmorreceptores presentes no trato gastrointestinal e encéfalo, monitoram respectivamente volume e osmolaridade. Sabe-se que aumentos da pressão arterial (detectadas por barorreceptores) constituem um importante estímulo inibitório para a ingestão de sódio. Por outro lado, a ativação de osmorreceptores, por alterações de osmolaridade estimulam a ingestão de água (FITZSIMONS, 1985).

O sistema renal possui um importante mecanismo que contribui para o reestabelecimento do balanço hidroeletrólítico, através da regulação da reabsorção de água e sódio. Entretanto, somente esta resposta fisiológica, muitas vezes não é suficiente para o restabelecimento total, o que se torna necessária à promoção de estados motivados, por exemplo, sede e apetite ao sódio, que impulsionarão os animais à busca, aquisição e ingestão de água e sódio, respectivamente. Esses comportamentos são essenciais para o restabelecimento do equilíbrio hidroeletrólítico (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2012).

Ao longo da evolução, a desidratação tem sido considerada uma das mais frequentes ameaças à vida e assim constitui-se um desafio potencial para o organismo; e este por sua vez dispõe de mecanismos comportamentais, humorais e neurais para promover ajustes na

ingestão e excreção de água e sódio permitindo assim restabelecer o equilíbrio hidroeletrolítico (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2012).

Desidratação intracelular ou hiperosmótica

A redução do volume do líquido celular é característica da desidratação celular. Quando a concentração extracelular de sódio aumenta, há um aumento na pressão osmótica efetiva do compartimento extracelular, promovendo uma redução do volume de água das células, caracterizando assim a “desidratação intracelular” (DE LUCA JR; VIVAS; MENANI, 2005; JOHNSON, 2007). Casos de hiperosmolaridade plasmática são ocasionados principalmente pela deficiência de água no LEC, provavelmente pela ingestão insuficiente de água ou excreção excessiva dela, ou ainda a ingestão de alimentos ou líquidos excessivamente salgados, causando uma diminuição da água corporal total comparada aos solutos. Um pequeno aumento de 1 – 2% na pressão osmótica efetiva do plasma resulta na estimulação da sede em mamíferos. O aumento da osmolaridade plasmática é detectado por osmorreceptores que detectam alterações na concentração de sódio e da osmolaridade do LEC. Os osmorreceptores estão localizados nos órgãos circumventriculares (OCVs), na parede ântero-ventral do terceiro ventrículo (AV3V) e na área postrema (AP). Sua frequência de disparos aumenta em resposta ao aumento da osmolaridade e diminui quando ocorre o contrário. As informações dos osmorreceptores ativam áreas do SNC envolvidas no controle hidroeletrolítico (MCKINLEY et al., 2003), que em resposta ativam o mecanismo da sede e leva a secreção do hormônio vasopressina (AVP), também denominado como hormônio antidiurético.

A síntese e secreção do hormônio vasopressina (AVP) são reguladas centralmente pelo sistema hipotálamo-neurohipofisário. Esse sistema consiste nos grandes neurônios peptidérgicos magnocelulares (NMC) dos núcleos hipotalâmicos supra-ópticos (SON) e núcleos paraventricular (PVN), cujos axônios se projetam para a eminência mediana e terminam em capilares sanguíneos da glândula hipófise posterior. Os aumentos de osmolaridade plasmática detectados pelos neurônios osmossensíveis localizados nos órgãos circumventriculares é que fornecem entradas excitatórias diretas que levam ao aumento da síntese AVP por neurônios magnocelulares do SON e PVN, bem como a secreção de AVP da hipófise posterior (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; ANTUNES-RODRIGUES et al., 2014).

Os hormônios peptídeo natriurético atrial (ANP) e a ocitocina (OT) são secretados na circulação sanguínea durante expansão de volume e/ou aumento de osmolaridade

plasmática, e ambos têm ação natriurética. Isto é, eles atuam reduzindo a volemia e a concentração de sódio, ações contrárias às da ANG II e aldosterona. O ANP, um peptídeo sintetizado pelos miócitos atriais, participa da manutenção do volume por produzir diurese e natriurese. Além de agir centralmente inibindo a sede e o apetite ao sódio. A OT é sintetizada no corpo celular de neurônios magnocelulares do PVN e do SON e liberada para a corrente sanguínea em situações de hiperosmolaridade e possui ações semelhantes ao ANP (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2014).

Desidratação extracelular ou hipovolêmica

Outro tipo de desidratação é a dita extracelular ou hipovolêmica. Ela ocorre em situações como diarreia, vômito e exercício extenuante sem correta reposição iônica e surge como consequência de uma redução do volume do LEC acompanhada ou não por uma pequena diminuição na concentração do íon sódio (DE LUCA JR; VIVAS; MENANI, 2005; JOHNSON, 2007). Experimentalmente, esse tipo de desidratação pode ser induzido pelo protocolo de depleção de sódio 24 h. Neste protocolo é utilizado o diurético furosemida que age na alça de Henle inibindo o co-transporte de íons $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ combinado a período de 24 horas de acesso a dieta deficiente em sódio e água a vontade (SAKAI et al., 1987; ROWLAND; MORIAN, 1999).

Alterações de pressão e volume sanguíneos são detectadas por receptores localizados no arco aórtico e seio carotídeo (barorreceptores) e nas paredes de grandes veias e dos átrios (receptores de volume). Sinais aferentes de barorreceptores e receptores cardiopulmonares chegam ao tronco encefálico via nervos cranianos IX e X, sendo que a maioria dessas terminações nervosas fazem sua primeira sinapse no núcleo do trato solitário (NTS) (JOHNSON; THUNHORST, 2007). O menor estiramento do barorreceptores em função da hipovolemia resulta no aumento da atividade simpática o que leva ao aumento da liberação de renina e na estimulação da liberação de AVP (EPSTEIN, 1991; JOHNSON, 2007; DE LUCA; MENANI; JOHNSON, 2014). O SRAA é ativado em situações de hipovolemia levando a formação de ANG II, conforme descrito a seguir.

O sistema renina-angiotensina aldosterona (SRAA) é um sistema bioquímico em cascata cujo eixo é formado por uma enzima proteolítica, a renina, e um octapeptídeo, a angiotensina II (ANG II). Ele é um importante sistema hormonal ativado em resposta a uma queda na pressão arterial ou na concentração de sódio dos líquidos corporais. A molécula precursora da angiotensina é o angiotensinogênio, uma globulina produzida pelo fígado. O angiotensinogênio é clivado pela renina, uma enzima proteolítica sintetizada e armazenada

pelas células justaglomerulares dos rins, produzindo a angiotensina I (ANG I). A ANG I sob a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) localizada especialmente nos pulmões, sendo também encontrada nos rins e nas células endoteliais do sistema vascular sistêmico, produz um octapeptídeo ativo, denominado angiotensina II (ANG II). Estudos clássicos de Fitzsimons realizados na década de 1960 foram os primeiros a demonstrar que a ANG II é um hormônio dipsogênico, além de vasoconstritor e ativador da secreção de aldosterona e vasopressina (FITZSIMONS, J. T., 1998).

O receptor de angiotensina tipo 1 (AT₁R) exerce um papel fundamental na regulação da pressão arterial e controle hidromineral. Agindo em receptores AT₁R em áreas prosencefálicas, a ANG II estimula a ingestão de água e sódio, a secreção de vasopressina e atividade simpática (FITZSIMONS, J T, 1998). As áreas mais sensíveis à ANG II são o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e órgão subfornical (OSF) presentes na lâmina terminal (LT). Estas duas áreas têm projeções para o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), que integra as informações provenientes da LT para áreas integradoras que modularão os comportamentos de sede e apetite ao sódio (JOHNSON; THUNHORST, 2007). Após sua ligação com ANG II, o AT₁R medeia a transdução do sinal por meio de múltiplas vias, incluindo a fosfolipase C (PLC) – inusitol 1,4,5-trifosfato (IP) (RHEE; CHOI, 1992) e proteínas quinases reguladas por sinais extracelulares 1 e 2 (Erk 1/2) (INAGAMI et al., 1999). Daniels e colaboradores demonstraram que a habilidade da ANG II em estimular a ingestão de água pode ser seletivamente bloqueada por inibidores da atividade da PKC, enquanto que a ingestão de sódio estimulada pela ANG II é dependente da ativação de proteínas quinases 1 e 2 (Erk 1/2), (DANIELS et al., 2005; DANIELS; YEE; FLUHARTY, 2007; DANIELS et al., 2009). Além dos efeitos fisiológicos essenciais promovidos pela ação do ANG II nos receptores AT₁, a super ativação sustentada do SRAA poderia levar à hipertensão (NAKAGAWA et al., 2020).

A aldosterona, um mineralocorticoide, também tem papel fundamental na conservação do sódio no organismo e é o sinal endócrino final do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A secreção de aldosterona pela zona fasciculada da adrenal é regulada pela ANG II e concentração extracelular de potássio. A aldosterona atua nos ductos coletores renais e cólon para regular a (re)absorção de sódio e secreção de potássio (BOOTH; JOHNSON; STOCKAND, 2002).

Privação hídrica e reidratação parcial

A desidratação dupla, também conhecida como absoluta, ocorre quando há a perda de água de ambos os compartimentos intra e extracelular. Um dos métodos utilizados para produzir desidratação dupla experimentalmente é a privação de água por 24 h ou por 36 h (DE LUCA et al., 2002; VENDRAMINI et al., 2009; DE LUCA et al., 2010). A desidratação dupla produz forte estímulo de sede para a correção da desidratação extracelular. Entretanto, somente a ingestão de água não é suficiente para o reestabelecimento do equilíbrio eletrolítico, pois o animal se mantém hipovolêmico e com o balanço de sódio negativo. Assim, o apetite ao sódio também está presente neste tipo de protocolo (DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010).

O modelo de privação hídrica com reidratação parcial com água por 2 horas (PH-RP) fornece subsídios para o estudo da sede e apetite ao sódio, separadamente. Ao final do período de 24 h de privação hídrica observa-se aumento da osmolaridade e sódio plasmáticos, hipovolemia e aumento da atividade de renina plasmática. O período de reidratação parcial (2 horas de acesso apenas à água) corrige totalmente o aumento da osmolaridade plasmática e parcialmente a hipovolemia, enquanto o aumento da atividade de renina plasmática permanece elevado até o início do teste do apetite ao sódio (DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010). Após o período de reidratação parcial o animal passa a ter também livre acesso ao NaCl 0,3 M por mais 2 horas (teste do apetite ao sódio). No momento em que o animal tem acesso a solução de sódio, estão presentes a hipovolemia e aumento de angiotensina II como sinais facilitadores para o apetite ao sódio, enquanto o sinal inibitório da hipertonicidade para a ingestão de sódio já foi removido. A subsequente ingestão de sódio corrige totalmente o volume do líquido extracelular e a perda de sódio que ocorreu pela natriurese durante o período de privação hídrica (DE LUCA et al., 2002).

Sede e apetite ao sódio

A ingestão de água e sódio que ocorrem em resposta à desidratação constituem dois exemplos de comportamentos motivados. Comportamentos motivados dependem do estado interno do animal, são dirigidos por um objetivo específico e podem ser acompanhados de respostas autonômicas. As motivações para ingestão de água e sódio são conhecidas como sede e apetite ao sódio (EPSTEIN, 1982; BERRIDGE, 2004).

O apetite ao sódio tem papel essencial na busca, aquisição e ingestão do íon sódio e na manutenção do equilíbrio em função de perdas do íon sódio e no volume do LEC. Ele pode ser definido como um estado motivado comportamental e inato (EPSTEIN;

STELLAR, 1955), isto é, não necessita de aprendizado para ocorrer, mas pode ser adaptativo, pela influência do aprendizado, do meio em que está inserido, como também do estado emocional (DENTON et al., 1982; SCHULKIN, 1991).

Como explicado até aqui, a aquisição e ingestão de água e de substâncias salgadas são respostas comportamentais necessárias para que um animal se recupere de déficits de fluidos corporais. Por outro lado, vários estudos correlacionam o consumo excessivo de sal ao desenvolvimento ou agravamento de doenças crônicas, incluindo a hipertensão, (HE; MACGREGOR, 2012; WHO, 2012). Apesar da recomendação para reduzir a ingestão de sódio na dieta, a população adulta ainda tem um alto consumo estimado de sal (MILL et al., 2019). Estima-se que a quantidade média diária de sódio consumida pela população brasileira adulta é de 4,5 g por pessoa, independente da região ou classe de renda, excedendo assim em mais de duas vezes o limite recomendado pela OMS para ingestão desse nutriente (SARNO et al., 2013). Os fatores responsáveis por isso não são bem compreendidos. No entanto, a alteração na palatabilidade dos alimentos é uma possível causa da baixa adesão à restrição de sal por pacientes hipertensos (SAKAKI; TSUCHIHASHI; ARAKAWA, 2014; OHTA et al., 2015).

Palatabilidade ao sódio

As propriedades de recompensa de um sabor (palatabilidade) manifestam-se através de padrões fixos de expressão facial em resposta à aplicação direta de uma substância na cavidade oral. Tais padrões constituem respostas motoras somáticas orofaciais inatas, ingestivas (hedônicas ou positivas) ou aversivas (negativas), a um sabor ou gosto de uma solução infundida intraoralmente. Em humanos, essas expressões podem ser produzidas logo após o nascimento antes mesmo de qualquer experiência de estímulo de sabores na cavidade oral tenha ocorrido (em outras palavras, antes do recém-nascido ter recebido qualquer líquido para ingestão) (STEINER, 1973; 1974; 1979). Essas expressões faciais estereotipadas em resposta a diferentes sabores aplicados diretamente na cavidade oral são, portanto, consideradas inatas, implicando que os circuitos para a detecção do sabor são determinados durante o desenvolvimento (STEINER, 1973; 1974; 1979; BERRIDGE, 2000).

Tais propriedades podem ser registradas e quantificadas pelo teste de reatividade gustatória (GRILL; NORGREN, 1978). Este teste determina a frequência de respostas faciais hedônicas e aversivas, típicas de espécies, à estimulação intraoral (por exemplo, protrusões da língua relacionadas à ingestão de alimentos e abertura aversiva da boca como

rejeição no rato), fornecendo uma medida de palatabilidade (BERRIDGE, 2000; BERRIDGE; KRINGELBACH, 2008; 2015).

Sob condições controles, as linhagens mais comuns de rato de laboratório (TORDOFF; ALARCON; LAWLER, 2008) preferem ingerir soluções de concentrações próximas a isotônica e evitam soluções de sódio hipertônico. Animais saciados e normovolêmicos exibem uma mistura de comportamentos hedônicos e aversivos em resposta a infusão intraoral de NaCl 0,5 M, enquanto que após 24 h de depleção de sódio (induzida pelo tratamento com furosemida associado a dieta deficiente de sódio por 24 h) ocorre uma mudança desse perfil, aumentando o número de respostas hedônicas e reduzindo as respostas aversivas ao sódio hipertônico infundido oralmente (BERRIDGE et al., 1984; GRILL; BERNSTEIN, 1988).

O antagonismo farmacológico do sistema renina-angiotensina alterou o padrão de respostas orofaciais ao sabor NaCl 0,3 M, infundido intraoralmente em ratos com apetite ao sódio. A alteração correspondeu à redução no número de respostas hedônicas e aumento no número de respostas aversivas à infusão de NaCl 0,3 M (ZENATTI et al., 2021). Os resultados sugerem que a ANG II atua no cérebro aumentando a palatabilidade ao sódio hipertônico durante a fase consumatória do apetite ao sódio (ZENATTI et al., 2021).

Os estrógenos têm uma profunda influência no equilíbrio hidromineral e nos parâmetros cardiovasculares (HAY; XUE; JOHNSON, 2014; VIVAS et al., 2014). Recentemente, mostramos que os hormônios ovarianos restringem o apetite ao sódio (induzido pela privação da água seguida imediatamente pela reidratação parcial pela água potável até a saciedade), reduzindo as propriedades hedônicas do sabor do sódio, e que os estrogênios mediam essa redução, particularmente em fêmeas da linhagem de ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) (PEREIRA et al., 2019).

Modelo animal de hipertensão essencial

A hipertensão arterial (HA) é uma condição clínica multifatorial caracterizada pelo aumento crônico e sustentado dos níveis de pressão arterial (PA). Em um indivíduo adulto, a PA é considerada normal nos valores de 120 mmHg de pressão sistólica e 80 mmHg de pressão diastólica. Entretanto, quando a pressão sistólica se encontra igual ou acima de 140 mmHg e/ou a pressão diastólica está igual ou acima de 90 mmHg a PA é considerada elevada, de acordo com as Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020 (Barroso et al., 2021).

A HA pode ser classificada como hipertensão primária/essencial ou secundária. A hipertensão primária é caracterizada quando não se conhece as causas às quais se origina (p. ex. hipertensão neurogênica). Este tipo de hipertensão ocorre em torno de 95% dos casos diagnosticados. Já a hipertensão secundária caracteriza-se quando se conhece as causas, como por exemplo, o estreitamento das artérias renais (p. ex. hipertensão renovascular), doença renal parenquimatosa, hipertensão gestacional etc. Este tipo de hipertensão ocorre em torno de 5% dos casos diagnosticados (LUIZ; DA SILVA, 2006; SALGADO et al., 2001). A hipertensão neurogênica ocorre por desordens no sistema nervoso central (SNC) que acarretam forte estimulação do sistema nervoso simpático.

O modelo genético de ratos espontaneamente hipertensos (SHR) é amplamente estudado na pesquisa experimental por apresentarem grandes similaridades com a hipertensão essencial em humanos. Os SHRs foram desenvolvidos por Okamoto e Aoki em 1963, e representam um dos modelos animais de hipertensão mais estudados na pesquisa (OKAMOTO; AOKI, 1963). Em SHRs, a pressão arterial começa a aumentar poucas semanas após o nascimento e atinge os níveis hipertensivos após 12 a 14 semanas, principalmente devido a aumentos da atividade simpática e angiotensinérgica e ao envolvimento de mecanismos centrais (HAEUSLER; FINCH; THOENEN, 1972 ; MORI, 1973; JUDY et al., 1976; BRODY; O'NEILL; PORTER, 1984). Além dos elevados níveis de pressão arterial, SHRs apresentam uma ingestão diária de NaCl maior do que as outras linhagens de ratos normotensas [vide Refs. (ELY; TURNER; MILSTED, 2000; DI NICOLANTONIO, 2004) para revisão]. A presença de mecanismos centrais para o desenvolvimento e manutenção da hipertensão em SHRs foi descrita para o tronco encefálico, particularmente no NTS comissural e AP, (MANGIAPANE et al., 1989; AKEMI SATO et al., 2001; SATO; COLOMBARI; MORRISON, 2002; SATO et al., 2003). Estudo de Moreira e cols. (2009) demonstrou que lesões simultâneas da região AV3V e NTS comissural produzem uma redução duradoura da pressão arterial (pelo menos 40 dias) em SHRs adultos, sugerindo que mecanismos prosencefálicos e do tronco encefálico, particularmente os relacionados com a região AV3V e NTS comissural, agem para manter a hipertensão em SHRs (MOREIRA et al., 2009).

O intenso apetite ao sódio observado em SHRs baseia-se em uma hiperatividade do sistema renina-angiotensina central mais do que uma alteração do equilíbrio hidroeletrólítico (DINICOLANTONIO; HUTCHINSON; MENDELSON, 1982; DI NICOLANTONIO, 2004), e o bloqueio da produção central de angiotensina reduz a ingestão de sódio em SHRs, (DINICOLANTONIO; HUTCHINSON; MENDELSON, 1982). Os SHRs também

apresentam maior imunorreatividade à proteína Fos na lâmina terminal em resposta tanto a infusão central ou sistêmica de ANG II (ROWLAND et al., 1995; BLUME et al., 1997). Resultados de Pereira-Derderian e cols (2010) mostram que em resposta ao teste do apetite ao sódio induzido pelo protocolo de privação hídrica com reidratação parcial, os SHRs ingeriram cerca de 10 vezes mais do que os ratos normotensos e apresentaram um padrão diferenciado de imunorreatividade da proteína Fos em algumas áreas encefálicas que controlam o apetite ao sódio (SFO, OVLT, MnPO, NTS_c) do que em comparação as linhagens de ratos normotensas Wistar Kyoto (WKY) ou Holtzman (HTZ). Todavia, os SHRs apresentaram um maior aumento na imunorreatividade da proteína Fos em áreas como órgão subfornical (SFO), região comissural núcleo do trato solitário (NTS_c) e pré *locus coeruleus* (pré-LC) em comparação as linhagens de ratos normotensos, (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010).

Apesar da responsividade periférica ao sabor salgado ser semelhante nos animais normotensos Wistar-Kyoto e SHRs (FORMAKER; HILL, 1990; 1991), os SHRs são menos responsivos à retroalimentação negativa das informações pós ingestivas (FLYNN; CULVER; NEWTON, 2003), o que pode influenciar pelas propriedades sensoriais orais do sabor. No entanto, até então ainda não se sabia se este modelo animal de hipertensão essencial teria aumentado a palatabilidade do sódio quando comparado aos animais normotensos. Além disso, ainda não estava claro se os receptores AT1 centrais estão envolvidos no aumento da ingestão de sódio e, talvez, na palatabilidade do sódio nos SHRs. Considerando que SHRs apresentaram aumento da palatabilidade ao sódio, também foi importante investigar o perfil da palatabilidade a outros gostos, em comparação aos animais normotensos.

Outra questão investigada neste trabalho foi à influência dos estímulos gustatórios sobre a atividade autonômica cardiovascular. Assim sendo, o terceiro objetivo deste estudo foi investigar estimulação gustatória, além de promover respostas orofaciais, também alteram respostas autonômicas cardiovasculares em SHRs em comparação aos normotensos.

Angiotensina II e ansiedade

No atual cenário dos problemas de saúde pública, além da hipertensão arterial, outro dado estatístico preocupante é que um terço da população é afetada por um transtorno de ansiedade durante a vida (BANDELOW; MICHAELIS, 2015). Em relação ao Brasil, de acordo com dados da OMS, o Brasil lidera em prevalência de transtornos de ansiedade em relação à população mundial (DE SOUZA; MACHADO-DE-SOUSA, 2017; WHO, 2017a).

Dados mais recentes demonstram que os transtornos de ansiedade continuam muito frequentes em brasileiros adultos, sendo mais prevalentes entre as mulheres (COSTA et al., 2019). Estima-se que 19,1% dos adultos dos EUA tiveram algum transtorno de ansiedade entre 2001 e 2003, e que a prevalência de qualquer transtorno de ansiedade foi maior no sexo feminino (23,4%) do que no masculino (14,3%) durante esse período (NIH, 2020). Além das complicações fisiopatológicas da COVID-19, a extensão da pandemia e seu eventual impacto no bem-estar e saúde mental da população tem sido uma grande preocupação, tanto nos pacientes recuperados da COVID-19 e na equipe de profissionais de saúde, quanto na população submetida ao isolamento social que já estava em tratamento psiquiátrico (ASMUNDSON et al., 2020; ELBAY et al., 2020; PETEET, 2020; SHIOZAWA; UCHIDA, 2020; MOAYED et al., 2021).

Os índices de ansiedade de um animal em experimentação podem ser avaliados por meio de diferentes testes comportamentais dos quais se destacam o teste de campo aberto (CA), que é um teste comportamental empregado na avaliação do comportamento exploratório de ratos, e o labirinto em cruz elevado (LCE), que é considerado um instrumento válido para medir ansiedade, investigando aspectos comportamentais, fisiológicos e farmacológicos (SCHMITT; HIEMKE, 1998).

Estudos subsequentes demonstraram a associação entre o comportamento emocional de ansiedade e ANG II. A infusão crônica de ANG II promoveu aumento de indicadores de ansiedade em ratos e camundongos normotensos, verificado pelo menor tempo gasto nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (LCE) (DUCHEMIN et al., 2013). Por outro lado, a administração de um antagonista do receptor AT1 da ANG II aumentou o tempo gasto nos braços abertos do LCE e o número de entradas nos braços abertos em ratos normotensos, sugerindo uma redução da ansiedade (PAVEL et al., 2008). Além disso, camundongos *knock-out* para os receptores AT1 no hipotálamo passou significativamente mais tempo os braços abertos no LCE quando comparado aos controles (WANG et al., 2016), sugerindo que ANG II, atuando especificamente no hipotálamo desempenha um papel significativo no comportamento do tipo ansiedade.

Em relação ao comportamento emocional do tipo ansiedade, os SHRs apresentam um nível reduzido de ansiedade medida por meio do LCE, em comparação com ratos de linhagens normotensas Wistar Kyoto e Sprague Dawley. Isso pode ser inferido, pois os SHRs permanecem a maior parte do tempo nos braços abertos do LCE (GENTSCH; LICHTSTEINER; FEER, 1987; RAMOS et al., 1997; FERGUSON; CADA, 2004; FERGUSON; GRAY, 2005; STERLEY; HOWELLS; RUSSELL, 2011; ZUBCEVIC et al.,

2018). O nível reduzido de ansiedade nos SHRs parece estar associado ao aumento da atividade de impulsividade e locomoção (HOWELLS; BINDEWALD; RUSSELL, 2009; GARCIA; KIRKPATRICK, 2013; TSAI et al., 2017; REPOVA et al., 2019). Essas características comportamentais estão presentes mesmo antes dos animais desenvolverem a hipertensão e permanece estável durante a vida adulta [para revisão vide (ADRIANI et al., 2003)].

Levando em consideração esse perfil do tipo menos ansioso observado em SHRs, bem como o conhecimento de que SHRs apresentam uma hiperatividade do sistema renina angiotensina, ainda não se sabe se a ativação desse sistema alteraria a atividade locomotora e comportamento semelhante à ansiedade em SHRs em comparação com animais normotensos.

Expressão gênica no SON e PVN induzida pela estimulação osmótica

Durante estimulação osmótica, o SON sofre uma plasticidade neural relacionada à sua função desencadeando uma resposta hormonal adequada. Como consequência da depleção dos estoques hipofisários de AVP que ocorre durante a estimulação osmótica crônica, há a necessidade de sintetizar mais AVP. A estimulação osmótica crônica, induzida por privação hídrica por 72 h (PH) ou sobrecarga crônica de sal (7 dias com apenas NaCl 2% - SS), promove um robusto aumento nos níveis de mRNA para AVP por aproximadamente duas vezes no SON e PVN, com um aumento paralelo na secreção de AVP (KONDO et al., 2004; HAYASHI et al., 2006; YUE et al., 2008).

Estudos anteriores utilizaram transcriptomas para catalogar todos os genes expressos no SON e PVN, e para identificar genes que são regulados diferencialmente pelos desafios hiperosmóticos da desidratação em machos (HINDMARCH et al., 2006) e fêmeas (QIU et al., 2011), e sobrecarga de sal (GREENWOOD et al., 2014; JOHNSON et al., 2015). Um dos transcritos identificados como sendo regulados positivamente foi o RNA do fator de transcrição 1 indutível por gonadotrofina, “*Gonadotrophin inducible ovarian transcription factor 1*” - **Giot1**, (ortólogo humano ZNF709). Já foi verificado que o Giot1 é regulado positivamente pela desidratação em núcleos hipotalâmicos, como o núcleo supra-óptico (SON) e núcleo paraventricular (PVN) em machos (QIU et al., 2007) e fêmeas (QIU et al., 2011).

Semelhante ao efeito observado com as lesões SON e PVN (COVIAN; ANTUNES-RODRIGUES, 1963), o *knockdown* bilateral de Giot1 no SON e PVN bloqueou drasticamente a ingestão de sal durante a sobrecarga de sal, sugerindo que Giot1 permite

uma alta ingestão de sal. Contudo, ainda não se sabe muito sobre as funções específicas do Giot, bem como a dinâmica espaço-temporal da expressão de RNA Giot1.

Hipóteses

Considerando que SHRs apresentam uma elevada ingestão e apetite ao sódio mediado pela hiperatividade do sistema renina-angiotensina central e que nada se sabe sobre a palatabilidade ao gosto salgado nesses animais, a primeira hipótese desse trabalho é que SHRs apresentam elevada palatabilidade ao NaCl e isso seja devido à ativação de receptores angiotensinérgicos AT1 centrais.

Como SHRs também apresentam preferência maior pela sacarose em comparação aos ratos normotensos, a segunda hipótese desse trabalho é que os SHRs apresentam um aumento na palatabilidade ao gosto doce em relação aos ratos normotensos.

Além de produzir respostas orofaciais, a estimulação gustatória promove alterações cardiovasculares, contudo, ainda é desconhecida a influência dos estímulos gustatórios sobre a atividade autonômica cardiovascular em SHRs. Dessa forma, nossa terceira hipótese é que a infusão intraoral de NaCl e sacarose produza um efeito pressor tanto em SHRs quanto em ratos normotensos não anestesiados.

Estudos anteriores têm mostrado que o aumento de ANG II está diretamente relacionado a um aumento nos indicadores de ansiedade em animais normotensos. Nossa quarta hipótese é que o aumento de ANG II circulante, induzido pelo protocolo de PH, altere o comportamento semelhante à ansiedade em SHRs e ratos normotensos.

Por fim, última hipótese desse trabalho é que o estímulo osmótico, desencadeado pela privação hídrica, leve a um aumento na expressão de RNAm Giot1 em neurônios magnocelulares tanto AVP e OT no SON, mostrando a participação desse gene no controle do balanço hidroeletrólítico.

Proposição

O objetivo geral do presente estudo foi investigar as alterações comportamentais e autonômicas induzidas pelo protocolo de privação hídrica em ratos normotensos e SHRs.

Os objetivos específicos encontram-se organizados em capítulos, conforme descrito a seguir:

1. No primeiro capítulo estão apresentados, na forma de artigo publicado, os resultados da ingestão e palatabilidade ao NaCl após o bloqueio de receptores centrais angiotensinérgicos AT1 em SHRs e normotensos, na condição basal e após desidratação.
2. O segundo objetivo deste trabalho foi investigar o perfil da palatabilidade a outros gostos em animais normotensos em comparação com SHRs, durante condições basais e após o ciclo de PH-RP, conforme capítulo 2, apresentado na forma de artigo em fase de submissão.
3. No capítulo 3, são apresentados os resultados da estimulação gustatória sobre as respostas autonômicas cardiovasculares na condição basal e após PH-RP.
4. O quarto objetivo foi investigar se perturbações do balanço hidroeletrolítico (observadas durante situação de desidratação) alteram, e de que forma, a atividade locomotora e comportamento semelhante à ansiedade em SHRs em comparação com animais normotensos.
5. E por fim, o quinto objetivo deste trabalho foi caracterizar a expressão hipotalâmica de RNA Giot1, a fim de identificar regiões específicas de neurônios magnocelulares que expressam Giot1.

Capítulo 1

SODIUM PALATABILITY IN MALE SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS

Pereira ED Jr, Faria AM, Andrade-Franzé GMF, Menani JV, De Luca LA
Jr, Andrade CAF.

Horm Behav. 2021 Apr; 130:104952

<https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2021.104952>

1. INTRODUCTION

The adult human population has an estimated high dietary NaCl intake despite official recommendations to the contrary. High consumption of NaCl has a positive correlation with increased blood pressure and the resulting adverse outcomes of cardiovascular diseases, for example, stroke (HE; MACGREGOR, 2012; WHO, 2012; MENTE et al., 2014; MILL et al., 2019). The recommendation to follow a low NaCl diet has poor compliance by hypertensive patients, possibly because of how they perceive the taste of NaCl (SAKAKI; TSUCHIHASHI; ARAKAWA, 2014; OHTA et al., 2015).

An animal model of hypertension similar to human essential hypertension is the spontaneously hypertensive rats (SHRs) (OKAMOTO; AOKI, 1963). In addition to an increase in arterial pressure, SHRs also ingest more NaCl than normotensive rats when they have free access to hypertonic NaCl solution in addition to water to ingest (ELY; TURNER; MILSTED, 2000; DI NICOLANTONIO et al., 2004). Therefore, SHRs provide a model for alterations in NaCl appetite in the context of essential hypertension. Yet, the amount of NaCl in the diet has a prominent effect on the full development of hypertension in SHRs (WILCZYNSKI; LEENEN, 1987; DI NICOLANTONIO; SILVAPULLE, 1988; KOGA et al., 2008). Moreover, their high blood pressure and high NaCl intake are both dependent on a hyperactive brain renin-angiotensin system (RAS) (DINICOLANTONIO; HUTCHINSON; MENDELSON, 1982; TANAKA et al., 1995; VEERASINGHAM; RAIZADA, 2003).

Sodium depletion, sodium appetite and angiotensin II (ANG II) acting in the brain influence NaCl intake as well as the hedonic profile, or palatability, of a salty taste in normotensive rats (BERRIDGE et al., 1984; BERRIDGE; SCHULKIN, 1989; SATO; YADA; DE LUCA, 1996; PEREIRA et al., 2019; ZENATTI et al., 2020). We can evaluate the influences of different treatments on palatability by recording the motor orofacial responses of the rat to minute intraoral infusions of NaCl solutions with no significant post-ingestive consequences (BERRIDGE et al., 1984; BERRIDGE; SCHULKIN, 1989; BERRIDGE, 2000). To the best of our knowledge, there is no report about the palatability of salty taste, or NaCl palatability, in SHRs. We also do not know whether ANG II has any influence on NaCl palatability in this strain.

In the present study, we investigated NaCl palatability in male SHRs by recording their orofacial responses to intraoral infusions of 0.3 M NaCl. We also recorded their 0.3 M NaCl intake whenever appropriate to associate it with NaCl palatability. We first

investigated NaCl palatability profile of SHR_s compared to that of a normotensive strain, both in euhydrated (fed and satiated) and dehydrated (sodium deplete) conditions. In the sodium deplete condition we used the diuretic furosemide combined with low dose of the angiotensin converting enzyme blocker captopril (FURO + CAP), to produce an acute, rapid onset (within 2 hours) sodium appetite. The FURO + CAP protocol has the advantage of speed to stimulate sodium appetite produced in conditions of environmental sodium lack (THUNHORST; JOHNSON, 1994; THUNHORST et al., 1998). The rapid induction of water and 0.3 M NaCl intake by FURO + CAP treatment results from the association of a mild hypotension and unloading of low-pressure volume receptors plus an action of ANG II in the brain (FITTS; MASSON, 1989; THUNHORST; JOHNSON, 1994). We used another protocol, the water deprivation-partial rehydration (WD-PR) protocol, which clearly distinguishes thirst from sodium appetite in the usual context of double (extracellular and intracellular) dehydration (DE LUCA et al., 2010). The WD-PR protocol involves a sequence of water deprivation with free access to regular laboratory chow (WD) followed by partial rehydration (PR) allowing the rat to drink only water to satiation. Drinking water to satiation during PR leads to dilution of body fluids and a partial recovery of the extracellular volume with sustained high plasma renin activity (PRA) (DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010). We investigated whether NaCl palatability in SHR_s depends on brain ANG II AT1 receptors by using pharmacological blockade with losartan in both WD-PR and euhydrated conditions. Finally, we investigated whether changes in NaCl palatability are accompanied by changes in blood pressure in preliminary assessments of the role of arterial pressure on NaCl intake (THUNHORST and JOHNSON, 1994; THUNHORST et al., 1998).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Animals

Male Holtzman rats (a normotensive outbred strain, n = 10) and spontaneously hypertensive rats (SHR_s, n = 40) bred in the facility at School of Dentistry - São Paulo State University - Araraquara – SP, weighing 290 to 330 g were used. The choice of Holtzman rats as a control strain for SHR_s were based on previous studies from our laboratory, in which Holtzman rats were used for many years in studies about neural control of sodium

appetite (MENANI et al., 1999; ANDRADE et al., 2004; ANDRADE et al., 2014; ANDRADE-FRANZE et al., 2017; PEREIRA et al., 2019).

Rats were individually housed in stainless steel cages with free access to normal sodium diet (0.5–1.0%) (Guabi rat chow, Paulínia, SP, Brazil), water and 0.3 M NaCl. Temperature was maintained at 23 ± 2 °C, and humidity was maintained at $55 \pm 10\%$ on a 12:12 light–dark cycle with light onset at 7:00 AM.

The Ethical Committee for Animal Care and Use from the Dentistry School of Araraquara — UNESP approved the experimental protocols used in the present study (protocol 13/2014 and 02/2016). The protocols followed the recommendations from the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

Implant of intraoral and cerebral cannulas

Under anesthesia with ketamine (80 mg/kg of body weight) combined with xylazine (7 mg/kg of body weight) injected intraperitoneally (ip), rats were given an intraoral cannula (IOC). The IOC consisted of a polyethylene tubing (PE 50) with a flared end threaded through a silicon washer (endodontic stop). A 23 G needle bridged the other end to an 18 G needle. The beveled end of the 18 G needle remained free to guide the whole cannula/needle system from the mouth through the inner limit of masticatory muscle facing the temporal bone under the zygomatic arch and tunneling under the skin caudal to the eye to exit on the top of the skull. The washer ended resting against the mucobuccal fold region near to the first and second molar teeth. The bridged needles were replaced by a 10 mm 23 G stainless steel cannula, thus constituting the “infusion end” of IOC to be anchored to the top skull surface with acrylic resin and jeweler screws. The IOC does not interfere with the normal eating behavior of the rat and allow the direct infusion of solutions into the mouth. The rats were allowed to recover for 4 days before taste reactivity tests.

Some rats also had a stainless-steel guide cannulae implanted in the lateral ventricle (LV) during the IOC surgery. After IOC implant, rats were placed in a Kopf stereotaxic instrument. Their skull was leveled between bregma and lambda. A stainless steel 23-gauge cannula was implanted into the LV following the coordinates: 0.3 mm caudal to bregma, 1.5 mm lateral to the midline, and 4.0 mm below the dura mater. The tip of the cannula was positioned at a point 2 mm above the LV. The cannula was fixed to the cranium with dental acrylic resin and jeweler screws. A 30-gauge metal obturator filled the cannula between tests. After the surgery, rats received the anti-inflammatory ketoprofen (1 mg/kg of body

weight) injected subcutaneously (s.c.) and a prophylactic dose of penicillin (50.000 IU) injected intramuscularly. The rats were allowed to recover for 6 days before drug injections into the LV.

Drugs

The natriuretic/diuretic drug furosemide (FURO, 10 mg/ml; Sigma Chem., St Louis, MO, USA) was dissolved in alkaline saline (0.9 % NaCl, pH was adjusted to 9.0 with NaOH) and administered s.c. at the dose of 10 mg/kg of body weight. The angiotensin converting enzyme inhibitor captopril (CAP, 5 mg/ml; Sigma Chem., St. Louis, MO, USA) was dissolved in saline (0.9 % NaCl) and administered s.c. at the dose of 5 mg/kg of body weight. Losartan potassium (100 µg/1.0 µl; AT1 receptor antagonist, Sigma-Aldrich St Louis, MO, USA) was dissolved in saline and administered into the LV (RONCARI et al., 2017).

Injections into the lateral ventricle

Rats were gently handled daily to habituate to experimental procedures, which includes brief hand restraining for intracerebroventricular (i.c.v.) injections.

Intracerebroventricular injections were made using 10-µl Hamilton syringes connected by polyethylene tubing (PE-10) to 30-gauge injection cannulas. At the time of testing, the obturator was removed and the injection cannula (2 mm longer than the guide cannulas) was introduced in the brain. The volume of the i.c.v. injection was 1 µl. The i.c.v. injections lasted about 30 – 50 seconds. The obturator was replaced into the guide cannula after injection, and the rats were returned to their home cages.

Acute fluid depletion (FURO + CAP treatment)

To induce water and 0.3 M NaCl intake, rats received the combined treatment with FURO and CAP injected s.c. Rats were maintained without food, water and 0.3 M NaCl for 1 h. After this period, water and 0.3 M NaCl were offered to the rats in glass burette with 0.1-ml divisions fitted with a stainless-steel spout and cumulative intake was measured at 30 and 60 min. During the tests rats had no access to food.

Sodium appetite induced by water deprivation – partial rehydration (WD-PR protocol)

Rats were deprived of water and 0.3 M NaCl, with free access to food for 24 h (WD). At the end of this period, food was removed and a glass burette with 0.1-ml divisions containing filtered water was offered for 2 h (PR). Water intake was measured at 120 min. At the end of the PR, a glass burette containing 0.3 M NaCl was added to the cage for the sodium intake test. Water and 0.3 M NaCl intake was measured at 15, 30 and 60 min.

Taste reactivity test

To all rats with IOC were given a 3-day habituation period, when they were exposed to the square glass taste reactivity chamber (25 x 25 cm) for 10 min, before receiving an IO infusion of 1 ml of water during 1 min.

In the taste reactivity test, IO infusions of 0.3 M NaCl (1 ml during 1 min) were performed connecting with polyethylene tubing the IOC to a syringe in a Harvard pump (Syringe Pump Model 33). The behavior of each rat during the IO infusions of 0.3 M NaCl was videotaped via a mirror mounted beneath the transparent floor of the taste reactivity chamber. The recorded image was enlarged so the face and mouth of the rat filled the entire screen. The behavior of each rat was scored for the occurrence of hedonic (ingestive) and aversive (rejection) taste reactivity components [see (GRILL; BERRIDGE, 1985) for a description and discussion of taste reactivity analysis, components and classification]. Hedonic responses were considered: paw licking, lateral tongue protrusions (non-rhythmic tongue protrusions past the lip followed by forward extension) and rhythmic tongue protrusions along the midline. Aversive responses were considered: gapes (large openings of the mandible and retraction of the lower lips); face washing (either a single wipe over the face with the paws or a bout of several wipes); forelimb flails (shaking of the forelimb); head shaking; paw treading, planting of the limbs on the floor and alternating forceful strikes forward and backward; and rapid locomotion around the chamber. Videotapes were scored in a slow-motion analysis, without the observer knowing the rat's strain and treatment condition. The means for hedonic or aversive score were computed for each group. The hedonic or aversive scores were independently analyzed, since they represent phenomenological different categories of behavior (GRILL; BERRIDGE, 1985; BERRIDGE, 2000; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2019).

Arterial pressure recording

Arterial pressure was recorded using a catheter inserted into the femoral artery. For this surgery, rats were anesthetized with i.p. ketamine (80 mg/kg of body weight) combined with xylazine (7 mg/kg of body weight). A cannula made of polyethylene tubing (PE-10 connected to a PE-50, Clay Adams, USA) and filled with sterile saline containing 50 U/ml of heparin (Cristália, Brazil), was inserted into the abdominal aorta through the femoral artery. This cannula was tunneled subcutaneously to the back of the rat, exteriorized and fixed in the skin. After the surgery, rats received the anti-inflammatory ketoprofen (1 mg/kg of body weight) injected subcutaneously (s.c.). In the next day, the cannula was connected to a pressure transducer (model P23 Db, Stathan Gould, USA) coupled to a preamplifier (model Bridge Bio Amplifier ETH-200, CB Sciences Inc., USA) connected to a computer data acquisition system (PowerLab 16SP/Lab Chart software, ADInstruments, Australia). Pulsatile arterial pressure (PAP), mean arterial pressure (MAP) and heart rate (HR) were recorded in conscious freely moving rats. MAP and HR were calculated from PAP signal using the Lab Chart software.

Histology

At the end of the tests, rats with cannulas implanted in the LV received injection of 2% Evans Blue solution (1 μ l) into the LV. They were deeply anesthetized with sodium thiopental (80 mg/kg of body weight) and perfused transcardially with 0.9% NaCl followed by 10% formalin. The brains were removed, fixed in 10% formalin, frozen, cut in 50- μ m sections, stained with cresyl violet, and analyzed by light microscopy to confirm the injection site in the LV. From a total of 36 SHR with brain guide cannula, 30 received injections correctly placed into the LV. Only the results from rats with injections correctly placed into the LV were analyzed.

Statistical analysis

The results are reported as means \pm SEM. Individual data of hedonic and aversive responses were also presented. Fluid intake data were normalized to body weight to avoid any possible interference of body weight in the responses (SANTOLLO; TORREGROSSA; DANIELS, 2017). Analysis of variance (ANOVA), using strain, treatment and/or time as factors when appropriate, followed by Student Newman Keuls tests were used for comparisons (SigmaPlot 11.0 software). Student t test was used to compare MAP and HR in euhydrated condition and after WD-PR. Differences were considered significant at $P < 0.05$.

Data were analyzed for normality and homogeneity of variance prior to conducting ANOVAs. The effect size was estimated as partial eta squared (η_p^2) for ANOVA (LAKENS, 2013).

2. EXPERIMENTAL PROTOCOLS

3.1. — *Taste reactivity to IO 0.3 M NaCl in normotensive rats and SHRs in euhydrated condition and after s.c. FURO + CAP*

Taste reactivity to IO 0.3 M NaCl was tested in normotensive rats (n = 6) and SHRs (n = 7) in euhydrated condition (no previous treatment). On the test day, water, food and 0.3 M NaCl were removed from the rat's home cage. The rats were placed in the taste reactivity chamber and allowed 1 min for habituation. Then 0.3 M NaCl was infused into the mouth of the rat, while the behavior was videotaped. During testing, rats had no access to water, 0.3 M NaCl or food.

Two days after the test under euhydrated condition, taste reactivity to IO 0.3 M NaCl was repeated in rats treated with s.c. FURO + CAP (normotensive rats, n = 4; SHRs, n = 7). Rats received FURO + CAP sc and had water, 0.3 M NaCl and food removed from the home cage. One hour later, rats were placed in the taste reactivity chamber and had 0.3 M NaCl infused into the mouth while the behavior was videotaped. Immediately after the first taste reactivity recording, rats were returned to the home cage where water and 0.3 M NaCl were available. Rats had 30 min access to 0.3 M NaCl and water, were tested for taste reactivity, then had another 30 min of access to 0.3 M NaCl and water followed by a final taste reactivity test. Water and 0.3 M NaCl ingested was also measured at 15, 30 and 60 min after starting the access to these fluids. See the scheme of this protocol in the appendix, item 1.1

3.2. — *Arterial pressure and heart rate in normotensive rats and SHRs before and after s.c. FURO + CAP*

In another group of rats without IOC (normotensive rats, n = 4; SHRs, n = 4) after a baseline period of MAP and HR recordings (20 min), rats received FURO + CAP treatment. Arterial pressure and HR recordings continued for the next 2 hours.

3.3. — *Taste reactivity to IO 0.3 M NaCl after WD-PR in SHRs treated with losartan i.c.v.*

Another group of SHRs (n = 12) with 24 h of water deprivation had 2-h access to only water. Then, they received an i.c.v. injection of saline (1 μ l) or losartan. Fifteen min after the injections, orofacial motor responses to IO 0.3 M NaCl were recorded and rats had access to 0.3 M NaCl in addition to water. Rats had 30 min access to 0.3 M NaCl and water,

were tested for taste reactivity, then had another 30 min of access to 0.3 M NaCl and water followed by a final taste reactivity test. Each rat was submitted to two tests. In each test, the group of rats was divided in two, half of the group received control treatment (i.c.v. saline) and the remaining rats received i.c.v. losartan. After a 48-h interval, saline or losartan was injected i.c.v. in the same rats in a counterbalanced design. See the scheme of this protocol in the appendix, item 1.2

3.4. — Taste reactivity to IO 0.3 M NaCl in euhydrated SHR_s treated with losartan i.c.v.

Another group of SHR_s (n = 11) with IOC received i.c.v. injections of saline (1 µl) or losartan in euhydrated condition and had access to 0.3 M NaCl and water. Rats had 15 min access to 0.3 M NaCl and water, were tested for taste reactivity, then had 30 min of access to 0.3 M NaCl and water, were tested again for taste reactivity, had another 30 min of access to 0.3 M NaCl and water followed by a final taste reactivity test. Water and 0.3 M NaCl intake was also measured in the same period. Each rat was submitted to two tests. In each test, the group of rats was divided in two, half of the group received control treatment (i.c.v. saline) and the remaining rats received i.c.v. losartan. In the following day, saline or losartan was injected i.c.v. in the same rats in a counterbalanced design. See the scheme of this protocol in the appendix, item 1.3

3.5. — Changes in arterial pressure in SHR_s treated with losartan i.c.v. in euhydrated condition or after WD-PR

Under euhydrated condition, after baseline recording of MAP and HR during 20 min, SHR_s (n = 6) received i.c.v. injections of saline (1 µl) 20 min before i.c.v. injections of losartan, while MAP and HR were continuously recorded until 20 min after losartan. Then, rats were returned to their home cages and were maintained with only food pellets available for 24 h. After 24 h of water deprivation, MAP and HR were recorded again during 20 min. Then, rats had only water to drink for 2 h before another baseline MAP and HR recording during 20 min. After this, rats received i.c.v. injections of saline (1 µl) 20 min before i.c.v. losartan, while MAP and HR were continuously recorded until 20 min after losartan, when rats had access to both water and 0.3 M NaCl for 2 hours (ingestive test), before a final recording of MAP and HR.

Changes in MAP and HR were analyzed at the times 0, 5, 10 and 20 min after i.c.v. losartan based in the differences between the values of MAP and HR in these times and MAP and HR values immediately before the injection of losartan. Changes in MAP and HR after saline were calculated by the differences between the maximum MAP and HR values and MAP and HR values immediately before saline.

During MAP and HR recordings, rats had no access to fluids.

3. RESULTS

1.1. Taste reactivity to IO 0.3 M NaCl in normotensive rats and SHRs in euhydrated condition and after s.c. FURO + CAP

In the taste reactivity test, for hedonic responses, ANOVA showed significant differences between strains [$F(1,11) = 6.72$; $p = 0.019$; $\eta_p^2 = 0.38$] and treatments [$F(3,27) = 3.28$; $p = 0.036$; $\eta_p^2 = 0.27$] and no significant interaction between strains and treatments [$F(3,27) = 0.92$; $p = 0.44$] (Figure 1A). For aversive responses, ANOVA showed significant differences only between treatments [$F(3,27) = 4.88$; $p = 0.008$; $\eta_p^2 = 0.83$], not between strains [$F(1,11) = 4.02$; $p = 0.063$] and no significant interaction between strains and treatments [$F(3, 27) = 1.13$; $p = 0.34$] (Figure 1B). Under euhydrated condition, before FURO + CAP, the number of hedonic responses to IO 0.3 M NaCl was higher in SHRs than in normotensive rats ($p < 0.05$), without differences in the aversive responses (Figure 1, left to dotted line). Sixty minutes after FURO + CAP (immediately before the access to water and NaCl), the number of hedonic responses increased ($p < 0.05$) and the number of aversive responses decreased ($p < 0.05$) in normovolemic rats, whereas in SHRs hedonic and aversive responses were not different from the control before FURO + CAP (Figure 1, right to dotted line). The number of hedonic and aversive responses was similar between normotensive rats and SHRs 60 min after FURO + CAP (Figure 1, right to dotted line). After free access to water and 0.3 M NaCl, hedonic responses of normotensive rats progressively declined ($p < 0.05$) (Figure 1A), whereas rejection responses gradually increased ($p < 0.05$) (Figure 1B). By contrast, SHRs maintained a high number of hedonic responses and a low number of rejection responses throughout the 60 min period of test (Figure 1).

In the ingestive test, for 0.3 M NaCl, ANOVA showed significant differences between times [$F(2,22) = 6.63$; $p = 0.006$; $\eta_p^2 = 0.37$], not between strains [$F(1,11) = 1.59$; $p = 0.233$] and no significant interaction between times and strains [$F(2,22) = 2.29$; $p = 0.125$]

(Figure 2A). For water intake, ANOVA showed significant differences between strains [$F(1, 11) = 16.07$; $p = 0.002$; $\eta_p^2 = 0.59$] and times [$F(2,22) = 18.62$; $p < 0.001$; $\eta_p^2 = 0.62$] and no significant interaction between strains and times [$F(2,22) = 2.80$; $p = 0.082$] (Figure 2B). FURO + CAP induced similar 0.3 M NaCl intake in SHRs and normotensive rats (Figure 2A). Normotensive rats ingested a little more water than SHRs at 30 min of the test ($p < 0.05$), without difference at the end of the test (60 min) (Figure 2B).

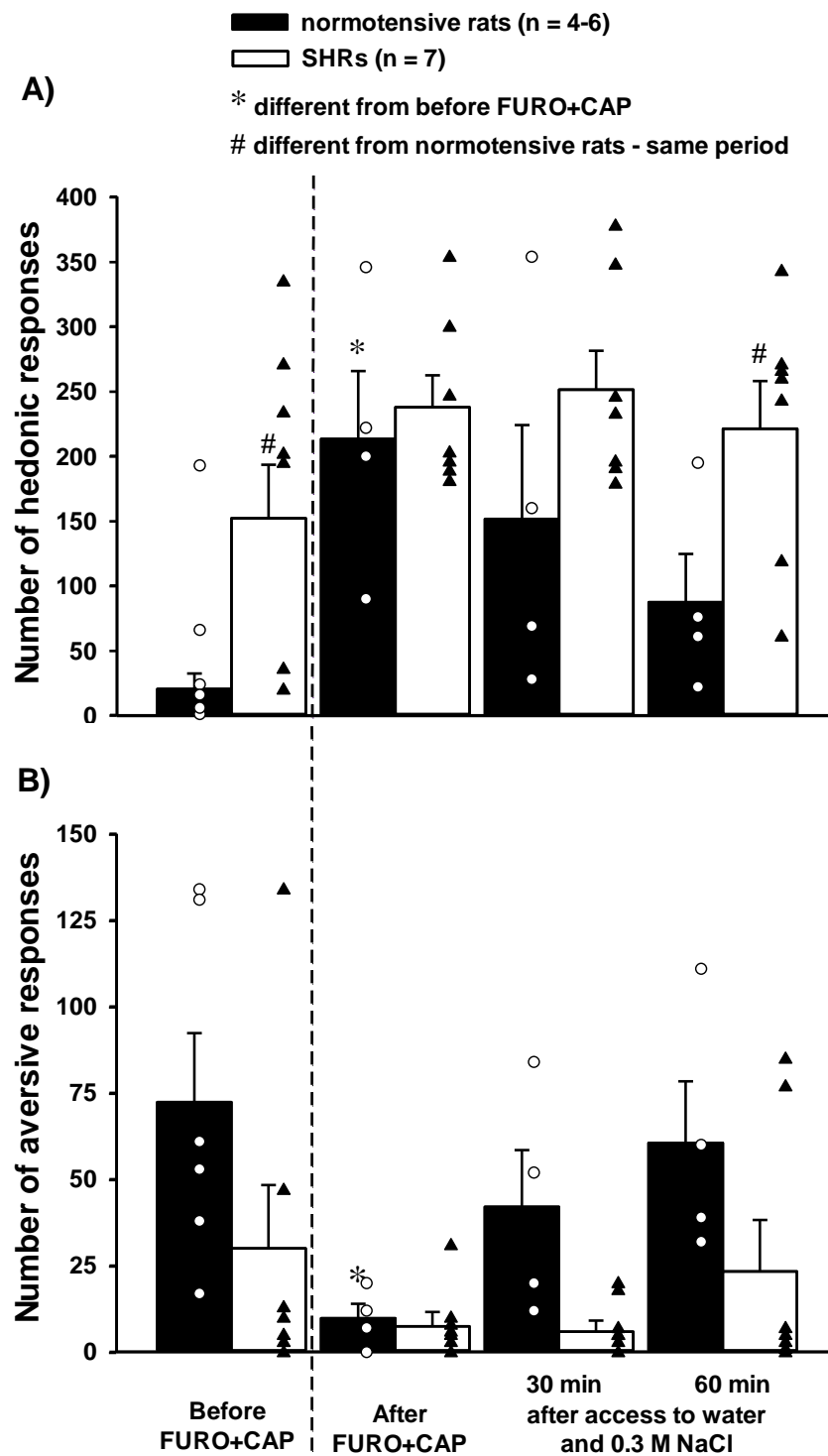


Figure 1.1: Number of **A)** hedonic responses and **B)** aversive responses to IO infusion of 0.3 M NaCl before FURO + CAP, 60 min after FURO + CAP and at 30 and 60 min after free access to 0.3 M NaCl and water in normotensive rats and SHRs treated with sc FURO + CAP. Bars represent results expressed as means \pm SEM; \circ and \blacktriangle , individual data for normotensive rats and SHRs, respectively. n = number of rats. Results analyzed by two-way repeated measures ANOVA (one factor repetition) and Student Newman Keuls test.

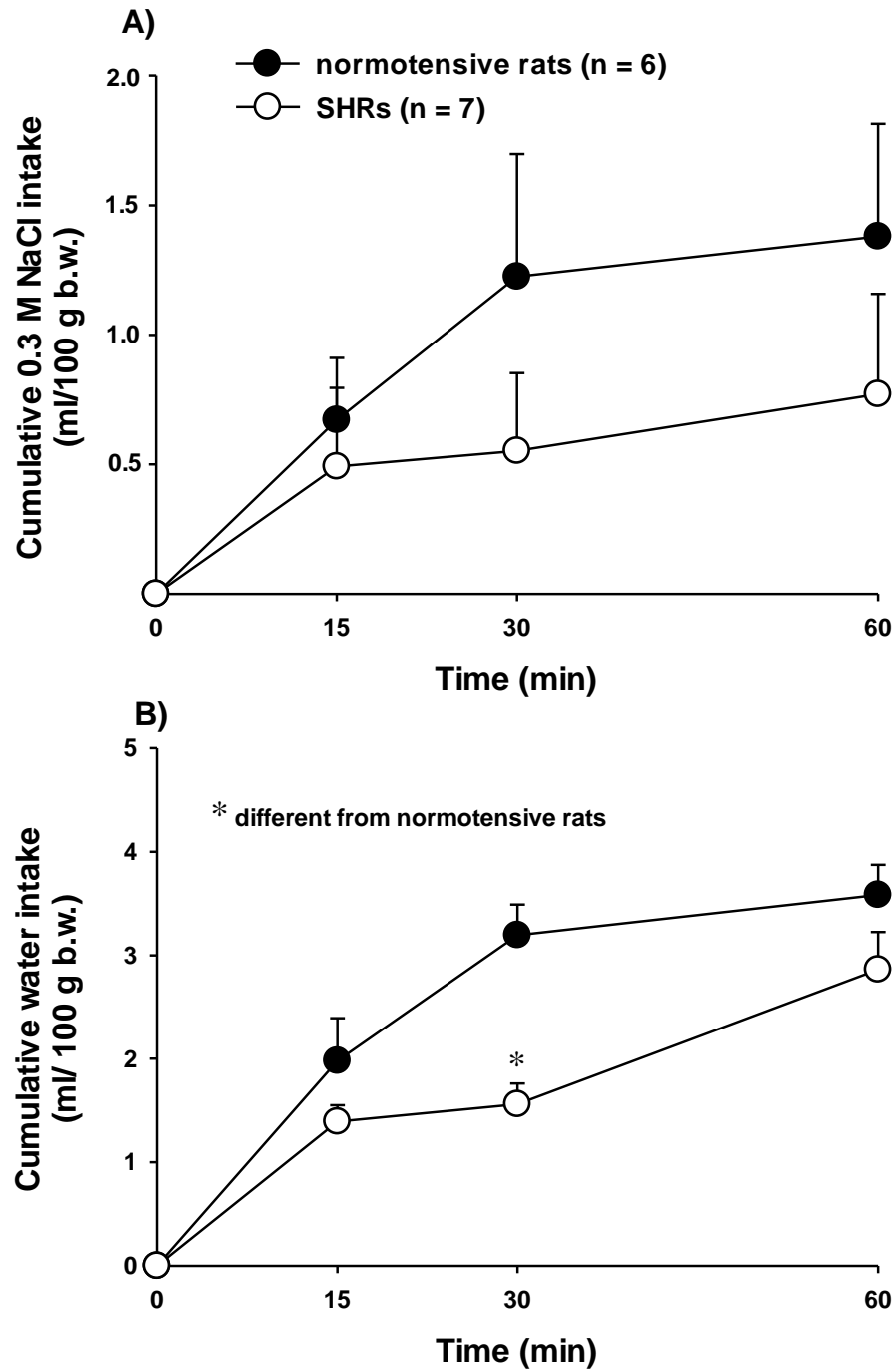


Figure 1.2: Cumulative **A)** 0.3 M NaCl and **B)** water intake (ml/100 g b.w.) by normotensive rats and SHRs tested for taste reactivity to 0.3 M NaCl after FURO + CAP treatment. Results expressed as means \pm SEM. n = number of rats. Results analyzed by two-way repeated measures ANOVA (one factor repetition) and Student Newman Keuls test.

1.2. *Arterial pressure and heart rate in normotensive rats and SHR before and after s.c. FURO + CAP*

ANOVA showed significant differences for MAP between strains [$F(1,6) = 91.43$; $p < 0.001$; $\eta_p^2 = 0.93$] and times [$F(4,48) = 2.84$; $p = 0.012$; $\eta_p^2 = 0.19$] and significant interaction between strains and times [$F(4,48) = 2.35$; $p = 0.032$; $\eta_p^2 = 0.16$]. MAP was higher in SHRs than in normotensive rats at baseline (before FURO + CAP) and during the whole period of recording (120 min after FURO + CAP), ($p < 0.05$), (Table 1). FURO + CAP did not change MAP in normotensive rats, but decreased MAP in SHRs from 60 min to the end of the recording ($p < 0.05$) (Table 1).

For HR, ANOVA showed significant differences between times [$F(4,48) = 3.40$; $p = 0.004$; $\eta_p^2 = 0.22$], not between strains [$F(1,6) = 2.17$; $p = 0.19$] and significant interaction between strains and times [$F(4,48) = 2.21$; $p = 0.043$; $\eta_p^2 = 0.15$]. HR was higher in SHRs compared to normotensive rats at 90 and 120 min after FURO + CAP ($p < 0.05$). Compared to baseline in the same group, FURO + CAP did not change HR in SHRs or normotensive rats.

Table 1.1: MAP and HR in normotensive rats and SHRs before and after s.c. FURO + CAP

Strain	Baseline	Time after FURO + CAP (min)							
		0	5	10	15	30	60	90	120
<i>Mean arterial pressure (mmHg)</i>									
Normotensive	112±5	112±5	114±4	110±3	109±7	107±3	107±4	112±2	113±4
SHRs	176±10*	174±9*	161±8*	160±6*	154±6*	156±5*	140±2*+	141±5*+	141±12*+
<i>Heart rate (bpm)</i>									
Normotensive	331±13	333±13	341±14	368±17	383±20	414±11	394±22	373±15	375±18
SHRs	363±24	387±30	371±18	362±28	388±20	370±12	394±12	443±26*	419±29*

Results expressed as means ± SEM. *Different from normotensive rats. + Different from baseline. Normotensive rats: n = 4; SHRs: n = 4. Baseline, 20 min before FURO + CAP; 0 - 60 min, post FURO + CAP without fluids; 60 - 120 min, post FURO + CAP with fluids available. Results analyzed by two-way repeated measures ANOVA (one factor repetition) and Student Newman Keuls test.

1.3. Taste reactivity to IO 0.3 M NaCl after WD-PR in SHRs treated with losartan i.c.v.

In the taste reactivity test, for hedonic responses, ANOVA showed significant differences between treatments [$F(1,11) = 12.90$; $p = 0.004$; $\eta_p^2 = 0.54$], not between times [$F(2,22) = 2.60$; $p = 0.10$] and significant interaction between treatments and times [$F(2,22) = 19.50$; $p < 0.001$; $\eta_p^2 = 0.64$] (Figure 3A). For aversive responses (Figure 3B), ANOVA showed no significant difference between treatments [$F(1,11) = 4.80$; $p = 0.051$] and times [$F(2,22) = 0.79$; $p = 0.47$] and no interaction between treatments and times [$F(2,22) = 1.70$; $p = 0.21$]. Losartan i.c.v. reduced the number of hedonic responses at 0 and 30 min of test ($p < 0.05$), without changes in aversive responses in this period (Figure 3). However, losartan did not change the number of hedonic or aversive responses at the end of the sodium appetite test (60 min) (Figure 3).

In the ingestive test, for 0.3 M NaCl intake, ANOVA showed significant differences between treatments [$F(1,11) = 23.38$; $p < 0.001$; $\eta_p^2 = 0.68$] and times [$F(1,11) = 16.99$; $p < 0.02$; $\eta_p^2 = 0.61$] and significant interaction between treatments and times [$F(1,11) = 8.82$; $p = 0.013$; $\eta_p^2 = 0.44$] (Figure 4A). For water intake, ANOVA showed significant differences only between times [$F(1,11) = 9.86$; $p = 0.009$; $\eta_p^2 = 0.47$], not between treatments [$F(1,11) = 0.36$; $p = 0.56$] and no significant interaction between treatments and times [$F(1,11) = 1.68$; $p = 0.22$] (Figure 4B). Contrary to taste reactivity responses, losartan abolished 0.3 M NaCl intake during the whole test ($p < 0.05$), without changes in water intake (Figure 4).

After 24 h of water deprivation this group of rats ingested 3.2 ± 0.2 ml/100 g of b.wt. of water in the 2-h period of partial rehydration performed before the injection of losartan.

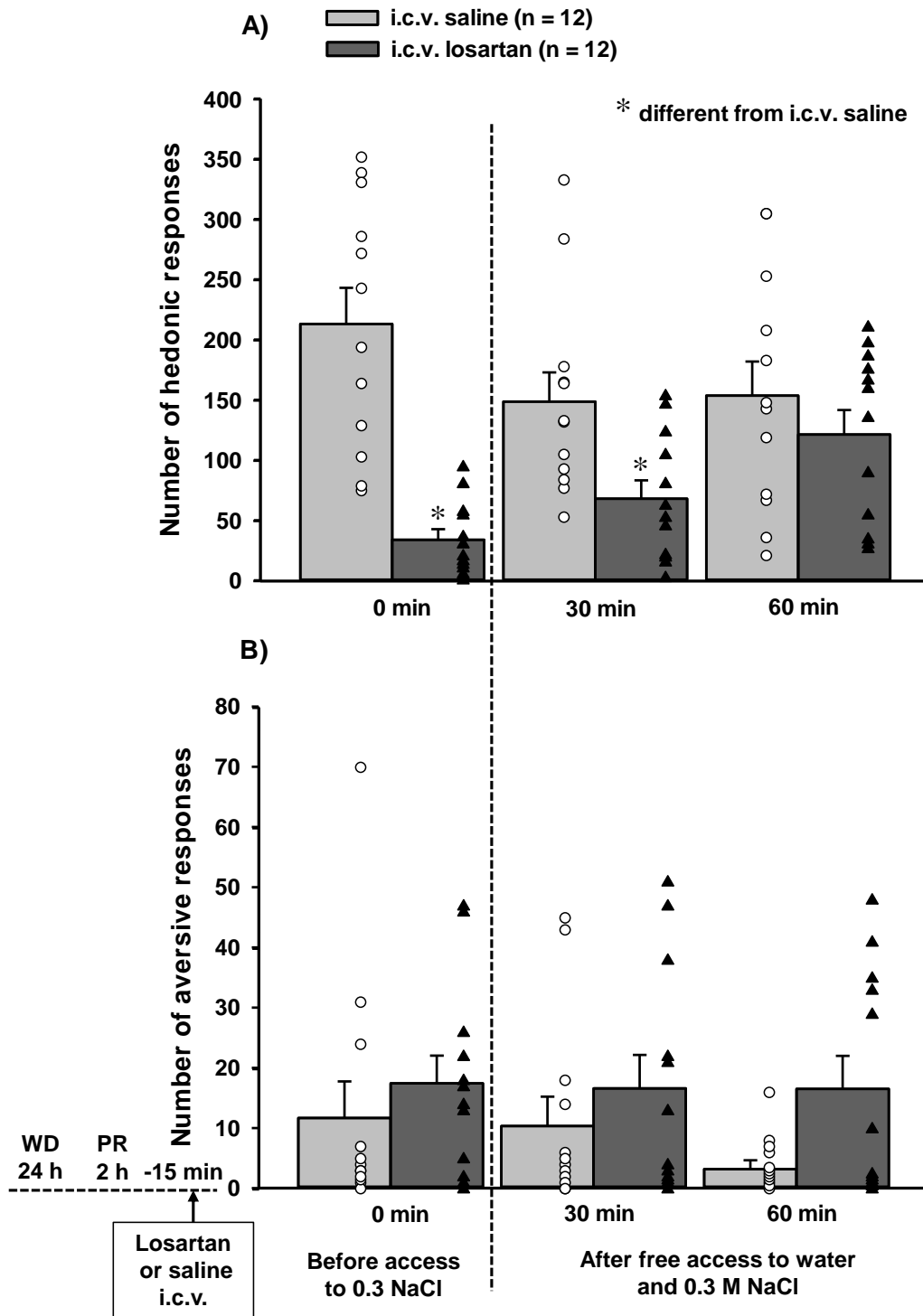


Figure 1.3: Number of **A)** hedonic and **B)** aversive responses to IO infusion of 0.3 M NaCl prior (0 min) and at 30 and 60 min after free access to 0.3 M NaCl and water in SHRs treated with saline or losartan (100 ng/1 μ l) injected i.c.v. after water deprivation (WD)-partial rehydration (PR). Bars represent results expressed as means \pm SEM; \circ and \blacktriangle , individual data for saline and losartan i.c.v., respectively. n = number of rats. Results analyzed by two-way repeated measures ANOVA (one factor repetition) and Student Newman Keuls test.

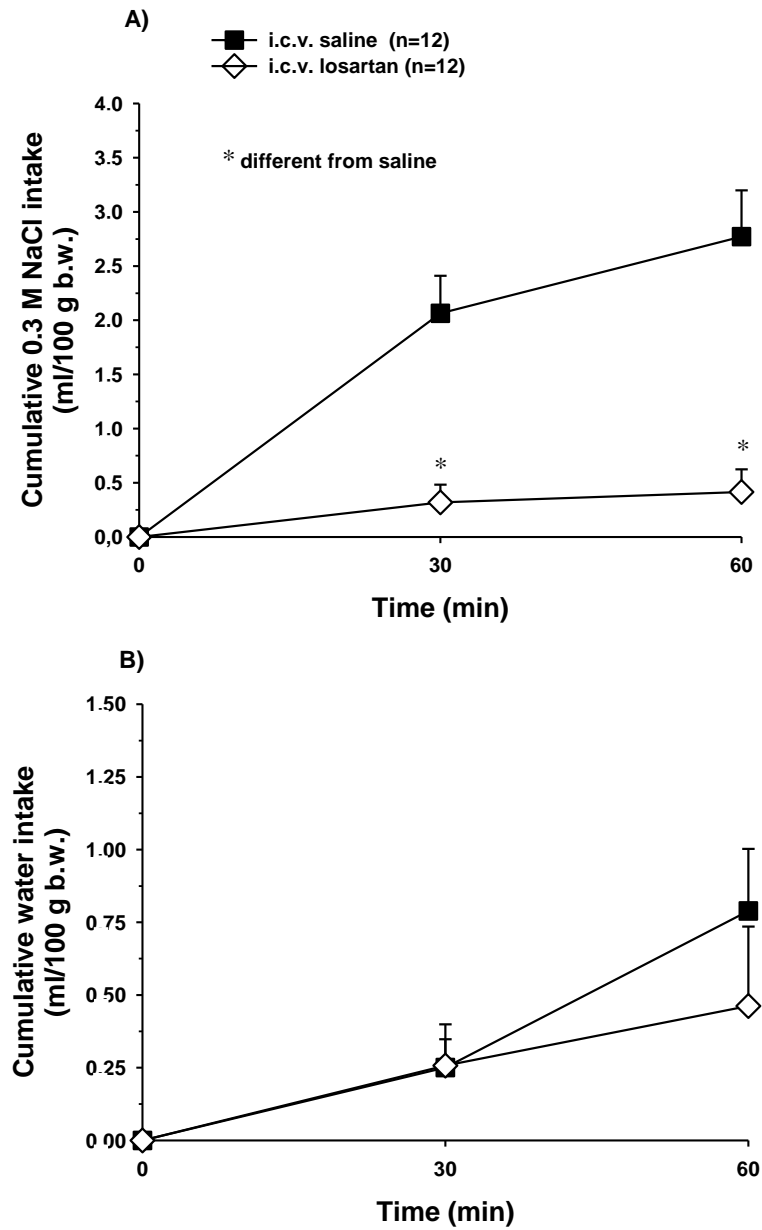


Figure 1.4: Cumulative **A)** 0.3 M NaCl intake; **B)** water intake (ml/100 g b.w.) during sodium intake test while SHR rats treated with saline or losartan (100 ng/1 µl) injected i.c.v. were tested for taste reactivity to 0.3 M NaCl after water deprivation-partial rehydration. Results expressed as means \pm SEM. n = number of rats. Results analyzed by two-way repeated measures ANOVA (one factor repetition) and Student Newman Keuls test.

1.4. *Taste reactivity to IO 0.3 M NaCl in euhydrated SHR treated with losartan i.c.v.*

In the taste reactivity test, for hedonic responses, ANOVA showed significant differences between treatments [$F(1,10) = 8.91$; $p = 0.014$]; $\eta_p^2 = 0.47$], not between times [$F(2,20) = 0.12$; $p = 0.89$] and no significant interaction between treatments and times [$F(2,20) = 1.40$; $p = 0.27$] (Figure 5A). For aversive responses, ANOVA showed no significant difference between treatments [$F(1,10) = 0.24$; $p = 0.64$] and times [$F(2,20) = 1.02$; $p = 0.38$] and no significant interaction between treatments and times [$F(2,20) = 0.32$; $p = 0.73$] (Figure 5B). Hedonic responses to IO 0.3 M NaCl were reduced at 15 and 45 min after the injection of losartan i.c.v. in euhydrated SHR ($p < 0.05$), without changes in aversive responses (Figure 5). Losartan did not change the number of hedonic or aversive responses in euhydrated SHR at the end of the period of evaluation (75 min after losartan) (Figure 5).

In the ingestive test, for 0.3 M NaCl intake, ANOVA showed significant interaction between treatments and times [$F(1,10) = 13.75$; $p = 0.004$]; $\eta_p^2 = 0.57$] and significant differences between times [$F(1,10) = 9.15$; $p = 0.013$]; $\eta_p^2 = 0.48$] not between treatments [$F(1,10) = 2.53$; $p = 0.14$] (Table 2). For water intake ANOVA showed significant differences between treatments [$F(1,10) = 5.27$; $p = 0.045$]; $\eta_p^2 = 0.34$] and times [$F(1,10) = 9.34$; $p = 0.012$]; $\eta_p^2 = 0.43$] and no significant interaction between treatments and times [$F(1,10) = 3.48$; $p = 0.09$] (Table 2). Losartan i.c.v. did not alter 0.3 M NaCl intake in euhydrated SHR, but decreased water intake ($p < 0.05$) (Table 2).

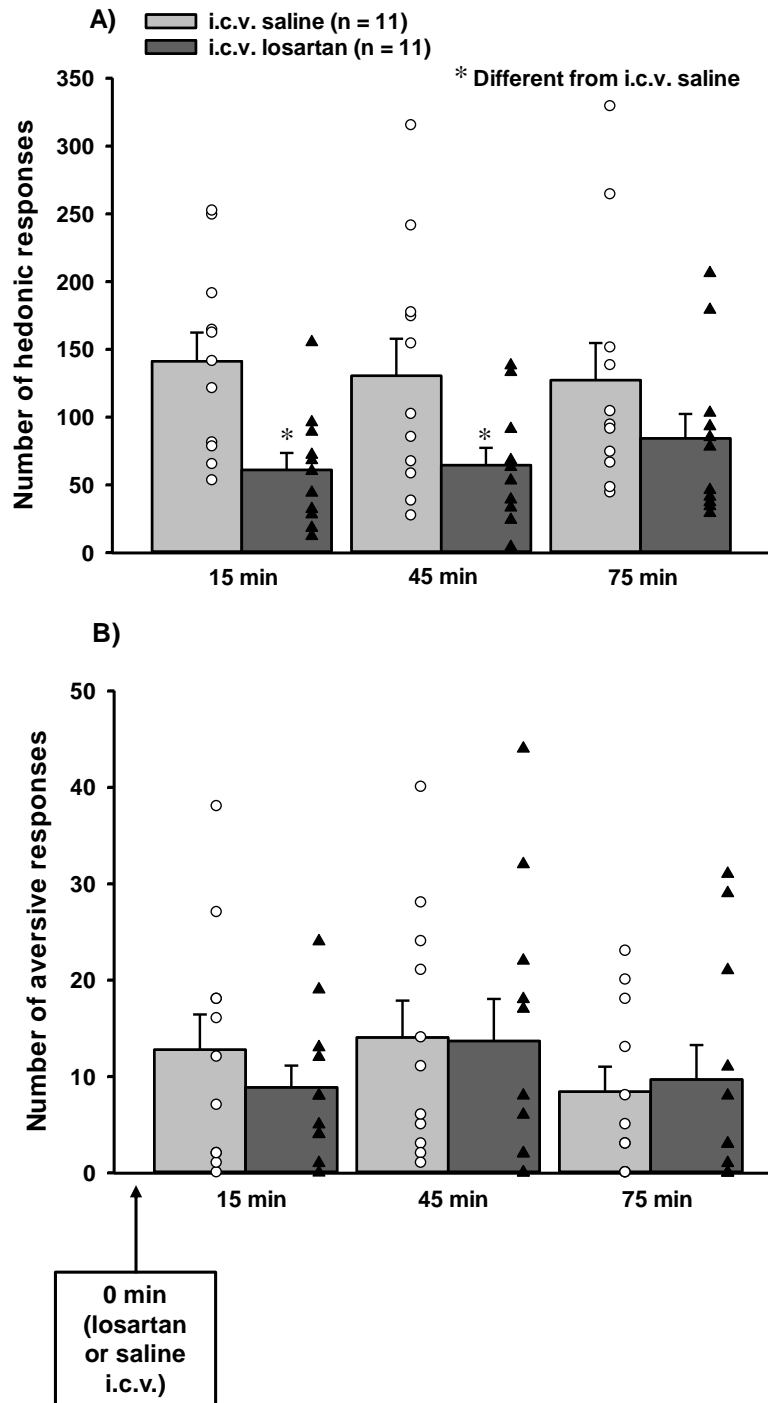


Figure 1.5: Number of A) hedonic and B) aversive responses to IO infusion of 0.3 M NaCl in euhydrated condition in SHRs after the treatment with i.c.v. losartan (100 ng/1 μ l) or saline while they had free access to 0.3 M NaCl and water to ingest. Bars represent results expressed as means \pm SEM; \circ and \blacktriangle , individual data for saline and losartan i.c.v., respectively. n = number of rats. Results analyzed by two-way repeated measures ANOVA (one factor repetition) and Student Newman Keuls test.

Table 1.2: Cumulative 0.3 M NaCl and water intake in euhydrated SHR_s treated with i.c.v. losartan or saline.

I.c.v. treatment	30 min	60 min
<i>0.3 M NaCl intake (ml)</i>		
Saline	0.32 ± 0.19	0.45 ± 0.21
Losartan	0.04 ± 0.02	0.06 ± 0.02
<i>Water intake (ml)</i>		
Saline	0.69 ± 0.27	1.41 ± 0.47
Losartan	0.16 ± 0.46	0.05 ± 0.18*

Results expressed as means ± SEM. n = 11 rats. * Different from saline. Losartan (100 ng/1 µl).

1.5. *Changes in arterial pressure and HR in SHR treated with losartan i.c.v. in euhydrated condition or after WD-PR*

For the changes in MAP, ANOVA showed no significant difference between conditions [$F(1,5) = 1.00$; $p = 0.36$] and treatments [$F(4,20) = 0.41$; $p = 0.80$] and no significant interaction between conditions and treatments [$F(4,20) = 0.70$, $p = 0.60$] (Table 3). For the changes in HR, ANOVA showed no significant difference between conditions [$F(1,5) = 0.62$; $p = 0.47$] or treatments [$F(4,20) = 0.17$; $p = 0.95$] and no interaction between conditions and treatments [$F(4,20) = 0.29$; $p = 0.88$] (Table 3). Therefore, losartan injected i.c.v. produced no change in MAP and HR in SHR in euhydrated condition of after WD-PR compared to i.c.v. saline in the same condition (Table 3).

Baseline MAP and HR in SHR were not different after water deprivation-partial rehydration compared to euhydrated condition (paired t-test: $t = 1.88$, DF 5; $p = 0.12$ and $t = 2.01$, DF 5; $p = 0.10$, respectively) (Table 3). MAP and HR were similar to euhydrated condition in SHR treated with i.c.v. losartan after 2 h of access to 0.3 M NaCl and water (185 ± 5 mmHg and 397 ± 21 bpm, respectively, vs. euhydrated: 183 ± 7 mmHg and 416 ± 12 bpm, respectively) (paired t test: $t = -0.379$, DF 5; $p = 0.72$ for MAP and $t = 0.109$, DF 5; $p = 0.97$ for HR).

Table 1.3: Changes in MAP and HR in SHR after i.c.v. injection of saline or losartan in euhydrated condition or after water deprivation-partial rehydration

Condition	Baseline pre- saline	i.c.v. saline	i.c.v. losartan			
			0'	5'	10'	20'
	MAP (mmHg)	Changes in MAP (mmHg)				
Euhydrated	183 ± 8	-1 ± 1	1 ± 1	-1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
After WD-PR	171 ± 5	1 ± 1	-2 ± 1	-2 ± 1	-2 ± 1	-1 ± 1
	HR (bpm)	Changes in HR (bpm)				
Euhydrated	416 ± 13	-10 ± 6	-5 ± 5	-9 ± 6	-9 ± 6	-9 ± 7
After WD-PR	380 ± 9	4 ± 2	-1 ± 9	-6 ± 14	-2 ± 11	-6 ± 8

Results expressed as means ± SEM. n = 6 rats. WD-PR, water deprivation-partial rehydration. i.c.v., intracerebroventricular. Losartan (100 ng/1 µl). Results analyzed by two-way RM ANOVA or Student t test.

4. DISCUSSION

The present results show that the number of hedonic responses to IO 0.3 M NaCl in euhydrated condition was higher in SHR than in normotensive rats, without difference in the number of aversive responses. In normotensive rats, FURO + CAP increased the number of orofacial hedonic responses and reduced the number of aversive responses to IO 0.3 M NaCl in relation to euhydrated condition. The changes in orofacial responses produced by FURO + CAP treatment in normotensive rats were reversed after the ingestion of 0.3 M NaCl and water. In SHR, neither FURO + CAP treatment nor fluid intake altered the number of hedonic and aversive responses.

The blockade of brain AT1 receptors with losartan in SHR reduced the number of hedonic responses to IO 0.3 M NaCl in the taste reactivity test performed after a cycle of WD-PR. Losartan also abolished the increase in 0.3 M NaCl intake. However, the effect on orofacial responses persisted for 30 min and returned to pre-injection level at 60 min of the test, when 0.3 M NaCl intake was still abolished. Losartan also reduced the high hedonic responses that SHR showed to IO 0.3 M NaCl in euhydrated condition, with no effect on aversive responses. Similar to the responses after WD-PR, orofacial responses returned to pre-injection level 75 min after losartan in euhydrated condition.

It has been proposed that continued or prolonged licking to NaCl solutions in SHR may indicate reduced negative feedback which typically signals satiety (FLYNN; CULVER; NEWTON, 2003). The present results suggest that neither acute fluid-depletion nor NaCl intake affects NaCl palatability in SHR, which is in part consistent with the suggestion that the changes in licking rate of NaCl solutions shown by SHR result from impaired sensory negative feedback necessary to produce satiety. It is possible that NaCl palatability impervious to NaCl intake reduces the negative feedback information in SHR. However, the present results seem to show more than that. They also suggest that neither production nor satiation of NaCl need affects the rewarding effect of the salty taste in SHR.

In normotensive rats, FURO + CAP increased the number of orofacial hedonic responses and reduced the number of aversive responses to IO 0.3 M NaCl in relation to euhydrated condition. Such changes were reversed after the ingestion of 0.3 M NaCl and water. Contrasting with normotensive rats, FURO + CAP produced a significant decrease in blood pressure in SHR, but water and 0.3 M NaCl intake was not different from normotensive rats. Although this acute decrease of about 40 mmHg in blood pressure in SHR after FURO + CAP treatment might affect the ingestive test, previous studies (DI

NICOLANTONIO; MENDELSON; HUTCHINSON, 1983; MAY; PARSONS, 1983) showed that decrease in blood pressure (with hydralazine) to reach normotensive levels did not change daily 0.9 % NaCl intake by SHR. Moreover, the maintenance of elevated number of hedonic responses in SHR in different conditions of fluid balance (euhydrated, dehydrated or after fluid repletion) suggests that NaCl palatability in SHR is not affected by changes in fluid balance. A question that remains is if the high number of hedonic responses in euhydrated condition might prevent SHR from exhibiting an even greater number of hedonic responses after FURO + CAP or WD-PR.

Water deprivation-partial rehydration produced no change in arterial pressure in SHR [(PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010) and present results] and again, the maintenance of elevated number of hedonic responses in SHR was observed in different conditions, i.e., after WD-PR or 30 and 60 min after the ingestion of 0.3 M NaCl and water (intake test). I.c.v. losartan abolished WD-PR-induced 0.3 M NaCl intake in SHR, without changing arterial pressure, which suggests that central angiotensinergic mechanisms involved in the control of water and NaCl intake are not important for the maintenance of hypertension in SHR.

Whereas NaCl intake depended totally on brain AT1 receptor activation, NaCl palatability depended only partially on these receptors. It seems that a system responsible for NaCl palatability somehow overcame the blockade of brain ANG II receptors, thus allowing NaCl taste “good” in spite of the inhibition of NaCl intake. This resembles the dissociation found in neural dopaminergic mechanisms that control “wanting” and “liking” of sweet taste (BERRIDGE; KRINGELBACH, 2008). How much of the present results overlap with the evidence of hyperactivity of the mesolimbic system in SHR (PAPA et al., 2002) or to a non-specific enhanced “liking” of other tastes remains open to further investigation.

The increased daily 0.3 M NaCl intake by SHR compared to normotensive rats can be related to the increased palatability in euhydrated condition in SHR as shown in the present study. In addition, the blockade of central angiotensinergic production decreases NaCl intake in SHR, suggesting that the increase in NaCl intake in SHR may also depend on a central hyperactivity of the renin-angiotensin system as previously proposed (DINICOLANTONIO; HUTCHINSON; MENDELSON, 1982; DI NICOLANTONIO et al., 2004). An increased activity in the efferent pathways from the subfornical organ to the median preoptic nucleus was demonstrated in SHR when compared to normotensive rats (TANAKA et al., 1995). More Fos-IR was expressed in the lamina terminalis in SHR in

response to either central or systemic infusions of ANG II (ROWLAND et al., 1995; BLUME et al., 1997), as well as in the subfornical organ after WD-PR (Pereira-Derderian et al. 2010). The present results suggest a partial dissociation between NaCl intake and palatability in SHR. Although hedonic responses to IO 0.3 M NaCl returned to elevated levels 60 min after the i.c.v. injection of losartan, NaCl intake was still abolished, which suggests that NaCl intake depends on central AT1 receptor activation even in a condition of increased palatability. On the other hand, high levels of palatability were detected in SHR when central AT1 receptors were still blocked (60 min after losartan), which suggests that additional mechanisms not dependent on central AT1 receptor activity are also involved in the increased palatability in SHR. And the increased palatability alone in SHR do not necessarily cause ingestion of NaCl, a behavior that also depends on the activity of central AT1 receptors, i.e., depends also on the activity of facilitatory mechanisms. Therefore, the robust daily NaCl intake by SHR likely results from increased palatability of NaCl, in conjunction with AT1 receptor activation.

Contrary to the effect of central AT1 receptor activation increasing NaCl palatability in SHR, it was reported that ANG II acting peripherally on AT1 receptors in taste cells reduces NaCl palatability in normotensive rats (SHIGEMURA et al., 2013). The investigation of this peripheral mechanism of ANG II on AT1 receptors in taste cells in SHR is important to answer questions about the palatability in SHR. In the same direction, it is also possible that SHR are less responsive to inhibitory signals produced by the ingestion of NaCl, which is similar to normotensive rats with blockade of inhibitory mechanisms of the lateral parabrachial nucleus (LPBN) (ANDRADE et al., 2011). Therefore, studies might also investigate the pathways that convey inhibitory signals including central integration of inhibitory signals in SHR, particularly the modulation of palatability and NaCl intake by the LPBN mechanisms.

5. CONCLUSION

The present results suggest that NaCl palatability is elevated in SHR and independent from body fluid balance. The results also suggest that central AT1 receptors are part of the mechanisms activated to increase NaCl intake and palatability in SHR. In addition, a partial dissociation between NaCl intake and palatability in SHR is suggested. More studies are necessary to better understand the correlation among palatability, NaCl intake and central AT1 receptor activity in SHR, particularly the dissociation between NaCl intake and

palatability when central AT1 receptors are blocked in fluid depleted SHR. In this direction, investigation might try to find why treatments like FURO + CAP or the ingestion of hypertonic NaCl produces no change in NaCl palatability in SHR.

REFERENCES

Andrade-Franze GM, Gasparini S, De Luca LA, Jr., De Paula PM, Colombari DS, Colombari E, Andrade CA, Menani JV (2017), Lateral parabrachial nucleus and opioid mechanisms of the central nucleus of the amygdala in the control of sodium intake. *Behav Brain Res* 316:11-17.

Andrade CA, Andrade-Franze GM, De Luca LA, Jr., Johnson AK, Menani JV (2011), Changes in taste reactivity to intra-oral hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an alpha2-adrenergic receptor agonist. *Physiol Behav* 104:702-708.

Andrade CA, Andrade-Franze GM, De Paula PM, De Luca LA, Jr., Menani JV (2014), Role of alpha2-adrenoceptors in the lateral parabrachial nucleus in the control of body fluid homeostasis. *Braz J Med Biol Res* 47:11-18.

Andrade CA, Barbosa SP, De Luca LA, Jr., Menani JV (2004), Activation of alpha2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. *Neuroscience* 129:25-34.

Berridge KC (2000), Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev* 24:173-198.

Berridge KC, Flynn FW, Schulkin J, Grill HJ (1984), Sodium depletion enhances salt palatability in rats. *Behav Neurosci* 98:652-660.

Berridge KC, Kringelbach ML (2008), Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl)* 199:457-480.

Berridge KC, Schulkin J (1989), Palatability shift of a salt-associated incentive during sodium depletion. *Q J Exp Psychol B* 41:121-138.

Blume A, Lebrun CJ, Herdegen T, Bravo R, Linz W, Mollenhoff E, Unger T (1997), Increased brain transcription factor expression by angiotensin in genetic hypertension. *Hypertension* 29:592-598.

De Luca LA, Jr., Pereira-Derderian DT, Vendramini RC, David RB, Menani JV (2010), Water deprivation-induced sodium appetite. *Physiol Behav* 100:535-544.

De Luca LA, Jr., Xu Z, Schoorlemmer GH, Thunhorst RL, Beltz TG, Menani JV, Johnson AK (2002), Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R552-559.

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

Di Nicolantonio R, Mendelsohn FA, Hutchinson JS (1983), Sodium chloride preference of genetically hypertensive and normotensive rats. *Am J Physiol* 245:R38-44.

Di Nicolantonio R, Silvapulle MJ (1988), Blood pressure, salt appetite and mortality of genetically hypertensive and normotensive rats maintained on high and low salt diets from weaning. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15:741-751.

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

Ely D, Turner M, Milsted A (2000), Review of the Y chromosome and hypertension. *Braz J Med Biol Res* 33:679-691.

Fitts DA, Masson DB (1989), Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. *Behav Neurosci* 103:865-872.

- Flynn FW, Culver B, Newton SV (2003), Salt intake by normotensive and spontaneously hypertensive rats: two-bottle and lick rate analyses. *Physiol Behav* 78:689-696.
- Grill HJ, Berridge KC (1985) Taste reactivity as a measure of the neural control of palatability. In: *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology*, vol. (JM S, AN E, eds), pp. 1-61. Orlando: Academic Press.
- He FJ, Macgregor GA (2012), Salt intake, plasma sodium, and worldwide salt reduction. *Ann Med* 44 Suppl 1:S127-137.
- Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K (2008), High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 31:2075-2083.
- Lakens D (2013), Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Front Psychol* 4:863.
- May CN, Parsons BJ (1983), Salt and water intake and sodium and potassium excretion in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 10:63-70.
- Menani JV, Sato MA, Haikel L, Vieira AA, de Andrade CA, da Silva DC, Renzi A, De Luca LA, Jr. (1999), Central moxonidine on water and NaCl intake. *Brain Res Bull* 49:273-279.
- Mente A, O'Donnell MJ, Rangarajan S, McQueen MJ, Poirier P, Wielgosz A, Morrison H, Li W, et al. (2014), Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure. *N Engl J Med* 371:601-611.
- Mill JG, Baldo MP, Molina M, Schmidt MI, Barreto SM, Chor D, Griep RH, Matos SM, et al. (2019), Sex-specific patterns in the association between salt intake and blood pressure: The ELSA-Brasil study. *J Clin Hypertens (Greenwich)* 21:502-509.
- Ohta Y, Ohta K, Ishizuka A, Hayashi S, Kishida M, Iwashima Y, Yoshihara F, Nakamura S, et al. (2015), Awareness of salt restriction and actual salt intake in hypertensive patients at a hypertension clinic and general clinic. *Clin Exp Hypertens* 37:172-175.
- Okamoto K, Aoki K (1963), Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27:282-293.
- Papa M, Diewald L, Carey MP, Esposito FJ, Gironi Carnevale UA, Sadile AG (2002), A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an anterior hypo- and a posterior hyperfunctioning mesocorticolimbic system. *Behav Brain Res* 130:171-179.
- Pereira-Derderian DT, Vendramini RC, Menani JV, De Luca LA, Jr. (2010), Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R1298-1309.
- Pereira ED, Jr., Dantas RM, Andrade-Franze GMF, De Luca LA, Jr., Menani JV, Andrade CAF (2019), Estradiol modulates the palatability of 0.3M NaCl in female rats during sodium appetite. *Appetite* 133:252-261.
- Roncari CF, David RB, De Paula PM, Colombari DSA, De Luca LA, Jr., Colombari E, Menani JV (2017), The lateral parabrachial nucleus and central angiotensinergic mechanisms in the control of sodium intake induced by different stimuli. *Behav Brain Res* 333:17-26.
- Rowland NE, Li BH, Fregly MJ, Smith GC (1995), Fos induced in brain of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II and co-localization with AT-1 receptors. *Brain Res* 675:127-134.
- Sakaki M, Tsuchihashi T, Arakawa K (2014), Characteristics of the hypertensive patients with good and poor compliance to long-term salt restriction. *Clin Exp Hypertens* 36:92-96.
- Santollo J, Torregrossa AM, Daniels D (2017), Sex differences in the drinking response to angiotensin II (AngII): Effect of body weight. *Horm Behav* 93:128-136.
- Sato MA, Yada MM, De Luca LA, Jr. (1996), Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. *Physiol Behav* 60:1099-1104.
- Shigemura N, Iwata S, Yasumatsu K, Ohkuri T, Horio N, Sanematsu K, Yoshida R, Margolskee RF, et al. (2013), Angiotensin II modulates salty and sweet taste sensitivities. *J Neurosci* 33:6267-6277.

Tanaka J, Yamamuro Y, Saito H, Matsuda M, Nomura M (1995), Differences in electrophysiological properties of angiotensinergic pathways from the subfornical organ to the median preoptic nucleus between normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Exp Neurol* 134:192-198.

Thunhorst RL, Johnson AK (1994), Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. *Am J Physiol* 266:R458-465.

Thunhorst RL, Xu Z, Cicha MZ, Zardetto-Smith AM, Johnson AK (1998), Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. *Am J Physiol* 274:R1807-1814.

Veerasingham SJ, Raizada MK (2003), Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br J Pharmacol* 139:191-202.

WHO (2012) In: *Guideline: Sodium Intake for Adults and Children*, vol. Geneva.

Wilczynski EA, Leenen FH (1987), Dietary sodium intake and age in spontaneously hypertensive rats: effects on blood pressure and sympathetic activity. *Life Sci* 41:707-715.

Zenatti AA, Pereira ED, Jr., Possari J, Andrade CAF, Menani JV, De Luca LA, Jr. (2020), Interference with the renin-angiotensin system reduces the palatability of 0.3 M NaCl in sodium-deplete rats. *Appetite* 158:105037.

Capítulo 2

**TASTE PALATABILITY PROFILE IN SPONTANEOUSLY
HYPERTENSIVE RATS SUBMITTED TO WATER
DEPRIVATION - PARTIAL REHYDRATION**

ABSTRACT

The 24 h of water deprivation + 2 h of partial rehydration (WD-PR) protocol allows the rat to quench its thirst ingesting only water during the PR, thereby separating thirst from sodium appetite. The spontaneously hypertensive rats (SHRs) have enhanced palatability for NaCl taste as measured by the increased number of hedonic versus aversive responses to intraoral infusion (1 ml/min) of 0.3 M NaCl, in a taste reactivity test in euhydrated or fluid depleted condition. Here, we investigated whether the same applies to other taste solutions infused intraorally, to SHRs (n=8-10) in euhydrated condition or at the end of a cycle of WD-PR. SHRs had similar number of hedonic responses to 2% sucrose, whether after WD-PR (142 ± 25) or in euhydrated condition (95 ± 19), responses increased when compared to Holtzman normotensive rats (n=8-10) after WD-PR (21 ± 6) or in euhydrated condition (13 ± 3). SHRs also showed increased number of aversive responses to 1.4 mM quinine sulphate compared to normotensive rats, whether euhydrated (86 ± 6 , vs. normotensive: 54 ± 7) or at the end of a cycle of WD-PR (89 ± 9 , vs. normotensive: 40 ± 9). The results suggest that similar to NaCl taste, sweet taste responses are increased in SHRs and resistant to challenges in bodily fluid balance. They also showed a more intense aversive response in SHRs to bitter taste compared to normotensives. This suggests that the enhanced response of SHRs to taste rewards does not correspond to a decreased response to a typical aversive taste.

1. INTRODUCTION

It is possible to evaluate the influence of different treatments on palatability recording the motor orofacial responses of the rat to minute intraoral infusions of taste solutions (taste reactivity test) with no significant post-ingestive consequences (GRILL; NORGREN, 1978; BERRIDGE, 2000; 2018). Using the taste reactivity test, it was previously demonstrated that normotensive rats display increased number of hedonic reactions and insignificant number of aversive reactions to intraoral infusions of sucrose solutions (CABANAC; LAFRANCE, 1990; BERRIDGE, 1991; BRESLIN; SPECTOR; GRILL, 1992; GRILL; SCHWARTZ; TRAVERS, 1992; CLARKE; OSSENKOPP, 1998), showing that sweet taste has a potent hedonic impact (BERRIDGE, 2000).

Sodium-depleted rats have a very selective ingestive behavior towards sodium salts, particularly to those with salty taste such as NaCl (RICHTER; ECKERT, 1938; SCHULKIN, 1991; BRESLIN; SPECTOR; GRILL, 1993). In addition, sodium depletion enhances above unity the hedonic:aversive orofacial motor response ratio to intraoral infusions of hypertonic NaCl (BERRIDGE et al., 1984). In other words, one can say that sodium depletion makes hypertonic NaCl more “hedonic” or palatable (BERRIDGE et al., 1984; SCHULKIN, 1991).

The spontaneously hypertensive rats (SHRs), animal model of essential hypertension (OKAMOTO; AOKI, 1963) with hyperactive RAS, have increased hypertonic saline (NaCl) intake, in two bottle (water and saline) tests, even under normovolemic conditions (DINICOLANTONIO; HUTCHINSON; MENDELSON, 1982; WILCZYNSKI; LEENEN, 1987; DI NICOLANTONIO; SILVAPULLE, 1988; TANAKA et al., 1995; ELY; TURNER; MILSTED, 2000; VEERASINGHAM; RAIZADA, 2003; DI NICOLANTONIO et al., 2004; KOGA et al., 2008). We have shown recently that SHRs also have enhanced palatability for NaCl taste as measured by the increased number of hedonic versus aversive responses to intraoral infusion (1 ml/min) of 0.3 M NaCl, in a taste reactivity test, whatever their body-fluid status (PEREIRA et al., 2021).

Previous data from the literature have shown that SHRs have increased preference for sucrose compared to normotensive strains. SHRs had unremarkable intakes of low concentrations of sucrose (10 – 50 mM), but notably high intakes of high concentration of sucrose solution (100 mM) when compared to other normotensive strains (TORDOFF; ALARCON; LAWLER, 2008). During a sucrose preference testing in the home cage, SHR drank significantly more 4% (0,15 M) sucrose than both Wistar Kyoto (WKY) and Wistar

rats, with no change in food intake among strains (DOMMETT; ROSTRON, 2013). Considering bitter taste, previous study showed no differences in quinine hydrochloride (QHCl) intake (0.01 mM – 1 mM) among SHRs and other normotensive strains (TORDOFF; ALARCON; LAWLER, 2008). However, SHRs showed increased glossopharyngeal nerve response to 2.5 mM and 25 mM quinine hydrochloride when compared to WKY rats (FORMAKER; HILL, 1991).

Here we investigated whether SHRs would also show differences in taste profile to other tastes (2% sucrose, 1.4 mM quinine sulphate and water), infused intraorally, when compared to normotensive rats. Considering that SHRs have increased NaCl palatability whatever their body-fluid status, the palatability to other tastes was tested under euhydrated condition or with appetite or motivated to ingest substantial amounts of 0.3 M NaCl. To induce sodium appetite, it was used the 24 h of water deprivation + 2 h of partial rehydration (WD-PR) protocol, which allows the rat to quench its thirst ingesting only water during the PR, thereby separating thirst from sodium appetite (SATO; YADA; DE LUCA, 1996; DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Animals

Male normotensive Holtzman rats (n = 10) and spontaneously hypertensive rats (SHRs, n = 10) bred in the facility at School of Dentistry - São Paulo State University - Araraquara – SP, weighing 180 – 200 g in the beginning of the tests were used. Rats were individually housed in stainless steel cages with free access to normal sodium diet (0.5–1.0%, Guabi rat chow, Paulínia, SP, Brazil), water and 0.3 M NaCl to ingest. Temperature was maintained at 23 ± 2 °C and humidity at $55 \pm 10\%$ on a 12:12 light–dark cycle with light onset at 7:00 AM. All tests were done during the light phase (from 08:00 AM to 4:00 PM). The Ethical Committee for Animal Care and Use from the Dentistry School of Araraquara, UNESP approved the experimental protocols used in the present study (protocol 24/2016). The protocols followed the recommendations from the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA).

2.2. Implant of intraoral cannulas

Rats received implant of an intraoral (IO) cannula under anesthesia with ketamine (80 mg/kg of body weight) combined with xylazine (7 mg/kg of body weight) i.p. The IO cannula consisted of a polyethylene tubing (PE 50) with a flared end threaded through a silicon washer (endodontic stop). A 23 G needle bridged the other end to an 18 G needle. The beveled end of the 18 G needle remained free to guide the whole cannula/needle system from the mouth through the inner limit of masticatory muscle facing the temporal bone under the zygomatic arch and tunneling under the skin caudal to the eye to exit on the top of the skull. The washer ended resting against the mucobuccal fold region near to the first and second molar teeth. The bridged needles were replaced by a 10 mm 23 G stainless steel cannula, thus constituting the “infusion end” of IO cannula to be anchored to the top skull surface with acrylic resin and jeweler screws. The IO cannula does not interfere with the normal eating behavior of the rat and allow the direct infusion of solutions into the mouth.

2.3. Taste reactivity test

To all rats with IO cannula were given a 3-day habituation period, when they were exposed to the square glass taste reactivity chamber (25 x 25 cm) for 10 min, before receiving an IO infusion of 1 ml of water during 1 min.

In each taste reactivity test, IO infusions (1 ml during 1 min) of 0.3 or 0.5 M NaCl, 2% sucrose and 1.4 mM quinine sulphate solutions were performed connecting a syringe to the IO cannula with polyethylene tubing. The speed of the infusion was controlled using a Harvard pump (Syringe Pump Model 33). The behavior of each rat during the IO infusions of taste solutions was videotaped via a mirror mounted beneath the transparent floor of the taste reactivity chamber. The recorded image was enlarged so the face and mouth of the rat filled the entire screen. See appendix for details of taste reactivity apparatus (Appendix 2.1). The behavior of each rat was scored for the occurrence of hedonic (ingestive) and aversive (rejection) taste reactivity components [see (GRILL; BERRIDGE, 1985) for a description and discussion of taste reactivity analysis, components and classification]. Hedonic responses were considered: paw licking, lateral tongue protrusions (non-rhythmic tongue protrusions past the lip followed by forward extension) and rhythmic tongue protrusions along the midline. Neutral responses were considered: mouth movements and passive dipping. Aversive responses were considered: gapes (large openings of the mandible and retraction of the lower lips); face washing (either a single wipe over the face with the paws or a bout of several wipes); forelimb flails (shaking of the forelimb); head shaking; paw

treading, planting of the limbs on the floor and alternating forceful strikes forward and backward; and rapid locomotion around the chamber. For examples of ingestive and aversive reactions, please see BERRIDGE, 2022. Videotapes were scored in a slow-motion analysis, without the observer knowing the treatment condition. The means for hedonic or aversive score were computed for each group. The hedonic or aversive scores were independently analyzed, since they represent phenomenological different categories of behavior (GRILL; BERRIDGE, 1985; BERRIDGE, 2000; ANDRADE et al., 2011; PEREIRA et al., 2019).

2.4. Measurements of water and NaCl intake

Rats were tested in their home cages with no access to food during the test. Water and 0.3 M NaCl were provided from burettes with 0.1 ml divisions that were fitted with metal drinking spouts.

2.5 Statistical analysis

The results are reported as means \pm SEM. Student's *t* test was used to compare water intake during PR. Two-way ANOVA (using strains and conditions as factors) and Student Newman Keuls test were used to analyze fluid intake and taste reactivity. Differences were considered significant at $P < 0.05$. Data were analyzed for normality and homogeneity of variance prior to conducting ANOVAs. Effect sizes were calculated as Cohen's *D* for significant *t*-tests (<https://www.spss-tutorials.com/downloads/Cohens-d.xlsx>) and partial eta squared (η_p^2) for significant ANOVAs (LAKENS, 2013).

3. EXPERIMENTAL PROTOCOL

3.1. NaCl intake and taste reactivity to IO taste solutions in water deprived-partial dehydrated (WD-PR) normotensive rats and SHR

Orofacial motor responses to 1 min infusion of IO distilled water, 0.3 M NaCl, 0.5 M NaCl, 2% sucrose or 1.4 mM quinine sulphate, in random sequence, were recorded under basal conditions. Rats were deprived of water and 0.3 M NaCl, with free access to food for 24 h (WD). At the end of this period, a glass burette containing filtered water was offered for 2 h (PR) (DE LUCA et al., 2010). At the end of the PR, orofacial motor responses to 1 min infusion of taste solutions were recorded. Immediately after stopping this recording of

the taste reactions, a glass burette containing 0.3 M NaCl was added to the cage. Water and 0.3 M NaCl intake measurements and the recordings of orofacial motor responses to IO taste solutions were performed again after the access to 0.3 M NaCl to ingest during 60 min. To record taste reactions, rats were moved from their home cages to the taste reactivity chamber. At the end of each taste reaction recording session, rats were moved back to their home cages where they had water and 0.3 M NaCl available to ingest.

Each rat was submitted to two tests. In each test, the group of rats was divided in two; half of the group received two of the taste solutions, and the remaining rats the other three. After a 48-h interval, the same protocol was repeated in the same rats in a counterbalanced design. Taste solutions (distilled water, 0.3 M NaCl, 0.5 M NaCl, 2% sucrose or 1.4 mM quinine sulphate) were infused in random sequence. The IO cannula was empty, rinsed with 0.1 ml of distilled water and emptied again before the following infusion, with a 5 min-interval between the next one. See the scheme of this protocol in the appendix, item 2.2

4. RESULTS

4.1. NaCl intake during sodium appetite test in WD-PR normotensive rats and SHRs

SHRs ingested less water during the partial rehydration compared to normotensive rats (SHR: 9.4 ± 0.4 , vs. normotensive rats: 14.5 ± 0.8 ml/2 h) ($t_{(18)} = 5.59$, $p < 0.001$; Cohen's D: -2.5). However, SHRs ingested more 0.3 M NaCl and water during the sodium appetite test compared to normotensive rats. (Figure 1). Two-way ANOVA showed differences for 0.3 NaCl intake between strains [$F(1, 36) = 8.3$; $p < 0.05$; η_p^2 : 0.187] and times [$F(1, 36) = 8.5$; $p < 0.05$; η_p^2 : 0.19], with no interaction between strains and times [$F(1, 36) = 3.2$; $p > 0.05$] (Figure 1A). Two-way ANOVA showed differences for water intake between strains [$F(1, 36) = 23.9$; $p < 0.001$; η_p^2 : 0.399] and times [$F(1, 36) = 5.6$; $p < 0.05$; η_p^2 : 0.134], with no interaction between strains and times [$F(1, 36) = 0.04$; $p > 0.05$] (Figure 1B).

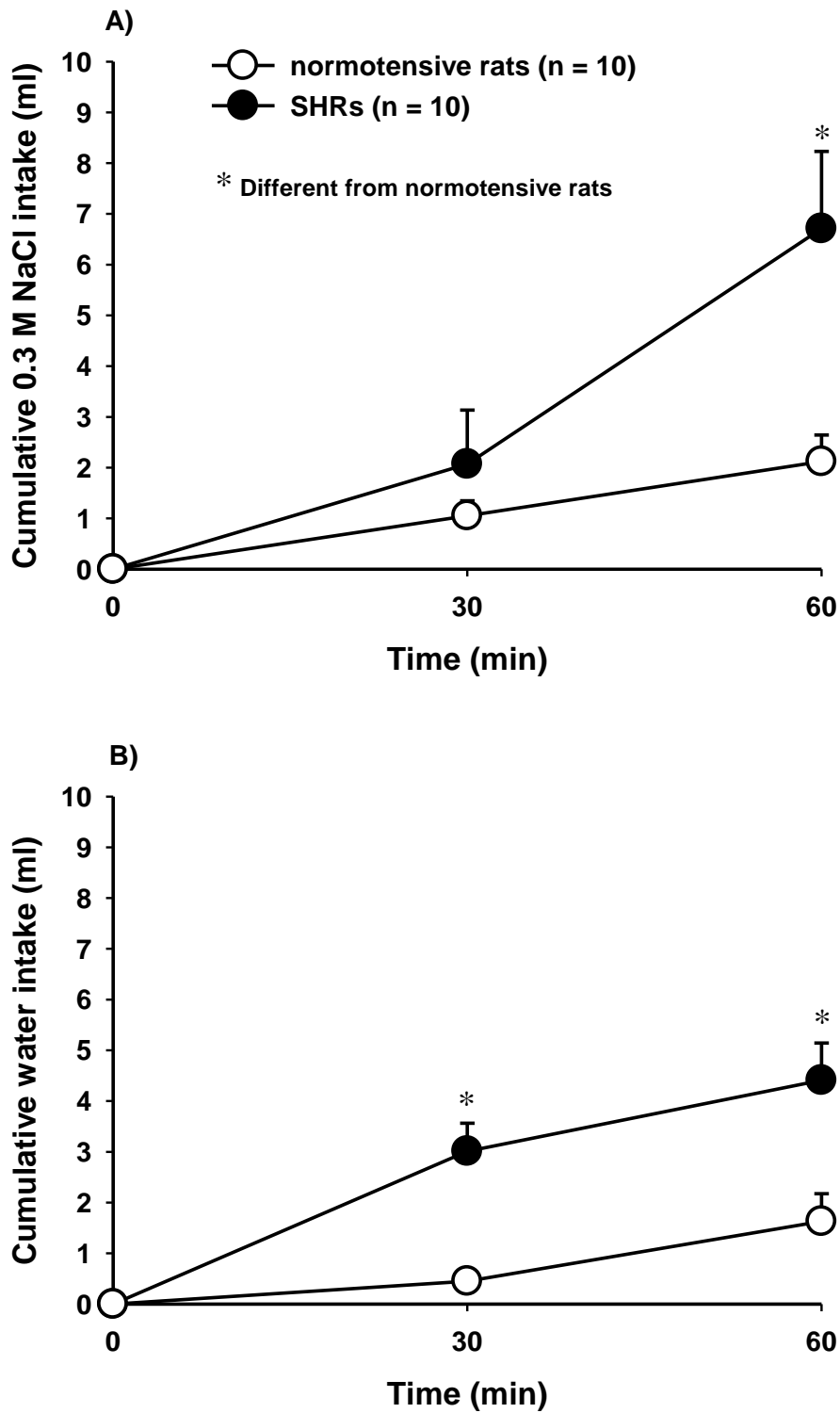


Figure 2.1: Cumulative **A)** 0.3 M NaCl and **B)** water intake during the sodium appetite test by SHRs and normotensive rats tested for taste reactivity to IO taste solutions after 24 h of WD-PR. Results expressed as means \pm SEM. n = number of rats. Results analyzed by two-way ANOVA.

4.2. Taste reactivity to IO infusion of 2% sucrose before and after the sodium appetite test in WD-PR normotensive rats and SHRs

SHRs had similar number of hedonic responses to 2% sucrose whether after WD-PR (142 ± 25), after sodium appetite test (104 ± 14) or in euhydrated condition (95 ± 19). In all the cases, these responses were increased in SHRs compared to normotensive rats after WD-PR (21 ± 6), after sodium appetite test (21 ± 5) or in euhydrated condition (13 ± 3). Aversive responses were not different comparing SHRs and normotensive rats.

Two-way ANOVA showed differences for hedonic reactions for 2% sucrose between strains [$F(1, 44) = 71.3$; $p < 0.001$; $\eta_p^2: 0.618$] with no differences between conditions [$F(2, 44) = 2.0$; $p > 0.05$] nor interaction between strains and conditions, [$F(2, 44) = 1.3$; $p > 0.05$] (Figure 2A). For aversive reactions to 2% sucrose there were no difference between strains [$F(1, 44) = 0.19$; $p > 0.05$], conditions [$F(2, 44) = 0.52$; $p > 0.05$] or interaction between strains and conditions, [$F(2, 44) = 0.4$; $p > 0.05$], (Figure 2B).

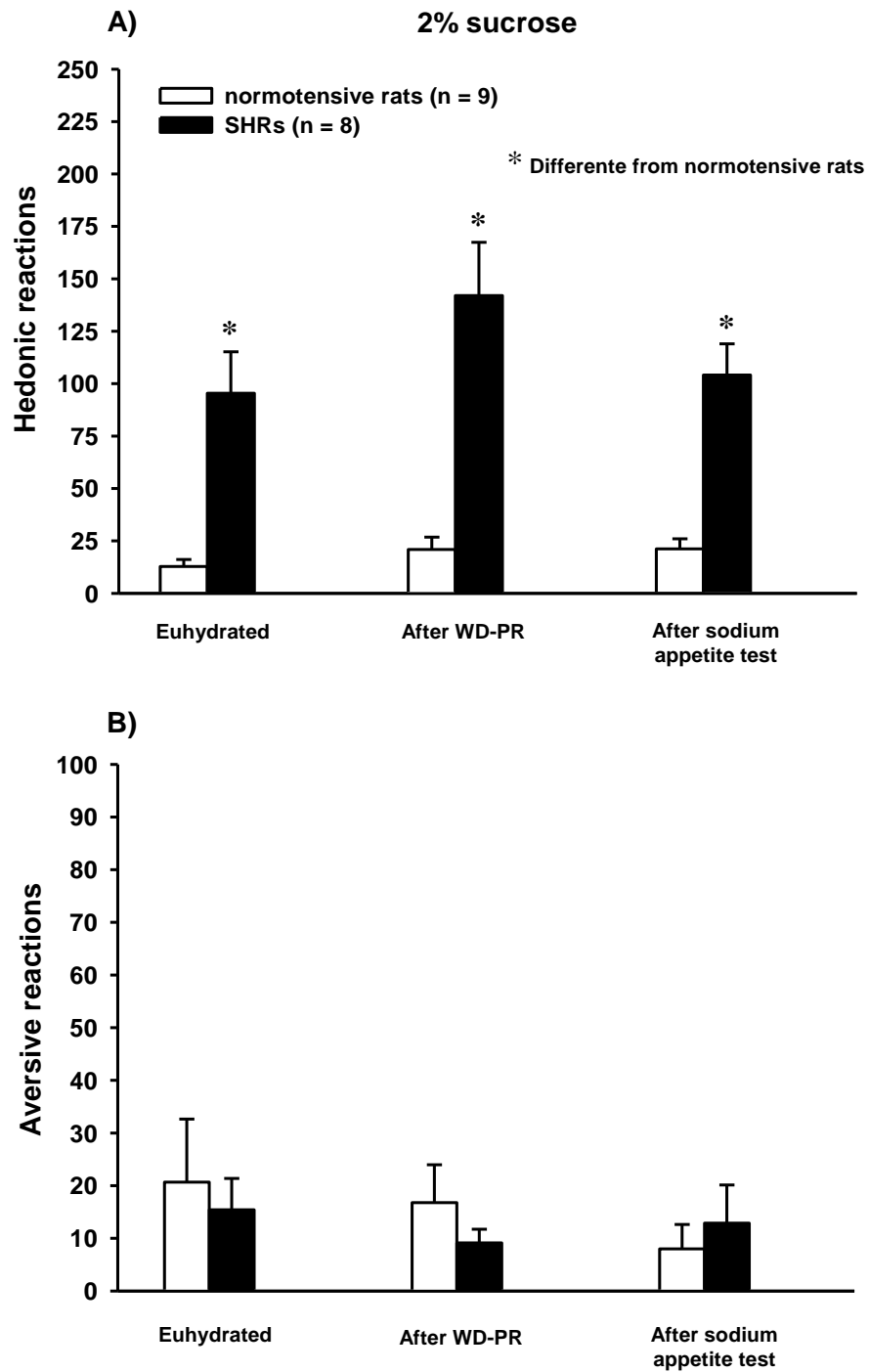


Figure 2.2: Number of **A)** hedonic and **B)** aversive responses to IO infusion of 2% sucrose in euhydrated condition and prior (0 min) and after the sodium appetite test in SHRs and normotensive rats submitted to 24 h of WD-PR. Results expressed as means \pm SEM. n = number of rats. Results analyzed by two-way ANOVA and Student Newman Keuls test.

4.3. Taste reactivity to IO infusion of 1.4 mM quinine sulphate before and after the sodium appetite test in WD-PR normotensive rats and SHRs

SHRs showed increased number of aversive responses to 1.4 mM quinine sulphate compared to normotensive rats whether euhydrated (86 ± 6 , vs. normotensive: 54 ± 7), at the end of a cycle of WD-PR (89 ± 9 , vs. normotensive: 40 ± 9) or after the sodium appetite test (83 ± 6 , vs. normotensive: 39 ± 10) (Figure 3). Hedonic responses to quinine were very low in normotensive rats and absent in SHRs whether euhydrated (euhydrated: 0.4 ± 0.4 , vs. normotensive: 2 ± 1), at the end of a cycle of WD-PR (0 ± 0 , vs. normotensive: 0.6 ± 0.4) or after the sodium appetite test (0 ± 0 , vs. normotensive: 2 ± 1) (Figure 3). Aversive and hedonic responses were not different comparing conditions in each strain.

Two-way ANOVA showed differences for hedonic reactions for 1.4 mM quinine sulphate between strains [$F(1, 48) = 7.37$; $p < 0.05$; $\eta_p^2: 0.133$], with no difference between conditions [$F(2, 48) = 0.82$; $p > 0.05$] or interaction between strains and conditions [$F(2, 48) = 0.89$; $p > 0.05$] (Figure 3A). For aversive reactions to 1.4 mM quinine sulphate, there were differences between strains [$F(1, 48) = 40.3$; $p < 0.001$; $\eta_p^2: 0.456$], but not for conditions [$F(2, 48) = 0.64$; $p > 0.05$] or interaction between strains and conditions, [$F(2, 48) = 0.62$; $p > 0.05$], (Figure 3B).

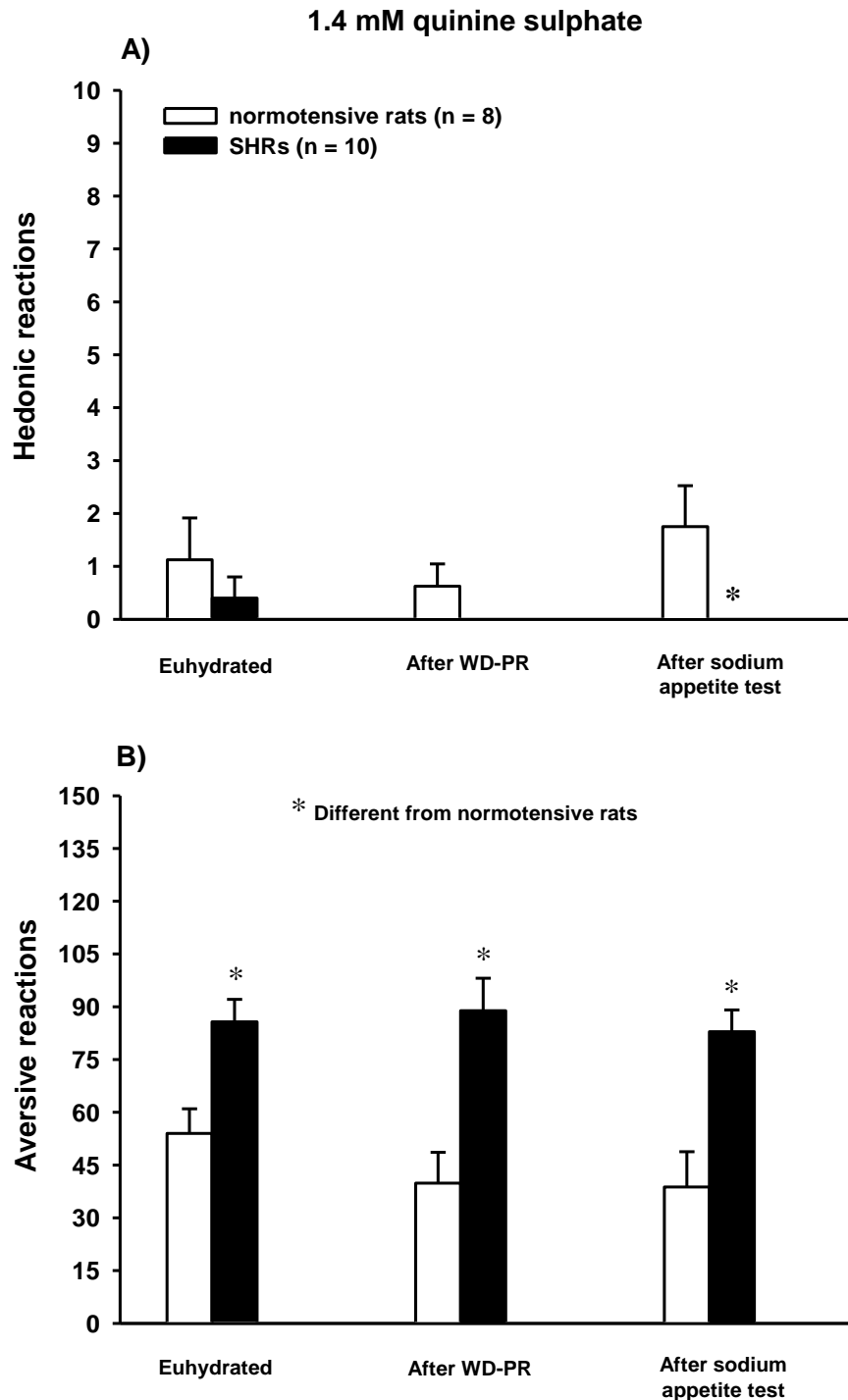


Figure 2.3: Number of **A)** hedonic and **B)** aversive responses to IO infusion of 1.4 mM quinine sulphate in euhydrated condition and prior (0 min) and after the sodium appetite test in SHRs and normotensive rats submitted to 24 h of WD-PR. Results expressed as means \pm SEM. n = number of rats. Results analyzed by three-way ANOVA and Student Newman Keuls test.

4.4. Taste reactivity to IO infusion of 0.3 M NaCl before and after the sodium appetite test in WD-PR normotensive rats and SHRs

Compared to normotensive rats, SHRs had increased number of hedonic responses to 0.3 M NaCl after WD-PR (149 ± 29 ; vs. normotensive rats: 30 ± 14), after sodium appetite test (185 ± 26 ; vs. normotensive rats: 21 ± 10) or in euhydrated condition (146 ± 19 ; vs. normotensive rats: 15 ± 11) (Figure 4A). Aversive responses were also reduced in SHR when compared to normotensive rats after sodium appetite test (14 ± 3 ; vs. normotensive rats: 51 ± 13) (Figure 4B).

Two-way ANOVA showed differences for hedonic reactions to 0.3 M NaCl between strains [$F(1, 48) = 59.4$; $p < 0.001$; $\eta_p^2: 0.55$], with no difference between conditions [$F(2, 48) = 0.5$; $p > 0.05$] or interaction between strains and conditions [$F(2, 48) = 0.6$; $p > 0.05$] (Figure 4A). For aversive reactions to 0.3 M NaCl, there were differences between strains [$F(1, 48) = 14.7$; $p < 0.05$; $\eta_p^2: 0.23$], with no difference between conditions [$F(2, 48) = 0.3$; $p > 0.05$] or interaction between strains and conditions [$F(2, 48) = 1.1$; $p > 0.05$] (Figure 4B).

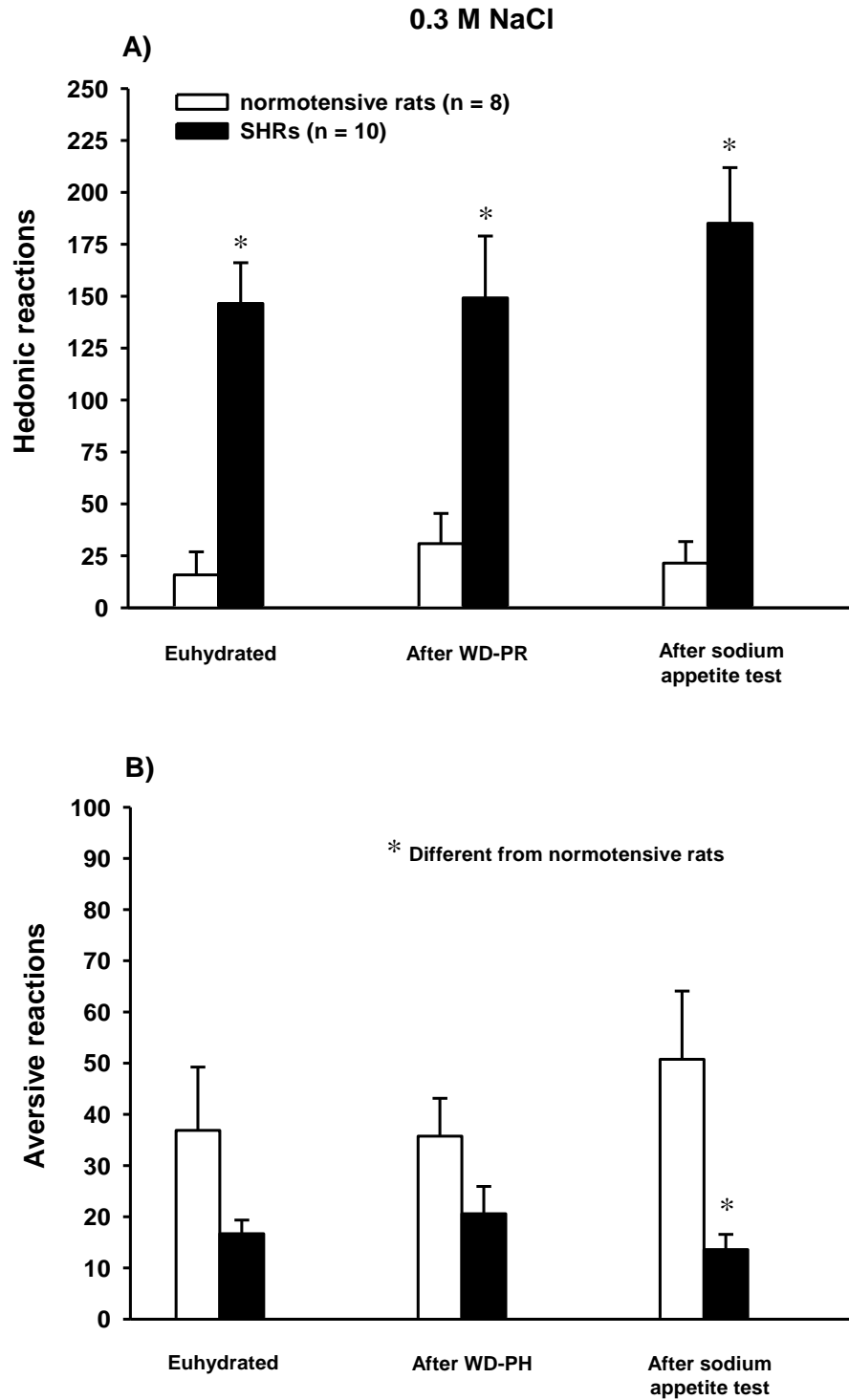


Figure 2.4: Number of **A)** hedonic and **B)** aversive responses to IO infusion of 0.3 M NaCl in euhydrated condition and prior (0 min) and at the end of the sodium appetite test in SHRs and normotensive rats submitted to 24 h of WD-PR. Results expressed as means \pm SEM. n = number of rats. Results analyzed by three-way ANOVA and Student Newman Keuls test.

4.5. Taste reactivity to IO infusion of 0.5 M NaCl before and after the sodium appetite test in WD-PR normotensive rats and SHRs

Compared to normotensive rats, SHRs had increased number of hedonic responses to 0.5 M NaCl after WD-PR (87 ± 21 ; vs. normotensive rats: 9 ± 4), after sodium appetite test (72 ± 28 ; vs. normotensive rats: 3 ± 1) or in euhydrated condition (85 ± 25 ; vs. normotensive rats: 16 ± 4) (Figure 5A). Aversive responses were similar comparing normotensive rats and SHRs (Figure 5B).

Two-way ANOVA showed differences for hedonic reactions for 0.5 M NaCl between strains [$F(1, 54) = 23.8$; $p < 0.001$; $\eta_p^2: 0.31$], but no difference between conditions [$F(2, 54) = 0.3$; $p > 0.05$] or interactions between strains and conditions, [$F(2, 54) = 0.04$; $p > 0.05$] (Figure 5A). For aversive reactions to 0.5 M NaCl, there were no difference between strains [$F(1, 54) = 0.12$; $p > 0.05$], conditions [$F(2, 54) = 0.45$; $p > 0.05$], nor significant interactions between strains and conditions, [$F(2, 54) = 1.36$; $p > 0.05$] (Figure 5B).

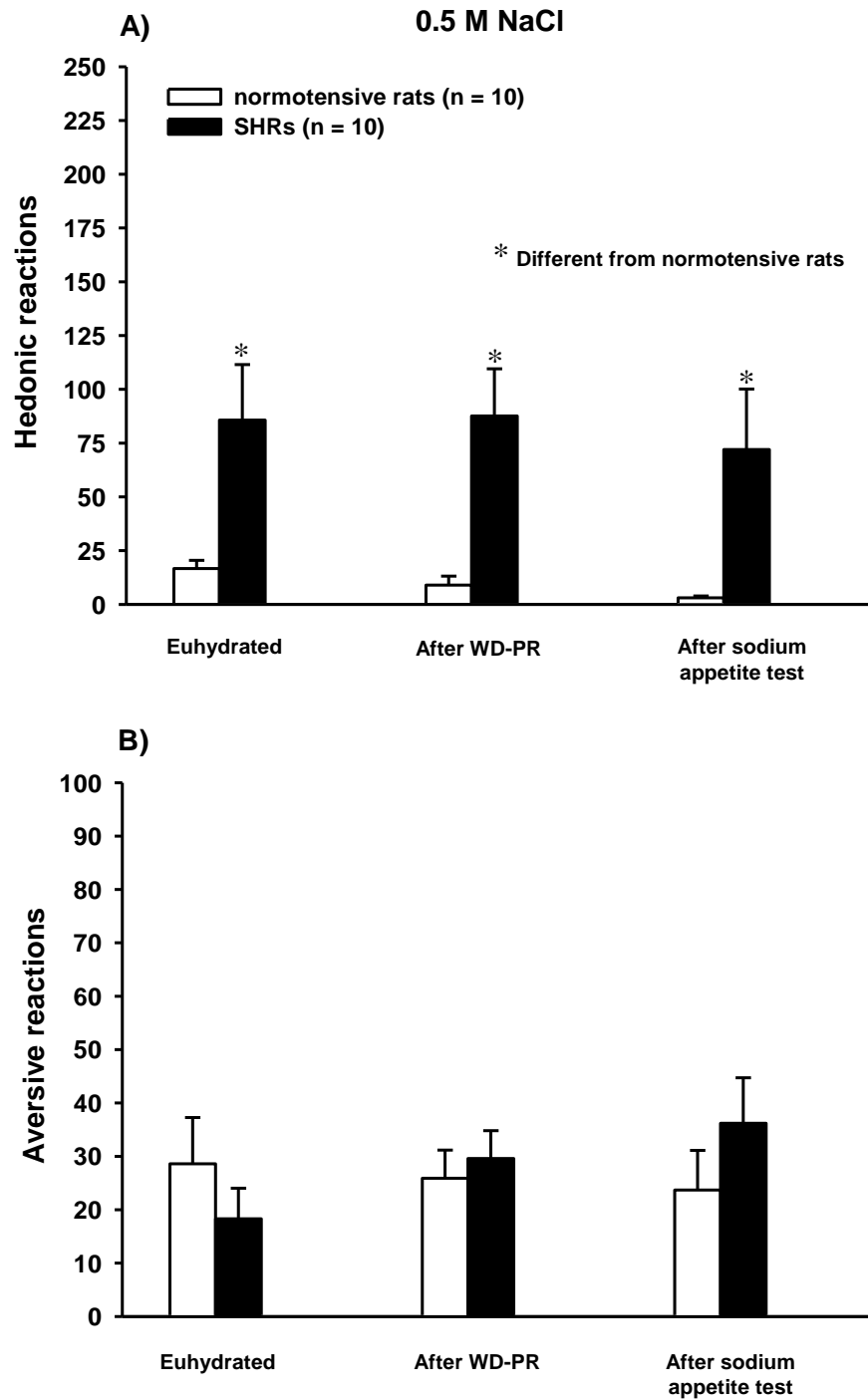


Figure 2.5: Number of **A)** hedonic and **B)** aversive responses to IO infusion of 0.5 M NaCl in euhydrated condition and prior (0 min) and at the end of the sodium appetite test in SHRs and normotensive rats submitted to 24 h of WD-PR. Results expressed as means \pm SEM. n = number of rats. Results analyzed by three-way ANOVA and Student Newman Keuls test.

4.6. Taste reactivity to IO infusion of distilled water before and after the sodium appetite test in WD-PR normotensive rats and SHRs

Compared to normotensive rats, SHRs had increased number of hedonic responses to distilled water after WD-PR (40 ± 9 ; vs. normotensive rats: 3 ± 2) and after sodium appetite test (56 ± 18 ; vs. normotensive rats: 0.3 ± 0.3), not in euhydrated condition (32 ± 16 ; vs. normotensive rats: 9 ± 3) (Figure 6A). SHRs had reduced aversive responses to distilled water after sodium appetite test (22 ± 6 ; vs. normotensive rats: 63 ± 13), not after WD-PR (37 ± 5 ; vs. normotensive rats: 56 ± 9) or in euhydrated condition (20 ± 5 ; vs. normotensive rats: 39 ± 12) (Figure 6B).

Two-way ANOVA showed differences for hedonic reactions for distilled water between strains [$F(1, 50) = 16.8$; $p < 0.001$; $\eta_p^2: 0.25$], but no difference between conditions [$F(2, 50) = 0.28$; $p > 0.05$] or interaction between strains and conditions, [$F(2,50) = 0.36$; $p > 0.05$] (Figure 6A). For aversive reactions, there were differences between strains [$F(1, 50) = 14.4$; $p < 0.001$; $\eta_p^2: 0.22$], but no difference between conditions [$F(2, 50) = 2.4$; $p > 0.05$] or interaction between strains and conditions, [$F(2,50) = 1.1$; $p > 0.05$], (Figure 6B).

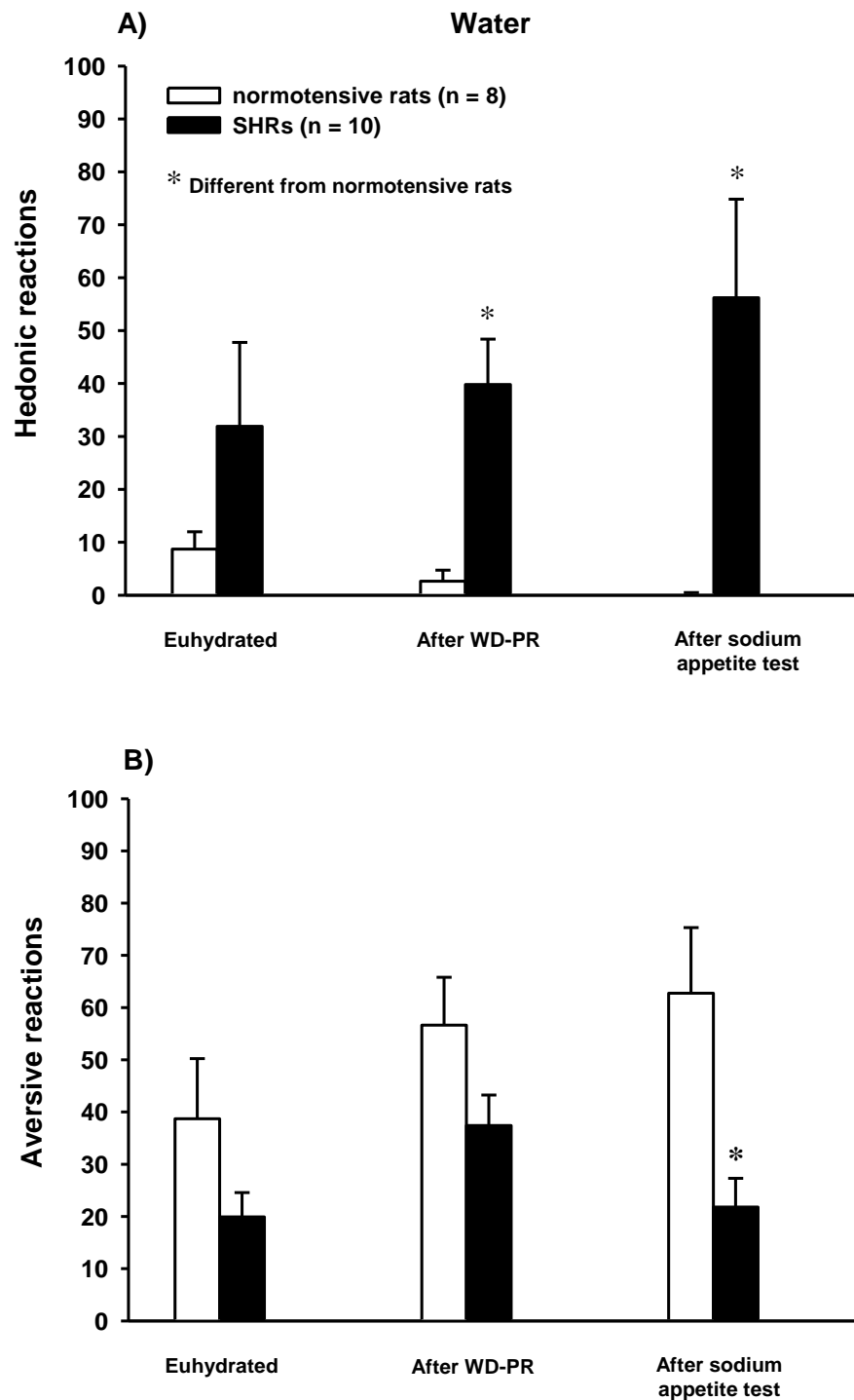


Figure 2.6: Number of **A)** hedonic and **B)** aversive responses to IO infusion of distilled water in euhydrated condition and prior (0 min) and at the end of the sodium appetite test in SHR and normotensive rats submitted to 24 h of WD-PR. Results expressed as means \pm SEM. n = number of rats. Results analyzed by three-way ANOVA and Student Newman Keuls test.

5. DISCUSSION

SHRs had similar number of hedonic responses to 0.3 and 0.5 M NaCl and 2% sucrose whether after WD-PR, after sodium appetite test or in euhydrated condition. In all these conditions hedonic responses to 0.3 and 0.5 M NaCl and 2% sucrose were increased in SHRs compared to normotensive rats. Also, no matter the condition, SHRs showed increased number of aversive responses to 1.4 mM quinine sulphate compared to normotensives. No consistent difference in aversive responses to 0.3 and 0.5 M NaCl or 2% sucrose and on hedonic responses to 1.4 mM quinine sulphate was detected comparing SHRs and normotensive rats. The results suggest that SHRs have increased hedonic responses to solutions 2% sucrose, 0.3 and 0.5 M NaCl or even neutral taste (distilled water), whereas they have increased aversive responses to more non palatable taste solutions (quinine sulphate). Therefore, SHRs have a non-specific increase in taste sensation (hedonic or aversive) that is correlated to the property of the taste stimulus (palatable or not). This also suggests that the enhanced response of SHRs to taste rewards is not correlated to a decreased response to a typical aversive taste.

SHRs had increased 0.3 M NaCl and water intake during the sodium appetite test (induced by WD-PR) when compared to normotensive rats, corroborating previous studies from our laboratory (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010; PEREIRA-DERDERIAN et al., 2016; PEREIRA et al., 2021). Similar to our previous studies (PEREIRA et al., 2019; PEREIRA et al., 2021) the present results also showed that SHRs have enhanced palatability to NaCl taste in normovolemic or fluid depleted condition, when compared to normotensive rats. Similar to NaCl palatability, after rats had quenched their thirst after ingestion of only water (WD-PR condition) SHRs had similar number of hedonic responses to 2% sucrose when compared to euhydrated condition. And again, similar to NaCl taste, these responses were increased when compared to normotensive rats that entered a WD-PR or euhydrated condition. The present results showing increased sucrose palatability in SHRs corroborates previous data from the literature showing that SHRs have increased preference to sucrose compared to normotensive strains. SHRs have increased intakes of low (10 – 50 mM) or high concentration of sucrose solution (100 mM) when compared to normotensive strains (TORDOFF; ALARCON; LAWLER, 2008) or even 4% sucrose (0,12 M) compared to WKY or Wistar rats (DOMMETT; ROSTRON, 2013). In the present study, SHRs showed increased hedonic responses to 2% (0.06 M) sucrose compared to normotensive rats, without differences in aversive responses.

The previous studies (PEREIRA et al., 2019; PEREIRA et al., 2021) showed that whereas NaCl intake depends totally on brain AT1 receptor activation, NaCl palatability depends only partially on these receptors. It seems that a system responsible for NaCl palatability somehow overcame the blockade of brain ANG II receptors, thus allowing NaCl taste “good” despite the inhibition of NaCl intake. This resembles the dissociation found in neural dopaminergic mechanisms that control “wanting” and “liking” of sweet taste (BERRIDGE; KRINGELBACH, 2008). The increased preference to sucrose by SHR rats was suggested to be related to an increased response of hypothalamic β -endorphinergic systems to sucrose drinking compared to WKY rats (ZHANG; ROCKHOLD, 1993). The same mechanisms may be involved in the increased palatability to sucrose in euhydrated condition. In addition, a possible involvement of AT1 receptors after WD-PR cannot be discarded. Besides forebrain opioids and angiotensinergic mechanisms, there are previous studies with normotensive rats suggesting the involvement of hindbrain areas in the taste reactivity modulation, such as parabrachial nucleus, rostral solitary nucleus and reticular formation (SÖDERPALM; BERRIDGE, 2000; BIONDOLILLO; WILLIAMS; KING, 2009; KINZELER; TRAVERS, 2011). However, if these hindbrain mechanisms are also involved in taste reactivity modulation in SHR rats is still an open question.

SHR rats also showed increased number of aversive responses to 1.4 mM quinine sulphate compared to normotensive rats, whether euhydrated or at the end of a cycle of WD-PR. These results suggest that SHR rats have no non-specific enhanced palatability to different tastes. A previous study showed no differences in quinine hydrochloride (QHCl) intake (0.01 mM – 1 mM) among SHR rats and other normotensive strains (TORDOFF; ALARCON; LAWLER, 2008). However, SHR rats showed increased glossopharyngeal nerve response to 2.5 mM and 25 mM quinine hydrochloride when compared to WKY rats (FORMAKER; HILL, 1991). This increased glossopharyngeal nerve response to quinine by SHR rats might explain the increased number of aversive responses to IO 1.4 mM quinine sulphate by SHR rats, when compared to normotensive rats in the present study. However, further studies are necessary to elucidate this question.

In summary, the present results show that similar to NaCl, SHR rats have increased hedonic responses to sucrose compared to normotensive rats. In addition, they suggest that similarly salt and sweet taste in SHR rats resisted challenges to bodily fluid balance. They also show a more intense aversive response of SHR rats to bitter taste compared to normotensives.

This suggests that the enhanced response of SHRs to taste rewards does not correspond to a decreased response to a typical aversive taste.

Ethics Statement

Experimental protocols were approved by the Ethical Committee in Animal Use (CEUA) of the School of Dentistry-UNESP (Proc. CEUA 24/2016).

Acknowledgments

The authors thank Silas P. Barbosa for expert technical assistance, Silvana A. D. Malavolta and Carla Molina for secretarial assistance, and Ana V. de Oliveira and Mikail D. Santos (*in memorian*) for animal care assistance.

Funding:

This study was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP 2015/20500-3 and 2022/04967-2) Brazil; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Finance Code 001), Brazil. ED Pereira Jr was recipient of Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) graduate fellowship in the Joint UFSCar-UNESP Graduate Program in Physiological Sciences (PIPGCF UFSCar-UNESP).

6. REFERENCES

- Andrade CA, Andrade-Franze GM, De Luca LA, Jr., Johnson AK, Menani JV (2011), Changes in taste reactivity to intra-oral hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an alpha2-adrenergic receptor agonist. *Physiol Behav* 104:702-708.
- Berridge KC (1991), Modulation of taste affect by hunger, caloric satiety, and sensory-specific satiety in the rat. *Appetite* 16:103-120.
- Berridge KC (2000), Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. *Neurosci Biobehav Rev* 24:173-198.
- Berridge KC (2018), Evolving Concepts of Emotion and Motivation. *Front Psychol* 9:1647.
- Berridge KC, Flynn FW, Schulkin J, Grill HJ (1984), Sodium depletion enhances salt palatability in rats. *Behav Neurosci* 98:652-660.
- Berridge KC, Kringelbach ML (2008), Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. *Psychopharmacology (Berl)* 199:457-480.
- Berridge KC (2022) Kent Berridge Lab_ Multimedia Videos - 'Liking' (facial affective reactions to tastes). In: Affective taste 'liking'/'disliking' expressions: Human babies, adult apes, monkeys, and rats. <https://sites.lsa.umich.edu/berridge-lab/multimedia-videos/>. University of Michigan - 2022 BERRIDGE LAB. Last access: 18/09/2022.
- Biondolillo JW, Williams LA, King MS (2009), Blocking glutamate receptors in the waist area of the parabrachial nucleus decreases taste reactivity behaviors in conscious rats. *Chem Senses* 34:221-230.
- Breslin PA, Spector AC, Grill HJ (1992), A quantitative comparison of taste reactivity behaviors to sucrose before and after lithium chloride pairings: a unidimensional account of palatability. *Behav Neurosci* 106:820-836.
- Breslin PA, Spector AC, Grill HJ (1993), Chorda tympani section decreases the cation specificity of depletion-induced sodium appetite in rats. *Am J Physiol* 264:R319-R323.
- Cabanac M, LaFrance L (1990), Postingestive alliesthesia: the rat tells the same story. *Physiol Behav* 47:539-543.
- Clarke SN, Ossenkopp KP (1998), Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. *Am J Physiol* 274:R718-724.
- De Luca LA, Jr., Pereira-Derderian DT, Vendramini RC, David RB, Menani JV (2010), Water deprivation-induced sodium appetite. *Physiol Behav* 100:535-544.
- De Luca LA, Jr., Xu Z, Schoorlemmer GH, Thunhorst RL, Beltz TG, Menani JV, Johnson AK (2002), Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 282:R552-559.
- Di Nicolantonio R, Kren V, Zidek V, Pravenec M (2004), Salt preference of congenic strains derived from the spontaneously hypertensive rat. *Physiol Behav* 80:617-622.
- Di Nicolantonio R, Silvapulle MJ (1988), Blood pressure, salt appetite and mortality of genetically hypertensive and normotensive rats maintained on high and low salt diets from weaning. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 15:741-751.
- DiNicolantonio R, Hutchinson JS, Mendelsohn FA (1982), Exaggerated salt appetite of spontaneously hypertensive rats is decreased by central angiotensin-converting enzyme blockade. *Nature* 298:846-848.
- Dommett EJ, Rostron CL (2013), Appetitive and consummative responding for liquid sucrose in the spontaneously hypertensive rat model of attention deficit hyperactivity disorder. *Behav Brain Res* 238:232-242.
- Ely D, Turner M, Milsted A (2000), Review of the Y chromosome and hypertension. *Braz J Med Biol Res* 33:679-691.
- Formaker BK, Hill DL (1991), Lack of amiloride sensitivity in SHR and WKY glossopharyngeal taste responses to NaCl. *Physiol Behav* 50:765-769.

- Grill HJ, Berridge KC (1985) Taste reactivity as a measure of the neural control of palatability. In: *Progress in Psychobiology and Physiological Psychology*, vol. (JM S, AN E, eds), pp. 1-61. Orlando: Academic Press.
- Grill HJ, Norgren R (1978), The taste reactivity test. I. Mimetic responses to gustatory stimuli in neurologically normal rats. *Brain Res* 143:263-279.
- Grill HJ, Schwartz GJ, Travers JB (1992), The contribution of gustatory nerve input to oral motor behavior and intake-based preference. I. Effects of chorda tympani or glossopharyngeal nerve section in the rat. *Brain Res* 573:95-104.
- Kinzler NR, Travers SP (2011), mu-Opioid modulation in the rostral solitary nucleus and reticular formation alters taste reactivity: evidence for a suppressive effect on consummatory behavior. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301:R690-700.
- Koga Y, Hirooka Y, Araki S, Nozoe M, Kishi T, Sunagawa K (2008), High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. *Hypertens Res* 31:2075-2083.
- Lakens D (2013), Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. *Front Psychol* 4:863.
- Okamoto K, Aoki K (1963), Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J* 27:282-293.
- Pereira-Derderian DT, Vendramini RC, Menani JV, Chiavegatto S, De Luca LA, Jr. (2016), Water deprivation-partial rehydration induces sensitization of sodium appetite and alteration of hypothalamic transcripts. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 310:R15-23.
- Pereira-Derderian DT, Vendramini RC, Menani JV, De Luca LA, Jr. (2010), Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 298:R1298-1309.
- Pereira ED, Jr., Dantas RM, Andrade-Franze GMF, De Luca LA, Jr., Menani JV, Andrade CAF (2019), Estradiol modulates the palatability of 0.3M NaCl in female rats during sodium appetite. *Appetite* 133:252-261.
- Pereira ED, Jr., Faria AM, Andrade-Franze GMF, Menani JV, De Luca LA, Jr., Andrade CAF (2021), Sodium palatability in male spontaneously hypertensive rats. *Horm Behav*:104952.
- Richter CP, Eckert JF (1938), Mineral metabolism of adrenalectomized rats studied by the appetite method. *Endocrinology* 22:214-224.
- Sato MA, Yada MM, De Luca LA, Jr. (1996), Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. *Physiol Behav* 60:1099-1104.
- Schulkin J (1991), The allure of salt. *Psychobiology* 19:116-121.
- Söderpalm AHV, Berridge KC (2000), The hedonic impact and intake of food are increased by imidazolam microinjection in the parabrachial nucleus. *Brain Res* 877:288-297.
- Tanaka J, Yamamuro Y, Saito H, Matsuda M, Nomura M (1995), Differences in electrophysiological properties of angiotensinergic pathways from the subfornical organ to the median preoptic nucleus between normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *Exp Neurol* 134:192-198.
- Tordoff MG, Alarcon LK, Lawler MP (2008), Preferences of 14 rat strains for 17 taste compounds. *Physiol Behav* 95:308-332.
- Veerasingham SJ, Raizada MK (2003), Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. *Br J Pharmacol* 139:191-202.
- Wilczynski EA, Leenen FH (1987), Dietary sodium intake and age in spontaneously hypertensive rats: effects on blood pressure and sympathetic activity. *Life Sci* 41:707-715.
- Zhang T, Rockhold RW (1993), Sucrose drinking reduces dorsal hypothalamic beta-endorphin levels in spontaneously hypertensive rats but not in Wistar-Kyoto rats. *Brain Res Bull* 32:261-265.

Capítulo 3

**ALTERAÇÕES NA PRESSÃO ARTERIAL E FREQUÊNCIA
CARDÍACA INDUZIDAS POR ESTÍMULOS GUSTATÓRIOS EM
RATOS NORMOTENSOS E ESPONTANEAMENTE
HIPERTENSOS**

1. INTRODUÇÃO

Depleção de sódio, apetite por sódio e angiotensina II (ANG II) atuando no cérebro influenciam a ingestão de NaCl, bem como o perfil hedônico, ou palatabilidade, do sabor salgado em ratos normotensos (BERRIDGE et al., 1984; BERRIDGE; SCHULKIN, 1989; SATO; YADA; DE LUCA, 1996; PEREIRA et al., 2019; ZENATTI et al., 2020).

Ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) apresentam elevada palatabilidade ao NaCl, independentemente do balanço hidro mineral, (PEREIRA et al., 2021). Nossos resultados também sugerem que os receptores centrais AT1 fazem parte dos mecanismos ativados para aumentar a ingestão de NaCl e a palatabilidade em SHRs. Uma dissociação parcial entre ingestão de NaCl e palatabilidade em SHRs também é sugerida, embora ainda não muito bem compreendida. Em fêmeas SHRs foi verificado o efeito inibitório do estrógeno sobre o apetite ao sódio, associado à redução de sua palatabilidade (PEREIRA et al., 2019).

As informações sensoriais provenientes das papilas gustativas que chegam ao núcleo do trato solitário (NTS) também são retransmitidos para neurônios do tronco cerebral que estão envolvidos em funções motoras e autonômicas reflexas (BRADLEY, 2007). Os estímulos gustatórios regulam a atividade eferente autônoma, promovendo os reflexos para a secreção salivar, gástrica e de insulina, os quais são importantes para o metabolismo e digestão e absorção de nutrientes [para revisão vide (KITAMURA et al., 2010)].

Ainda é pouco conhecida a influência dos estímulos gustatórios sobre a atividade autônoma cardiovascular. Estudo de Yonemura e cols (1989) mostrou que das quatro qualidades de estímulos gustativos testados, apenas HCl e NaCl, mas não quinina e sacarose, foram eficazes em aumentar a frequência cardíaca e a pressão arterial em ratas anestesiadas. Essas alterações no sistema cardiovascular foram associadas ao aumento da atividade simpática cardíaca eferente e à diminuição da atividade vagal (YONEMURA et al., 1989). Foi demonstrado também que estimulação tátil e gustatória da nasofaringe promove respostas cardiovasculares em ratas normotensas anestesiadas, sugerindo que a informação gustatória e mecânica, via o ramo faríngeo do nervo glossofaríngeo (IX), pode promover respostas cardiovasculares, além do processamento da sensação do gosto (HANAMORI; ISHIKO, 1993).

Contudo, os estudos citados foram realizados em animais anestesiados e ainda permanece desconhecido o efeito de estímulos da cavidade oral, principalmente de

diferentes gostos, sobre a atividade eferente autônoma cardiovascular em animais conscientes. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi investigar se a estimulação gustatória, além de promover respostas orofaciais, também alteram respostas autônomas cardiovasculares. Para tanto, a pressão arterial e frequência cardíaca foram avaliadas durante estimulação gustatória em ratos normotensos e SHRs, em condições basais e durante episódios de desidratação.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados **ratos espontaneamente hipertensos** (*Spontaneously Hypertensive Rats*, SHR) e **ratos normotensos** (Holtzman), provenientes do Biotério de criação da FOAr, com peso em torno de 250 - 350 g. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável suspensas em estantes (gaioleiros), com livre acesso a ração comercial, água e solução de NaCl 0,3 M. Os ratos foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade $50 \pm 10\%$) com ciclo claro-escuro 12-12 h (luz 7:00 – 19:00 h). A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi registrada diariamente. Os procedimentos e protocolos experimentais descritos aqui foram aprovados pela CEUA – FOAr (protocolos no: 02/2016), de acordo com a legislação vigente e resoluções normativas Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (Concea).

2.2 Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiadas. Sob anestesia de cetamina (80 mg/kg de peso corporal) combinado com xilazina (7 mg/kg de peso corporal), um tubo de polietileno (PE-10 conectado a uma PE-50) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral no dia anterior aos experimentos. O tubo foi transpassado subcutaneamente e exposto no dorso do rato. Para o registro da pressão arterial pulsátil, PAM e FC, o cateter arterial foi conectado a um transdutor de pressão acoplado a um pré-amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier, CB Sciences, Dover, NH, EUA) conectado a um sistema de aquisição de dados (modelo Powerlab 16SP; ADInstruments, Castle Hill, Austrália).

2.4 Indução da ingestão de água e NaCl 0,3 M

Protocolo de privação hídrica e reidratação parcial – PH-RP foi feito de acordo com estudos prévios (DE LUCA et al., 2002; PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010). O modelo de privação hídrica com reidratação parcial com água por 2 horas (PH-RP) fornece subsídios para o estudo da sede e apetite ao sódio, separadamente. O animal foi privado de água por 24 horas, e ao final desse período observa-se aumento da osmolaridade e sódio plasmáticos, hipovolemia e aumento da atividade de renina plasmática. O período de reidratação parcial (2 horas de acesso apenas à água) corrige totalmente o aumento da osmolaridade plasmática e parcialmente a hipovolemia, enquanto o aumento da atividade de renina plasmática permanece elevado até o início do teste do apetite ao sódio (DE LUCA et al., 2002; DE LUCA et al., 2010). Após o período de reidratação parcial o animal passa a ter também livre acesso ao NaCl 0,3 M por mais 2 horas (teste do apetite ao sódio). No momento em que o animal tem acesso a solução de sódio, estão presentes a hipovolemia e aumento de angiotensina II como sinais facilitadores para o apetite ao sódio, enquanto o sinal inibitório da hipertonicidade para a ingestão de sódio já foi removido. A subsequente ingestão de sódio corrige totalmente o volume do líquido extracelular e a perda de sódio que ocorreu pela natriurese durante o período de privação hídrica (DE LUCA et al., 2002). Foi aguardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Foram utilizados bebedouros graduados com divisão de 0,1 ml para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M.

2.5. Fármacos utilizados

Prazosina - 1 mg/ml/kg, antagonista de receptores adrenérgicos alfa₁ (MESTIVIER; DABIRE; CHAU, 2001).

2.6. Análise estatística

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

3. PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

3.1. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca induzida por estimulação gustatória após bloqueio de receptores adrenérgicos alfa₁ em ratos normotensos e SHRs

Os ratos normotensos e SHRs, com implantes de cânula intraoral, foram submetidos à cirurgia para implante de cateter para registro de pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) e implante de cateter na veia femoral para administração de fármacos. No dia seguinte, os ratos não anestesiados foram conectados ao sistema de registro da PAM e FC. Após um registro basal de 30 min, foi realizada a injeção intravenosa de salina estéril e após 1 minutos foi realizado a infusão intra-oral (1 ml/min) de água destilada e das soluções de NaCl 1,8%, NaCl 3%, sacarose 2%, sulfato de quinina 1,4 mM (1,0 ml/min), e o registro da PAM e FC continuou até o término da infusão de todos os sabores. A infusão das diferentes soluções foi realizada em ordem aleatória, com intervalos de 5 min, sempre realizando a limpeza da cânula intraoral com água destilada (0,2 ml), seguida pelo seu esvaziamento, evitando o acúmulo de soluções na cânula ou na cavidade oral do animal.

Após 1 h do término das infusões, foi feito um registro basal de 30 minutos e em seguida, os animais receberam injeções intravenosas de prazosin (1 mg/ml/kg, antagonista de receptores adrenérgicos alfa₁). Após 1 minuto das injeções iniciou-se a infusão intraoral (1 ml/min) das diferentes soluções, conforme realizado anteriormente. Veja o delineamento experimental desse protocolo no apêndice, item 3.1.

3.2. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca induzida por estimulação gustatória durante protocolo de 24 h PH-RP em ratos normotensos e SHRs

Os ratos normotensos e SHRs, com implantes de cânula intraoral, foram submetidos à cirurgia para implante de cateter para registro de pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC). No dia seguinte, os ratos não anestesiados foram conectados ao sistema de registro da PAM e FC. Após um registro basal de 30 min foi realizada a infusão intraoral (1 ml/min) de água destilada e NaCl 0,3 M e o registro da PAM e FC continuou até o término da infusão das soluções. A infusão das soluções foi realizada em ordem aleatória, com intervalo de 5 min, sempre realizando a limpeza da cânula intraoral com água destilada (0,2 ml), seguida pelo seu esvaziamento, evitando o acúmulo de soluções na cânula ou na cavidade oral do animal.

Em seguida, iniciou-se o protocolo de PH-RP, no qual os animais passaram por privação hídrica de 24 h, tendo livre acesso apenas à ração. Ao final desse período, os animais foram conectados ao sistema de registro da PAM e FC. Após um registro basal de 30 min foi realizado a infusão IO (1 ml/min) de água destilada e NaCl 0,3 M, conforme descrito anteriormente. Em seguida, os animais receberam bebedouros com água para o período de reidratação parcial (teste da sede) por 120 minutos.

Após o término do teste da sede, os animais foram conectados ao sistema de registro da PAM e FC onde foi feito um registro basal de 30 min, seguido pela infusão IO das soluções água destilada e NaCl 0,3 M, de forma aleatória.

Em continuidade ao protocolo PH-RP, os animais receberam bebedouros graduados com NaCl 0,3 M por de 120 min para o teste do apetite ao sódio. Após esse período, novamente foi feito um registro da PAM e FC durante a infusão IO das soluções água destilada e NaCl 0,3 M. Veja o delineamento experimental desse protocolo no apêndice, item 3.2.

4. RESULTADOS

4.1. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca induzida por estimulação gustatória após bloqueio de receptores adrenérgicos α_1 em ratos normotensos e SHRs

SHRs apresentaram uma PAM basal maior em relação aos animais normotensos (174 ± 2 , vs. Normotensos: 103 ± 2), sem alteração para FC (361 ± 10 , vs. Normotensos: 379 ± 19). O bloqueio dos receptores adrenérgicos α_1 com prazosina (1 mg/kg de peso corporal i.v.) diminuiu a PAM em SHR (controle: 173 ± 2 , vs. prazosina: 93 ± 7 mmHg) e HTZ (controle: 103 ± 2 , vs. prazosina: 80 ± 2 mmHg) e aumentou a FC in SHRs (controle: 361 ± 10 , vs. prazosina: 405 ± 18 bpm) e HTZ (controle: 431 ± 17 , vs. prazosina: 518 ± 14 bpm).

a) Sacarose 2%

A infusão IO de sacarose 2% causou um aumento significativo na PAM de animais normotensos e hipertensos, sendo que em SHRs o aumento pressor foi maior significativo (Normotensos: $\Delta 8 \pm 1$ vs. SHRs: $\Delta 17 \pm 2$ mmHg), com aumento na FC nos animais normotensos (Normotensos: $\Delta 35 \pm 4$ vs. SHRs: $\Delta 24 \pm 4$ bpm).

O bloqueio dos receptores adrenérgicos α_1 com prazosina aboliu o efeito pressor induzido pela infusão IO de sacarose em ratos normotensos e SHRs (SHRs: $\Delta 4 \pm 2$; vs. Normotensos: $\Delta 3 \pm 1$ mmHg). Prazosina também inibiu o efeito taquicárdico em ratos normotensos, sem alteração nos SHRs (SHRs: $\Delta 17 \pm 9$; vs. Normotensos: $\Delta 6 \pm 9$ bpm), Figura 3.1.

ANOVA mostrou diferença significativa na PAM para os tratamentos [F(3,154) = 39,660; $p < 0,001$], tempo [F(6,154) = 15,577; $p < 0,001$] e interação entre tratamento e tempo [F(18,154) = 3,324; $p < 0,001$]. Para FC ANOVA mostrou diferenças entre tratamentos [F(3,154) = 13,774; $p < 0,001$] tempo [F(6,154) = 6,118; $p < 0,001$] sem alteração na interação entre tratamento e tempo [F(18,154) = 0,826; $p = 0,668$]

b) Sulfato de quinina 1,4 mM

A infusão IO de sulfato de quinina 1,4 mM produziu um maior aumento na PAM de SHRs quando comparado com animais normotensos (Normotensos: $\Delta 12 \pm 1$ vs. SHRs: $\Delta 32 \pm 2$ mmHg), bem como aumento na FC (Normotensos: $\Delta 25 \pm 7$ vs. SHRs: $\Delta 55 \pm 7$ bpm), Figura 3.2.

O bloqueio dos receptores adrenérgicos α_1 com prazosina aboliu o efeito pressor induzido pela infusão IO de quinina em SHRs e ratos normotensos (SHRs: $\Delta 5 \pm 3$; vs. Normotensos: $\Delta 3 \pm 1$ mmHg) e o efeito taquicárdico em ambas as linhagens (SHRs: $\Delta 27 \pm 8$; vs. Normotensos: $\Delta 11 \pm 5$ bpm).

ANOVA mostrou diferença significativa na PAM para os tratamentos [F(3,148) = 75,478; $p < 0,001$], tempo [F(6,148) = 15,264; $p < 0,001$] e interação entre tratamento e tempo [F(18,148) = 3,952; $p < 0,001$]. Para FC ANOVA mostrou diferenças entre tratamentos [F(3,148) = 5,289; $p < 0,002$] tempo [F(6,148) = 5,927; $p < 0,001$] sem alteração na interação entre tratamento e tempo [F(18,148) = 0,568; $p = 0,917$].

c) NaCl 0,3 M

A infusão IO de NaCl 0,3 M produziu um maior aumento na PAM em SHRs quando comparado com animais normotensos (Normotensos: $\Delta 8 \pm 1$ vs. SHRs: $\Delta 26 \pm 3$ mmHg), e apenas uma tendência no aumento da FC (Normotensos: $\Delta 35 \pm 7$ vs. SHRs: $\Delta 22 \pm 7$ bpm), Figura 3.3.

O bloqueio dos receptores adrenérgicos α_1 com prazosina aboliu o aumento pressor induzido pela infusão IO de NaCl 0,3 M em SHRs e ratos normotensos (SHRs: $\Delta -1$

± 2 ; vs. Normotensos: $\Delta -1 \pm 2$ mmHg), com uma queda na FC (SHRs: $\Delta -30 \pm 18$; vs. Normotensos: $\Delta -17 \pm 7$ bpm).

ANOVA mostrou diferença significativa na PAM para os tratamentos [F(3,154) = 83,674; $p < 0,001$], tempo [F(6,154) = 11,448; $p < 0,001$] e interação entre tratamento e tempo [F(18,154) = 8,352; $p < 0,001$]. Para FC ANOVA mostrou diferenças entre tratamentos [F(3,154) = 28,475; $p < 0,001$] sem alteração para tempo [F(6,154) = 0,353; $p = 0,907$] e interação entre tratamento e tempo [F(18,154) = 0,901; $p = 0,578$].

d) NaCl 0,5 M

A infusão IO de NaCl 0,5 M produziu um maior aumento na PAM de SHRs quando comparado com animais normotensos (Normotensos: $\Delta 9 \pm 2$ vs. SHRs: $\Delta 31 \pm 2$ mmHg), bem como aumento na FC apenas para ratos normotensos (Normotensos: $\Delta 33 \pm 8$ vs. SHRs: $\Delta 12 \pm 7$ bpm), Figura 3.4.

O bloqueio dos receptores adrenérgicos α_1 com prazosina aboliu o aumento pressor induzido pela infusão IO de NaCl 0,5 M em ratos normotensos e SHRs (SHRs: $\Delta 1 \pm 2$; vs. Normotensos: $\Delta 3 \pm 2$ mmHg), e na FC (SHRs: $\Delta 17 \pm 7$; vs. Normotensos: $\Delta 3 \pm 5$ bpm).

ANOVA mostrou diferença significativa na PAM para os tratamentos [F(3,154) = 133,223; $p < 0,001$], tempo [F(6,154) = 21,439; $p < 0,001$] e interação entre tratamento e tempo [F(18,154) = 8,284; $p < 0,001$]. Para FC ANOVA mostrou diferenças entre tratamentos [F(3,154) = 6,756; $p < 0,001$] tempo [F(6,154) = 3,485; $p < 0,003$] e interação entre tratamento e tempo [F(18,154) = 0,545; $p = 0,932$].

e) Água destilada

A infusão IO de água destilada produziu um aumento na PAM de ratos normotensos e SHRs, contudo o aumento pressor foi maior em SHRs (Normotensos: $\Delta 8 \pm 2$ vs. SHRs: $\Delta 22 \pm 4$ mmHg). A infusão IO de água destilada não alterou a FC (Normotensos: $\Delta 31 \pm 7$ vs. SHRs: $\Delta 13 \pm 11$ bpm), Figura 3.5.

O bloqueio dos receptores adrenérgicos α_1 com prazosina aboliu o aumento pressor induzido pela infusão IO de água destilada em ratos normotensos e SHRs (SHRs: $\Delta -2 \pm 3$; vs. Normotensos: $\Delta 3 \pm 10$ mmHg), sem alteração para FC (SHRs: $\Delta 3 \pm 10$; vs. Normotensos: $\Delta 10 \pm 5$ bpm).

ANOVA mostrou diferença significativa na PAM para os tratamentos [$F(3,154) = 54,841$; $p < 0,001$], tempo [$F(6,154) = 8,709$; $p < 0,001$] e interação entre tratamento e tempo [$F(18,154) = 3,763$; $p < 0,001$]. Para FC ANOVA mostrou diferenças entre tratamentos [$F(3,154) = 11,407$; $p < 0,001$] sem alteração no tempo [$F(6,154) = 0,960$; $p = 0,455$] e interação entre tratamento e tempo [$F(18,154) = 0,620$; $p = 0,880$].

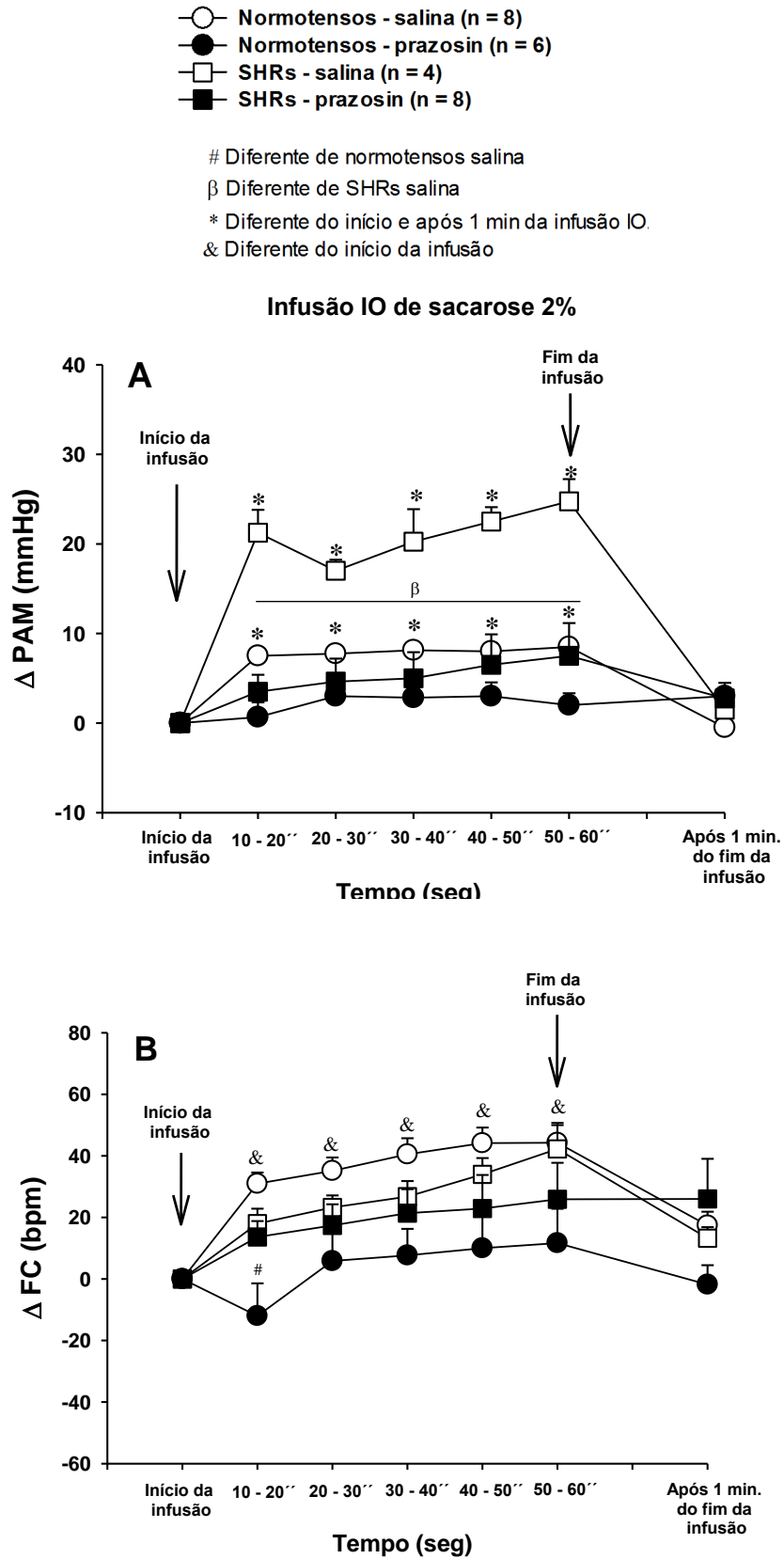


Figura 3.1: Variação de A) PAM e B) FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de sacarose 2% após injeções i.v. prazosina (1 mg/kg). Valores são representados como média ± EPM N = número de animais por grupo.

- Normotensos - salina (n = 8)
 - Normotensos - prazosin (n = 6)
 - SHRs - salina (n = 4)
 - SHRs - prazosin (n = 7)
- β Diferente de SHRs salina
 # Diferente de normotensos - salina
 * Diferente do início e após 1 minuto da infusão IO
 & Diferente do início da infusão

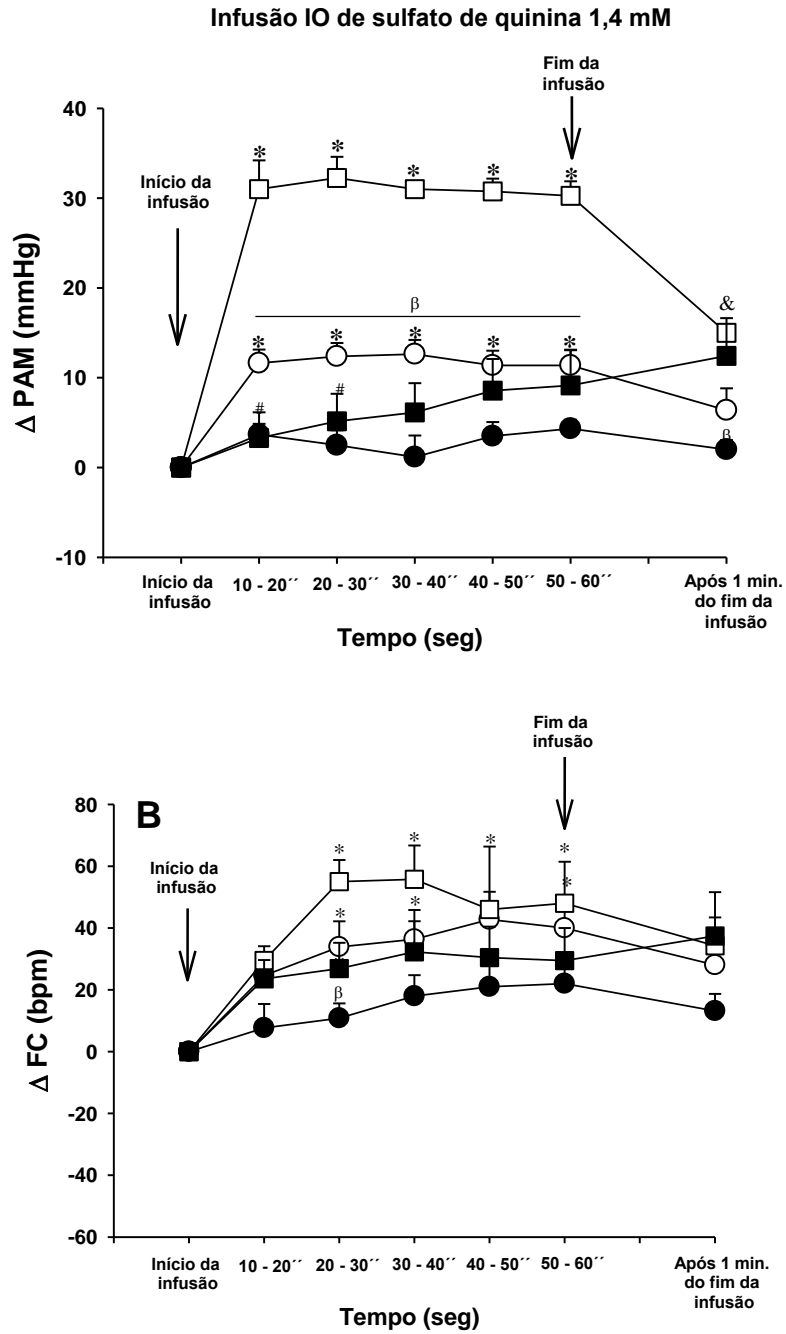


Figura 3.2: Variação de A) PAM e B) FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de sulfato de quinina 1,4 mM após injeções i.v. prazosina (1 mg/kg). Valores são representados como média ± EPM N = número de animais por grupo.

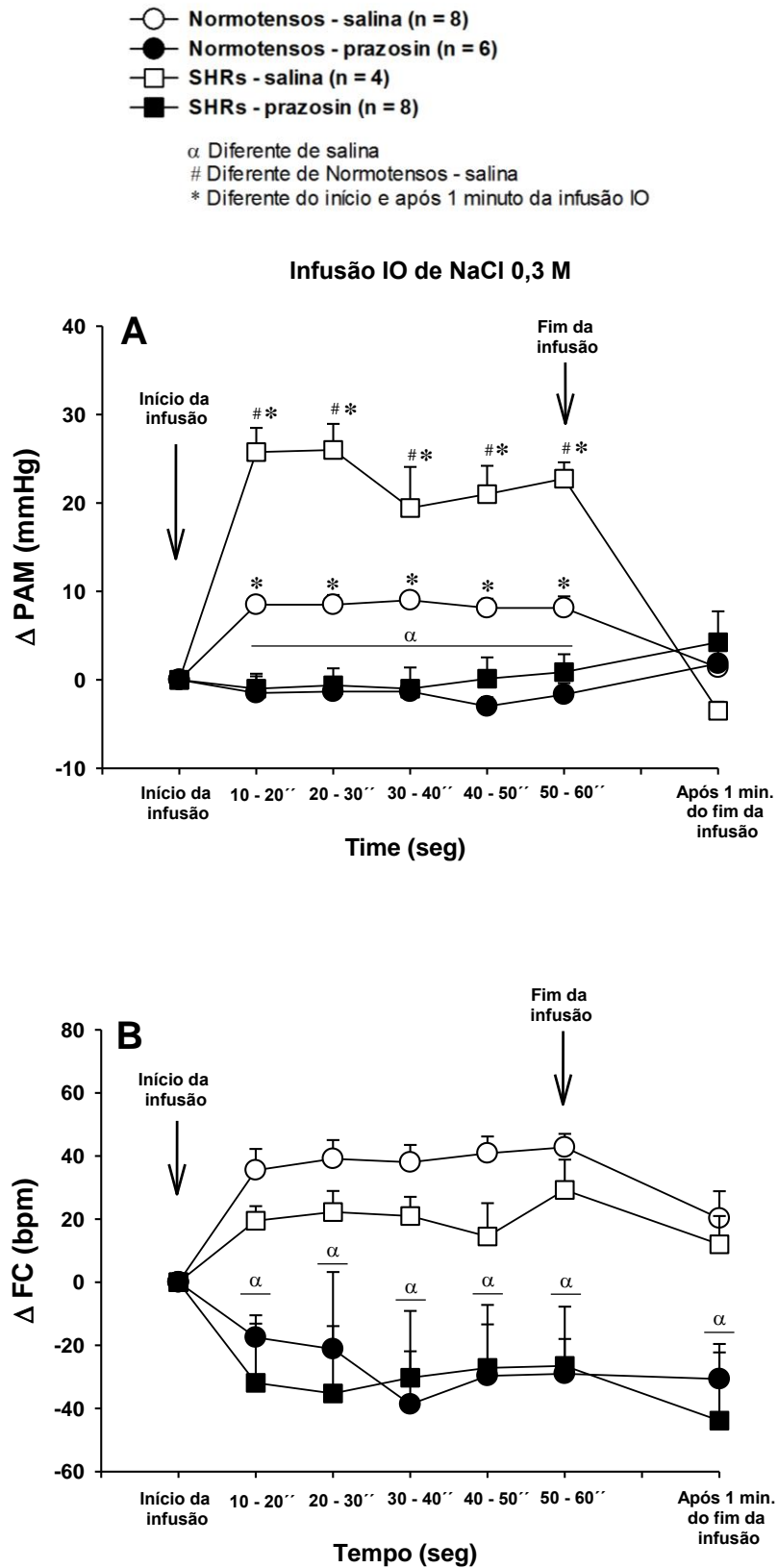


Figura 3.3: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de NaCl 0,3 M após injeções i.v. prazosina (1 mg/kg). Valores são representados como média ± EPM N = número de animais por grupo.

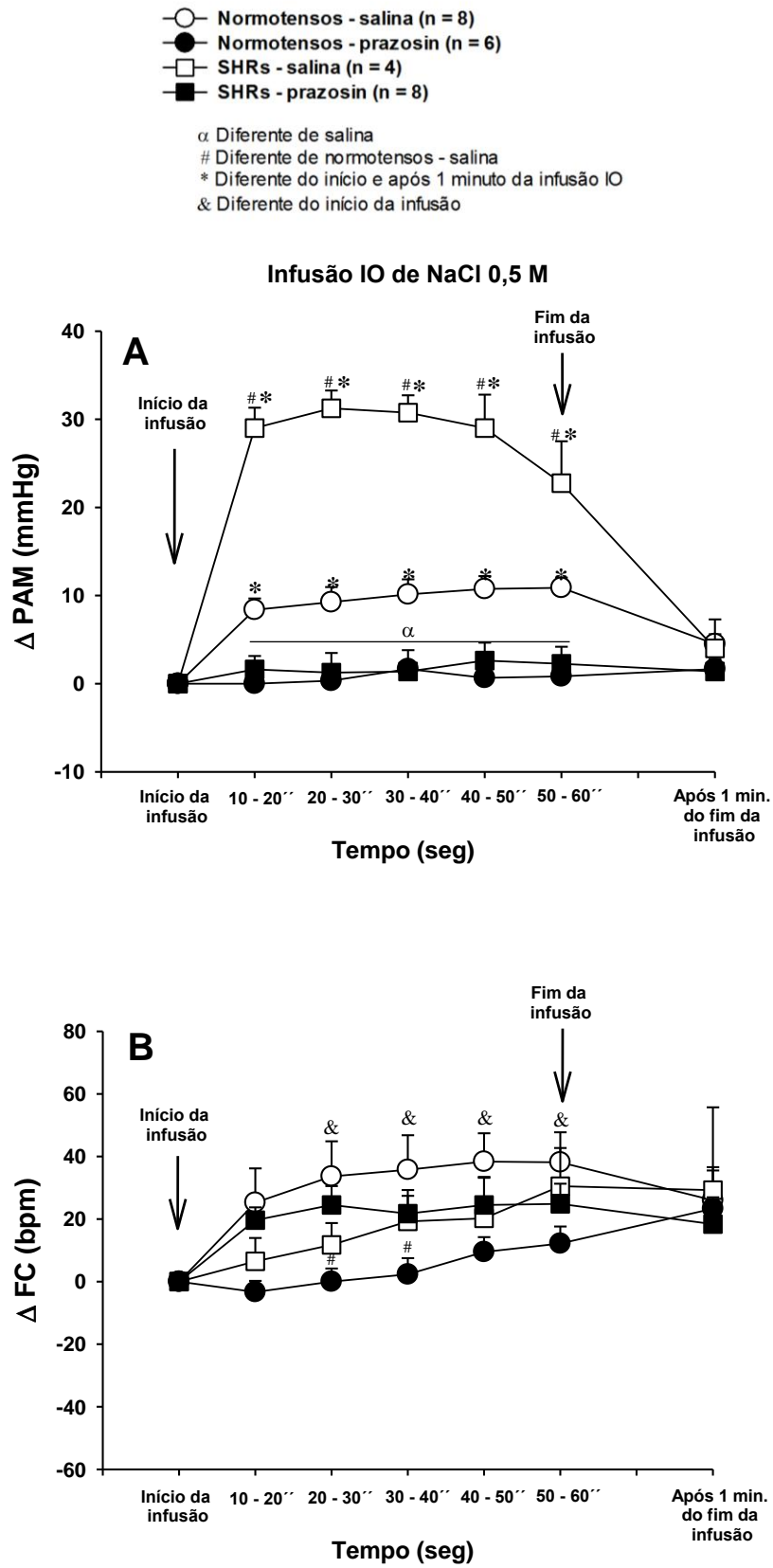


Figura 3.4: Variação de A) PAM e B) FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de NaCl 0,5 M após injeções i.v. prazosina (1 mg/kg). Valores são representados como média ± EPM N = número de animais por grupo.

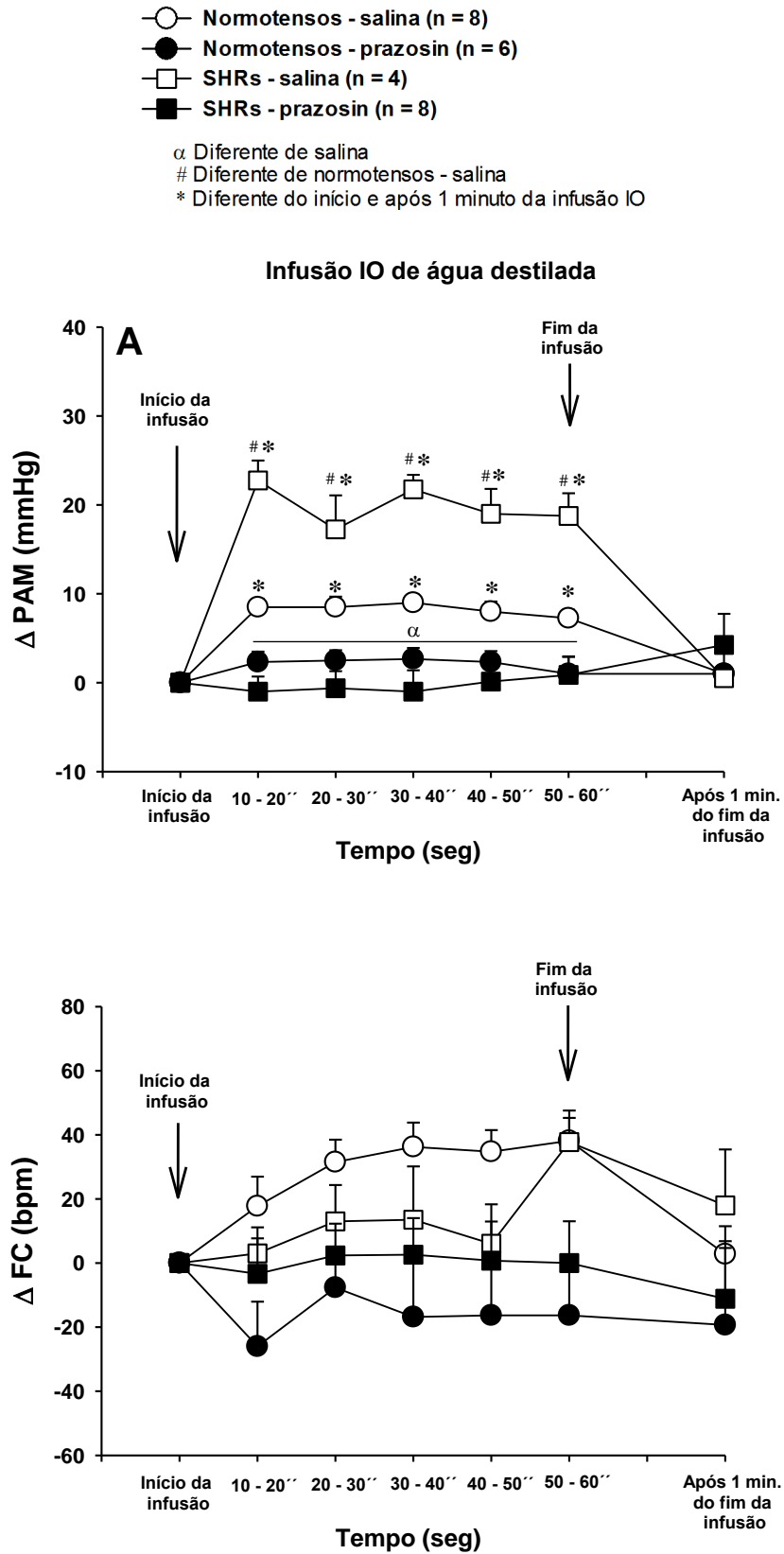


Figura 3.5: Variação de A) PAM e B) FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de água destilada após injeções i.v. prazosina (1 mg/kg). Valores são representados como média ± EPM N = número de animais por grupo.

4.2. Alterações na pressão arterial e frequência cardíaca induzida por estimulação gustatória durante protocolo de 24 h PH-RP em ratos normotensos e SHRs

Após período de 24 h de privação hídrica, reidratação parcial e apetite ao sódio não foram observadas diferenças significativas na PAM [$F(3,24) = 2,522$; $p = 0,082$] e FC ([$F(3,24) = 0,480$; $p = 0,700$] de ambos os grupos em relação à condição basal, Figura 3.6. Os SHRs apresentaram maior PAM que os normotensos em todos os tempos avaliados [$F(1,24) = 101,544$; $p < 0,001$], sem alteração para FC. ANOVA não mostrou diferença significativa na interação entre linhagem e tempo para PAM [$F(3,24) = 2,336$; $p = 0,099$] e FC [$F(3,24) = 0,500$; $p = 0,686$].

a) NaCl 0,3 M

A infusão IO de NaCl 0,3 M produziu um maior efeito pressor em SHRs quando comparado com ratos normotensos, em todas as condições do balanço hidroeletrólítico testadas [$F(1,32) = 205,281$; $p < 0,001$], Figura 3.7. Além disso, ANOVA não mostrou diferença entre os tempos quando comparado com ratos de mesma linhagem [$F(3,32) = 1,402$; $p = 0,260$], nem interação entre tempo e linhagem [$F(3,32) = 1,601$; $p = 0,209$].

Em relação à FC não houve diferença entre os linhagens ([$F(1,32) = 0,0721$; $p = 0,790$], tempos [$F(3,32) = 0,603$; $p = 0,618$] ou interação entre linhagens e tempos [$F(3,32) = 0,660$; $p = 0,583$].

b) Água destilada

A infusão IO de água destilada produziu um maior efeito pressor em SHRs quando comparado com ratos normotensos, em todas as condições do balanço hidroeletrólítico testadas [$F(1,32) = 132,609$; $p < 0,001$], Figura 3.8. Além disso, ANOVA não mostrou diferença entre os tempos quando comparado com ratos de mesma linhagem [$F(3,32) = 0,347$; $p = 0,792$], nem interação entre tempos e linhagens [$F(3,32) = 1,232$; $p = 0,314$].

Em relação à FC não houve diferença significativa entre as linhagens, [$F(1,32) = 0,0658$; $p = 0,799$], tempos [$F(3,32) = 0,134$; $p = 0,939$] ou interação entre linhagens e tempos [$F(3,32) = 0,184$; $p = 0,907$].

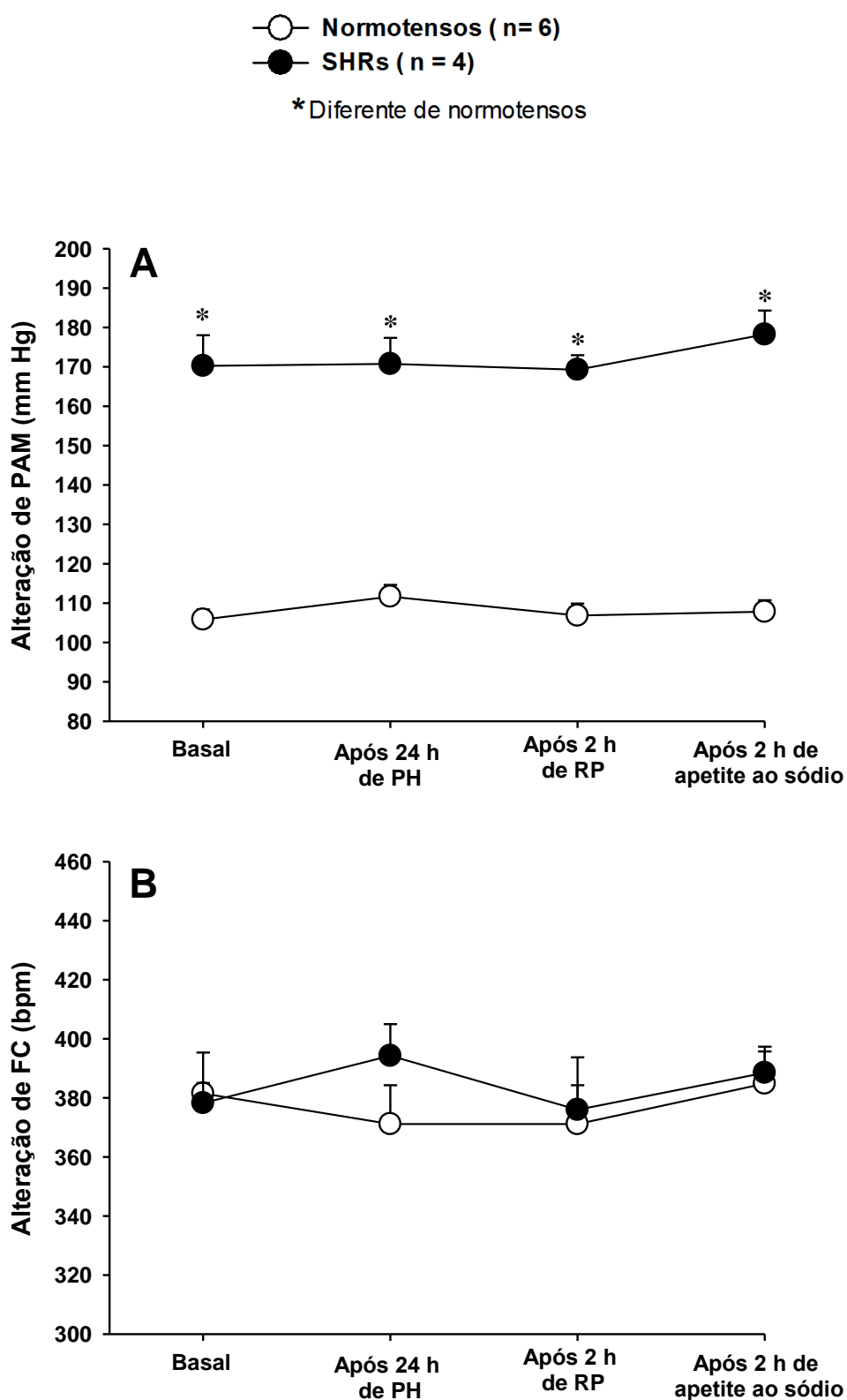


Figura 3.6: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante protocolo de PH-RP. Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo.

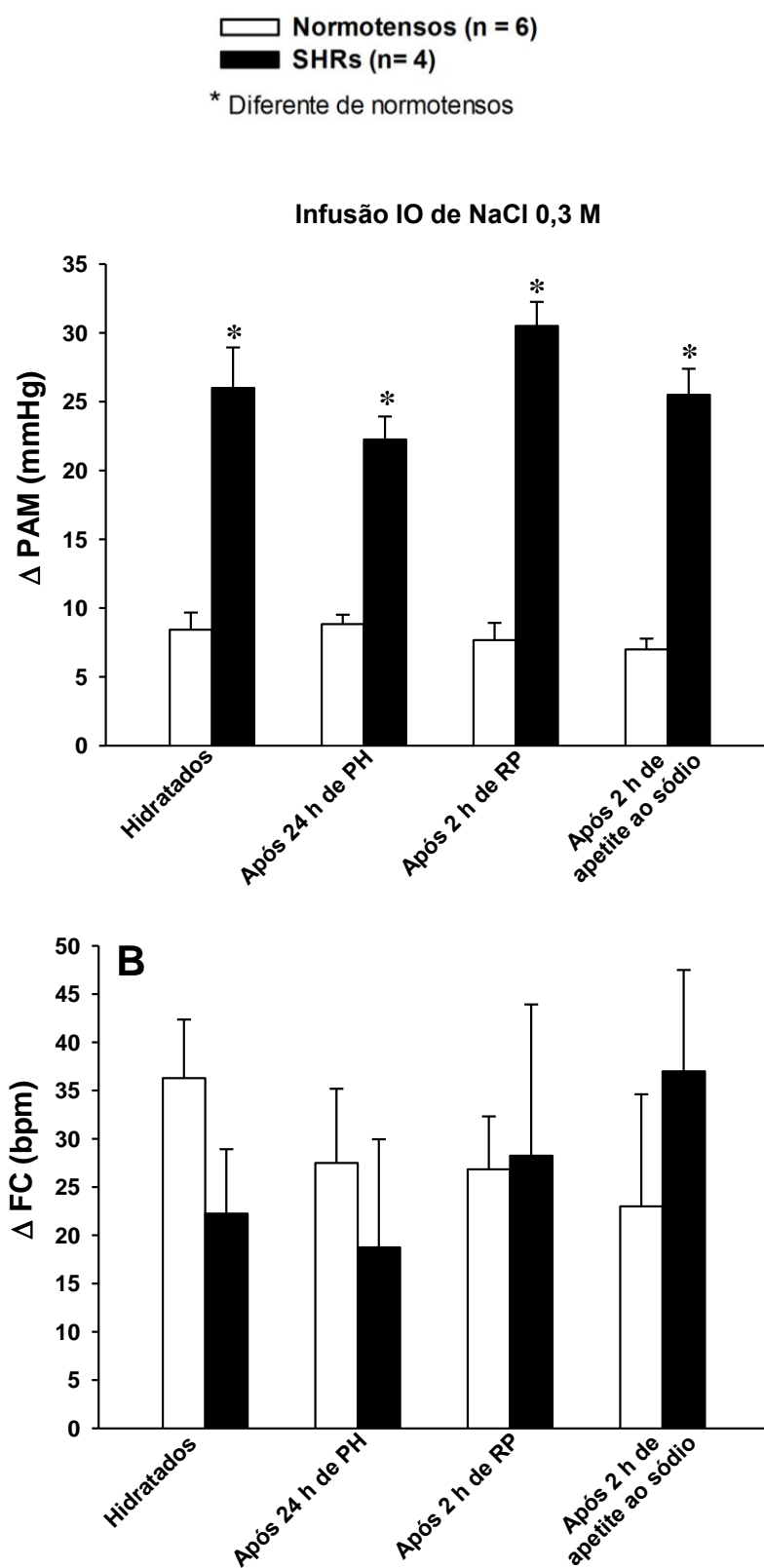


Figura 3.7: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de NaCl 0,3 M em diferentes condições do balanço hidromineral. Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo.

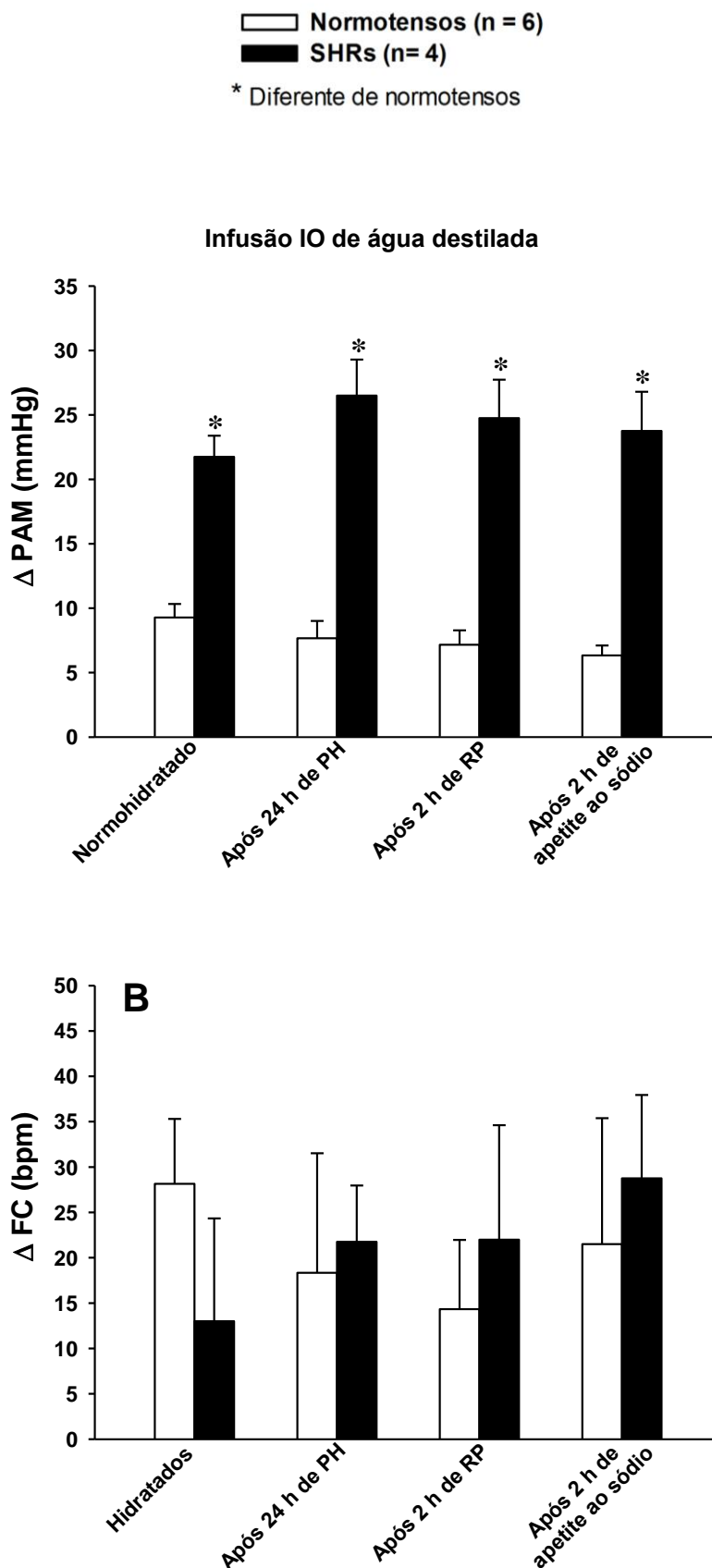


Figura 3.8: Variação de **A)** PAM e **B)** FC em ratos normotensos e SHRs durante infusão IO de água destilada em diferentes condições do balanço hidromineral. Valores são representados como média \pm EPM N = número de animais por grupo.

5. DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram que a infusão IO dos diferentes gostos produziu um aumento na PAM, sendo esse efeito pressor maior em SHRs. A infusão de sacarose, NaCl 0,5 M e quinina promoveu um aumento na FC para em ratos normotensos, enquanto em SHRs apenas a quinina. A administração de prazosina aboliu o efeito pressor observado após a infusão intraoral de todas as soluções testadas, em ambas às linhagens de ratos, bem como na FC para os gostos que levaram ao efeito taquicárdico. Além disso, a infusão IO de NaCl 0,3 M e água destilada em ratos desidratados e após PH-RP produziu o mesmo perfil de respostas pressoras que a condição hidratada, tanto em animais normotensos quanto em SHRs. Entretanto, os animais SHRs apresentaram um efeito pressor maior que normotensos, independentemente das condições do balanço hidroeletrólítico. O protocolo de 24 h de privação hídrica, reidratação parcial e apetite ao sódio não produziu diferenças significativas na PAM e FC em ambas as linhagens testadas.

Estudo anterior realizado em ratas anestesiadas mostrou que estímulos gustatórios, aplicados diretamente na mucosa oro-lingual (por 2 minutos), com soluções HCl 30 mM e NaCl 1 M produziram um aumento significativo na PAM e FC, sem diferença para sacarose (0,5 e 1 M) e água (YONEMURA et al., 1989). Quando a estimulação foi realizada na nasofaringe em animais anestesiados, as soluções NaCl 0,1 M, HCl 0,03 M, QHCl 0,03 M e água promoveram respostas cardiovasculares (aumento de PA e FC), o que não ocorreu após estimulação com sacarose 1,0 M e NaCl 0,9% (HANAMORI; ISHIKO, 1993). Os presentes resultados em animais não anestesiados mostram que tanto a infusão IO de sacarose 0,06 M quanto de água destilada também produziram um aumento significativo na PAM de ratos normotensos e SHRs. Isso sugere que mesmo soluções de gosto doce ou até mesmo água quando infundidas IO podem promover respostas autônomas, em animais normotensos e hipertensos.

Em relação aos estudos realizados em humanos, o contato oral com todas as diferentes soluções (sacarose 1,12 M, NaCl 0,64 M, ácido cítrico 320 mM e quinina 2,5 mM) testadas promoveu um aumento na FC (HORIO, 2000). Por outro lado, em outro estudo em humanos foi verificado que a estimulação oral com solução sacarose 0,3 M promoveu um brando aumento da FC de forma semelhante ao observado com água destilada (LETERME et al., 2008), tendo sido sugerida a hipótese de que a falta de correlação entre o valor hedônico atribuído ao gosto doce pelo voluntário e as respostas cardiovasculares

observadas poderiam refletir uma aceitação inata a sacarose. Contudo, essa hipótese ainda requer maior investigação.

Em relação ao gosto amargo, os presentes resultados também mostram que a infusão IO de quinina produziu um aumento na PAM, persistente até mesmo após o final da infusão. Em estudo anterior realizados em humanos foi verificado que o aumento na FC em resposta a quinina 2,5 mM (por 10 segundos) foi persistente por alguns minutos mesmo após o término da estimulação oral, (HORIO, 2000). Esses resultados sugerem que essas respostas cardiovasculares induzidas pelo gosto amargo podem permanecer por mais tempo do que a expressão dos comportamentos orofaciais, possivelmente a uma associação do gosto amargo a substâncias tóxicas para ingestão (FRANK; HETTINGER, 2005).

Além dos comportamentos orofaciais hedônicos e aversivos em resposta ao sabor diretamente infundido na cavidade oral (vide Capítulo 2), a infusão intraoral dos diferentes sabores também promoveu concomitantemente alterações na PAM para ambas as linhagens. Já o aumento na FC em ratos normotensos foi induzido pela infusão de sacarose, NaCl 0,5 M e quinina, enquanto em SHRs apenas quinina promoveu esse efeito. Não podemos descartar a hipótese de que, parte desse efeito pressor e taquicárdico observado nos animais possa estar diretamente relacionado às respostas motoras. Contudo, estudos anteriores em animais anestesiados mostraram que a infusão IO de diferentes gostos produziram aumento na PAM e FC (YONEMURA et al., 1989; HANAMORI; ISHIKO, 1993), excluindo uma eventual interferência das respostas motoras sobre o efeito pressor e taquicárdico em resposta ao estímulo gustatório.

Outro ponto muito importante observado em nossos resultados é resposta autonômica induzida pela infusão IO observada nos SHRs foi mais intensa em relação aos normotensos. Como vimos no capítulo 2, os SHRs foram mais responsivos no teste de reatividade gustatória para as diferentes soluções testadas quando comparado com normotensos. Nossos resultados também mostraram que o perfil de respostas autônomas induzidas pela estimulação gustatória em animais normotensos e SHRs foi semelhante independentemente da condição basal e após PH-RP. Em SHRs o efeito pressor em resposta a infusão IO permaneceu elevado quando comparado aos ratos normotensos, independentemente do balanço hidroeletrolítico. Conforme já discutido no capítulo 2, a frequência de respostas orofaciais foi maior em SHRs do que normotensos. Como não houve alteração na palatabilidade após desidratação induzida pelo protocolo de PH-RP, quando comparado com condição hidratada (capítulo 2), também não seria esperado mudança nas respostas

cardiovasculares induzidas pela infusão IO, em relação à condição hidratada, tanto em animais normotensos e SHRs. Em conjunto, esses resultados sugerem uma possível relação entre o aumento na frequência das respostas orofaciais com o aumento na intensidade das respostas cardiovasculares, observadas em SHRs após estimulação gustatória. Em outras palavras, as respostas cardiovasculares induzidas pela estimulação gustatória seriam proporcionais a palatabilidade da respectiva solução. Contudo, mais estudos precisam ser desenvolvidos para confirmarmos essa hipótese.

Até onde temos conhecimento o presente estudo é pioneiro em avaliar as respostas autonômicas frente ao estímulo gustativo em SHRs. Os SHRs foram mais responsivos ao estímulo do sabor na cavidade oral que ratos normotensos, no qual foi observado um maior aumento na PAM para todos os sabores avaliados. A hipertensão dos SHRs está associada a um aumento da atividade do sistema nervoso autônomo simpático que acarreta num aumento da resistência periférica total e da frequência cardíaca (FC), sustentando a hipertensão nestes animais (HAEUSLER; FINCH; THOENEN, 1972 ; MORI, 1973; JUDY et al., 1976; BRODY; O'NEILL; PORTER, 1984). Isso nos leva a sugerir que esse maior efeito pressor induzido pelo estímulo gustativo em SHRs possa se dar em parte, pela hiperatividade do sistema nervoso autônomo observado nesse modelo animal.

O efeito pressor induzido pelos estímulos gustatórios foi abolido pela prévia administração de prazosina, tanto para SHRs quanto ratos normotensos, sem diferença entre as linhagens. Os presentes resultados sugerem que o componente afetivo do paladar induz respostas cardiovasculares mediadas pelo sistema nervoso simpático e em maior intensidade nos SHRs. As sensações sensoriais de sabor atingem o núcleo do trato solitário (NTS) através da inervação facial (VII) da parte anterior da língua via fibras do nervo corda do tímpano (BRADLEY, 2007). O NTS é uma importante região que está envolvida na recepção de outras aferências viscerais, incluindo informações cardiovasculares. Foi demonstrado que SHRs, apresentam um aumento na imunorreatividade da proteína Fos em áreas como órgão subfornical (SFO), região comissural núcleo do trato solitário (NTSc) e pré *locus coeruleus* (pré-LC) em comparação as linhagens de ratos normotensos (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010). Dessa forma, podemos sugerir que o aumento da atividade neuronal do NTS em SHRs poderia estar envolvida com a maior intensidade das respostas cardiovasculares observada nesses animais. Contudo, mais estudos são necessários para confirmar essa hipótese.

Capítulo 4

**DESIDRATAÇÃO E COMPORTAMENTO SEMELHANTE À
ANSIEDADE EM RATOS NORMOTENSOS E
ESPONTANEAMENTE HIPERTENSOS**

1. INTRODUÇÃO

A hipertensão arterial é uma das doenças mais prevalentes no mundo, sendo um dos principais fatores de risco cardiovascular e principal fator de risco para mortes globais (WHO, 2017b). De acordo com dados da Organização Mundial de Saúde estima-se que 22% dos adultos com 18 anos ou mais de idade da população mundial mundo seja hipertensa (WHO, 2016). No Brasil, dados da pesquisa relacionada ao Ministério da Saúde (VIGITEL, 2019) mostraram que quase 25% da população adulta (> 18 anos) é hipertensa no Brasil, aumentando o risco para doenças coronarianas, infarto, insuficiência cardíacas, e agora como temos visto, a hipertensão é uma das principais comorbidades que agravam os quadros de Covid-19.

Outro dado estatístico preocupante é que um terço da população é afetada por um transtorno de ansiedade durante a vida (BANDELOW; MICHAELIS, 2015). De acordo com dados da OMS, o Brasil lidera em prevalência de transtornos de ansiedade em relação à população mundial (DE SOUZA; MACHADO-DE-SOUSA, 2017; WHO, 2017a).

O modelo animal de hipertensão semelhante à hipertensão essencial humana, ratos espontaneamente hipertensos (SHRs) (OKAMOTO; AOKI, 1963) apresentam uma hipertividade do renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) cerebral (DINICOLANTONIO; HUTCHINSON; MENDELSON, 1982; TANAKA et al., 1995; VEERASINGHAM; RAIZADA, 2003).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona (SRAA) é um importante sistema para o controle da pressão arterial, ingestão de água e apetite ao sódio (JOHNSON; THUNHORST, 2007; HURLEY; JOHNSON, 2015), e palatabilidade ao sódio (ZENATTI et al., 2020; PEREIRA et al., 2021). Além dos efeitos fisiológicos essenciais promovidos pela ação da angiotensina II (ANG II) nos receptores AT1, a super ativação sustentada do SRAA poderia levar à hipertensão [para revisão vide (NAKAGAWA et al., 2020)]. Por outro lado, os outros componentes e peptídeos do sistema renina-angiotensina (SRA) podem ter efeitos funcionais significativos que são benéficos (Unger et al., 2015). Sabe-se que o efeito protetor do SRA é atribuído ao eixo da enzima conversora de angiotensina (ECA) / receptor ANG II/AT2 (AT2R) e à enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2)/angiotensina-(1-7) [Ang-(1-7)] / receptor Mas (SANTOS et al., 2013; GIRONACCI et al., 2014).

Já foi verificado que a inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA) com captopril teve efeito semelhante ao diazepam para reduzir efeito aversivo avaliado pelos testes de LCE e interação social em ratos normotensos. Contudo, a retirada do tratamento

com diazepam promoveu efeitos adversos (aumento da aversão), enquanto a retirada do tratamento com captopril não teve diferença em relação ao controle (COSTALL et al., 1990). Estudos subsequentes demonstraram a associação entre o comportamento emocional do tipo ansiedade e ANG II. A infusão crônica de ANG II promoveu aumento de indicadores de ansiedade em ratos normotensos (DUCHEMIN et al., 2013), enquanto que o antagonista do receptor AT1 da ANG II reverteu esses resultados (PAVEL et al., 2008).

Os SHRs apresentam um nível reduzido no comportamento relacionado à ansiedade medido por meio do LCE, em comparação com ratos de linhagens normotensas Wistar Kyoto e Sprague Dawley. Isso pode ser inferido, pois os SHRs permanecem a maior parte do tempo nos braços abertos do LCE (GENTSCH; LICHTSTEINER; FEER, 1987; RAMOS et al., 1997; FERGUSON; CADA, 2004; FERGUSON; GRAY, 2005; STERLEY; HOWELLS; RUSSELL, 2011; ZUBCEVIC et al., 2018).

Interessantemente, os níveis elevados de ANG II associados a indicadores de ansiedade não são consistentes em SHRs, pois mesmo com níveis elevados de ANG II, em relação aos animais normotensos, as repostas comportamentais à ansiedade medidas pelo LCE são menores (NAM et al., 2014). Isso sugere que, neste modelo animal de doença cardiovascular, o elevado nível de ANG II circulante está associado a um baixo perfil de ansiedade. (Mas ainda não se sabe se a ANG II teria alguma influência nos níveis de ansiedade em SHRs). Considerando que ocorre aumento de ANG II em resposta a desidratações induzidas por privação hídrica por 24 h (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010), o objetivo deste projeto é elucidar se as alterações do balanço hidroeletrólítico, por meio da privação hídrica, influenciam o controle emocional do tipo ansiedade e atividade locomotora em SHRs e normotensos.

Considerando: a) a associação entre o comportamento semelhante à ansiedade e ANG II em animais normotensos; b) que a hipertensão é um grande fator de risco para doenças cardiovasculares; c) ocorre ativação do SRA durante situações de desidratação induzida por privação hídrica; o objetivo do presente projeto foi investigar se perturbações do balanço hidroeletrólítico (observadas durante situação de desidratação) alteram, e de que forma, a atividade locomotora e comportamento semelhante à ansiedade em SHRs em comparação com animais normotensos. Ou seja, neste estudo foi investigado se ativação do sistema renina-angiotensina altera a atividade locomotora e comportamento semelhante à ansiedade em SHRs em comparação com animais normotensos. Assim sendo, os

comportamentos semelhantes à ansiedade e atividade locomotora foram avaliados em condições basais e após indução da sede e apetite ao sódio em ratos normotensos e SHRs.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Foram utilizados **ratos espontaneamente hipertensos** (*Spontaneously Hypertensive Rats*, SHRs) e **ratos normotensos** (Holtzman - HTZ), provenientes do Biotério de criação da FOAr, com peso em torno de 250 - 350 g. Os animais foram mantidos em caixas individuais com livre acesso a ração comercial, água e solução de NaCl 0,3 M. Os ratos foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ$ C e umidade $50 \pm 10\%$) com ciclo claro-escuro 12-12 h (luz 7:00 – 19:00 h). Os procedimentos e protocolos experimentais foram realizados de acordo com a legislação vigente e resoluções normativas Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA (CEUA/FOAr nº 24/2016 e 15/2020; CEUA/FCF/CAr nº 07/2021).

2.2. Indução da ingestão de água e NaCl 0,3 M

Protocolo de privação hídrica e reidratação parcial – PH-RP foi feito de acordo com estudos prévios (DE LUCA et al., 2002; PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010), assim como descrito nos capítulos anteriores.

2.3. Comportamento relacionado à ansiedade – teste de labirinto em cruz elevado – LCE

O modelo animal de ansiedade mais amplamente usado nas últimas décadas é o labirinto em “cruz” elevado (LCE), conforme revisto por Pinheiro e colaboradores em 2007. O labirinto é constituído de dois braços abertos e dois fechados dispostos perpendicularmente, sendo que todo o aparato é elevado do chão. Considerando que os roedores apresentam medo inato de locais abertos e elevados, os animais quando expostos ao LCE entram menos vezes e permanecem um menor tempo nos braços abertos. Assume-se que os animais que permanecem maior período nos braços abertos do labirinto em cruz elevado apresentam um menor nível de ansiedade. O tratamento com agentes ansiolíticos tem sido usado para validar este teste comportamental (PINHEIRO et al., 2007).

O teste de LCE foi realizado como descrito anteriormente (BUSNARDO et al., 2013b; GOUVEIA et al., 2016; PADOVAN; GUIMARÃES, 2000). O aparelho consistiu em dois braços abertos opostos (50 x 10 cm) cruzados em ângulo reto por dois braços das mesmas dimensões, cercados por paredes com 40 cm de altura e sem teto. O labirinto estava localizado 50 cm acima do chão. Os ratos foram colocados individualmente no centro do aparelho e foram permitidos explorar livremente o LCE por 5 minutos. O aparelho foi limpo com uma solução de álcool (20%) antes de cada sessão para evitar que ratos subsequentes fossem influenciados por odores depositados pelo rato anterior. O comportamento foi gravado por uma câmera (Microsoft lifecam cinema HD) conectada a um microcomputador, e os comportamentos foram analisados pelo software de rastreamento comportamental ANY-maze® (Stoelting, Wood Dale, IL, EUA).

Os parâmetros espaço-temporais convencionais avaliados foram o número de entradas nos braços fechados e a porcentagem de entradas e tempo gasto nos braços abertos.

2.4. *Teste do Campo Aberto*

O teste de campo aberto (CA) foi realizado para avaliação da atividade locomotora e os comportamentos relacionados à ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003; GRIPPO et al., 2014). O CA consiste de uma câmara PLEXIGLAS de assoalho preto medindo 54 cm (largura) x 54 cm (comprimento) x 30 cm (altura). Uma área central no meio do arena de 24 cm (largura) x 24 cm (comprimento) é definida como um campo exposto e é referido como "centro". Os ratos foram colocados individualmente no meio da arena e tiveram seu comportamento filmado por 5 minutos. A análise incluiu medidas da distância percorrida no centro (locomoção central) e área periférica (locomoção periférica), bem como o total da distância percorrida (isto é, centro + periferia) (locomoção total). Todas as sessões foram gravadas em vídeo (Webcam LifeCam Cinema HD 720p Microsoft® usando o software Microsoft LifeCam versão 3.22) e a análise foi realizada de maneira cega, usando o software ANY-labirinto (Stoelting, Wood Dale, Illinois, EUA). O campo aberto foi limpo com uma solução de álcool 20% antes de cada teste com cada animal (DE PAIVA et al., 2010; COSTA-FERREIRA et al., 2019).

2.5. *Análise estatística*

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média estão representados em gráficos (resultados). Teste t, análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias

seguidas do pós-teste de Newman Keuls foram utilizados para as comparações dos dados. Diferenças foram consideradas para $p < 0,05$.

2.6. Comportamento semelhante à ansiedade em ratos normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de 24 h de PH-RP.

Os animais foram alojados em caixas individuais e distribuídos nos seguintes grupos experimentais, de acordo com a tabela 4.1

Tabela 4.1: Linhagens e condições experimentais do teste de LCE e CA.

Ratos	Condição
Normotensos	Hidratados (basal)
Normotensos	Após 24 h de privação hídrica (PH)
Normotensos	Após 2 h livre acesso à água (RP)
Normotensos	Após 1 h de livre acesso ao NaCl 0,3 M e água (apetite sódio)
SHRs	Hidratados (basal)
SHRs	Após 24 h de privação hídrica (PH)
SHRs	Após 2 h livre acesso à água (RP)
SHRs	Após 1 h de livre acesso ao NaCl 0,3 M e água (apetite ao sódio)

Cada animal recebeu os bebedouros graduados para ingestão de água e NaCl 0,3 M de acordo com o respectivo grupo experimental. No momento do teste comportamental, cada animal foi levado individualmente ao LCE para análise comportamental, pelo tempo de 5 minutos. Em seguida, o animal foi direcionado a outra sala e aguardado o tempo de 5 minutos para então dar início ao teste do campo aberto. Para esta avaliação, cada animal foi submetido a apenas uma condição experimental.

3. RESULTADOS

3.1. Comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado em ratos normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de PH-RP

Os SHRs hidratados apresentaram maior tempo gasto nos braços abertos quando comparado com normotensos ($49,5 \pm 4$ vs. normotensos: $33 \pm 5,4\%$) (Figura 4.1C), sem

diferença significativa no número de entradas nos braços fechados (7 ± 1 vs. normotensos: 9 ± 1) (Figura 4.1A), braços abertos (53 ± 5 vs. normotensos: 41 ± 6) (Figura 4.1B) e o tempo de permanência no centro (84 ± 5 vs. normotensos: 84 ± 4 segundos) (Figura 4.1D).

A privação hídrica não produziu nenhuma diferença nos parâmetros avaliados tanto em SHRs quanto em ratos normotensos quando comparado com a condição hidratado. Contudo, os SHRs apresentaram um percentual maior de entradas (61 ± 5 vs. normotensos: $35 \pm 5\%$), bem como maior tempo de permanência nos braços abertos (51 ± 5 vs. normotensos: $27 \pm 5\%$), além de uma diminuição no número de entradas nos braços fechados (5 ± 1 vs. normotensos: 10 ± 1), quando comparado com animais normotensos, sem diferença significativa no tempo de permanência no centro (79 ± 7 vs. normotensos: 74 ± 7 segundos).

Após a reidratação parcial, ANOVA não mostrou diferença significativa em SHRs e animais normotensos, quando comparado com a condição hidratado, nos parâmetros avaliados. Contudo, foi possível observar diferenças significativas entre SHRs e normotensos no percentual entradas (53 ± 6 vs. normotensos: $31 \pm 4\%$), no tempo de permanência nos braços abertos (43 ± 7 vs. normotensos: $19 \pm 4\%$), no número de entradas nos braços fechados (6 ± 1 vs. normotensos: 9 ± 1), sem diferença no tempo de permanência no centro (97 ± 12 vs. normotensos: 83 ± 8 segundos).

Após o término do período de apetite ao sódio, os SHRs apresentaram uma diminuição no tempo de permanência nos braços abertos, quando comparado com a condição hidratado (32 ± 5 vs. hidratado: $49 \pm 4\%$), sem diferença significativa para os ratos normotensos (18 ± 5 vs. hidratado: $33 \pm 5\%$).

Contudo, os SHRs apresentaram um percentual maior de entradas nos braços abertos (44 ± 4 vs. normotensos: $25 \pm 6\%$), bem como maior tempo de permanência nos braços abertos (32 ± 5 vs. normotensos: $18 \pm 5\%$), além de aumento no tempo de permanência no centro (96 ± 9 vs. normotensos: 69 ± 6 segundos), quando comparado com animais normotensos, sem diferença significativa no número de entradas nos braços fechados (8 ± 1 vs. normotensos: 9 ± 1).

Na tabela 4.2 estão apresentados os resultados da ANOVA dos respectivos resultados.

Tabela 4.2: Análise estatística dos resultados dos testes de LCE e CA.

Resultados	ANOVA (2 fatores)
Número de entradas nos braços fechados (Figura 4.1A)	Linhagem [F(1,91)=14,073; p<0,001]
	Tratamento [F(3,91)=0,476; p= 0,700]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=1,176; p= 0,324]
Percentual do número entradas nos braços abertos (Figura 4.1B)	Linhagem [F(1,91)=24,731; p<0,001]
	Tratamento [F(3,91)=2,484; p= 0,066]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=0,647; p= 0,587]
Percentual do tempo gasto nos braços abertos (Figura 4.1C)	Linhagem [F(1,91)=30,382; p<0,001]
	Tratamento [F(3,91)=4,232; p= 0,008]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=0,488; p= 0,692]
Tempo gasto no centro (Figura 4.1D)	Linhagem [F(1,91)=4,579; p=0,035]
	Tratamento [F(3,91)=0,949; p= 0,421]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=0,985; p= 0,404]

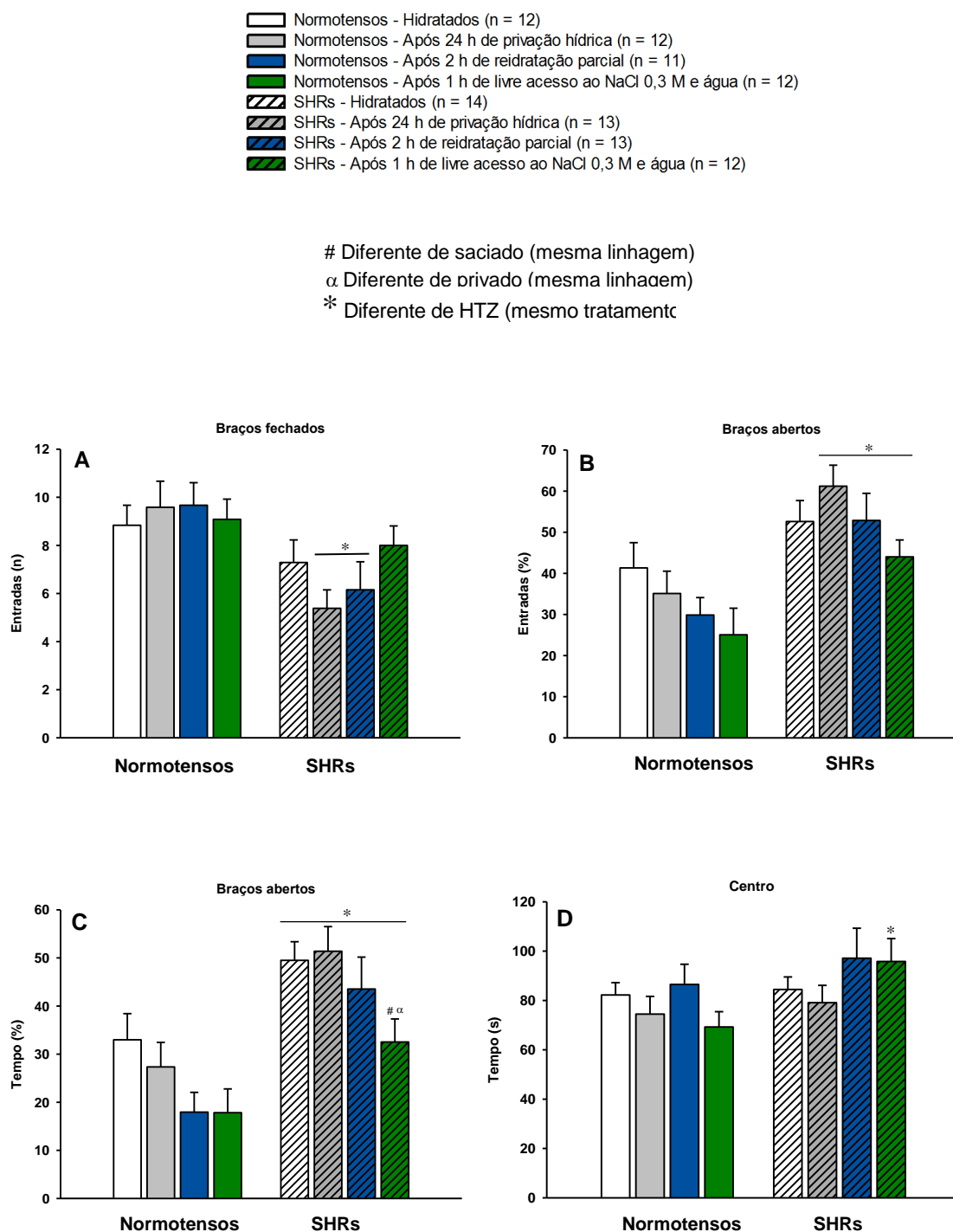


Figura 4.1: Comportamentos relacionados à ansiedade no labirinto em cruz elevado em ratos normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de PH-RP. **A**, número de entradas nos braços fechados. **B**, percentual do número entradas nos braços abertos. **C**, percentual do tempo gasto nos braços abertos. **D**, tempo gasto no centro. As barras representam a média \pm EPM, N = número de animais por grupo.

3.2. Atividade locomotora e comportamentos relacionados à ansiedade no campo aberto em ratos normotensos e SHRs submetidos ao protocolo de PH-RP.

No teste do CA, os SHRs hidratados apresentaram um aumento na atividade locomotora central ($23,2 \pm 2,6$ vs. normotensos: $7,8 \pm 1,8$ m) (Figura 4.2C), no tempo gasto no centro do aparato (46 ± 7 vs. normotensos: 9 ± 2 s) (Figura 4.2D), bem como no número de entradas no centro (13 ± 1 vs. normotensos: 5 ± 1) (Figura 4.2F) e uma diminuição no tempo gasto na periferia (253 ± 7 vs. normotensos: 290 ± 2 s) (Figura 4.2E) quando comparado com ratos normotensos da mesma condição, sem diferença significativa na atividade locomotora total ($114,3 \pm 6,6$ vs. normotensos: $106,4 \pm 12$ m) (Figura 4.2A), atividade locomotora periférica ($91 \pm 5,5$ vs. normotensos: $98,6 \pm 10,7$ m) (Figura 4.2B) e velocidade percorrida ($0,03 \pm 0,01$ vs. normotensos: $0,03 \pm 0,01$ s) (Figura 4.2G).

Após a privação hídrica não foram observadas diferenças nos parâmetros avaliados entre as linhagens quando comparado com a condição hidratado. Contudo, os SHRs apresentaram um aumento na atividade locomotora central ($20,4 \pm 1,6$ vs. normotensos: $6,8 \pm 1,4$ m), no tempo gasto no centro do aparato (42 ± 7 vs. normotensos: 9 ± 2 s), bem como no número de entradas no centro (11 ± 1 vs. normotensos: 5 ± 1), além de uma diminuição na atividade locomotora periférica ($75,4 \pm 6$ vs. normotensos: $103,2 \pm 7,4$ m) e no tempo gasto na periferia (257 ± 7 vs. normotensos: 291 ± 2 seg.), quando comparado com ratos normotensos, sem diferença significativa na atividade locomotora total ($96 \pm 6,1$ vs. normotensos: $110 \pm 7,8$ m) e na velocidade média ($0,03 \pm 0,01$ vs. normotensos: $0,03 \pm 0,01$ m/s).

Após o período correspondente à reidratação parcial, ANOVA não mostrou diferença significativa em SHRs e animais normotensos, quando comparado com a condição hidratado, em todos os parâmetros avaliados. Contudo, houve diferenças significativas entre as linhagens na atividade locomotora periférica ($92,8 \pm 4$ vs. normotensos: $116,9 \pm 7,8$ m), atividade locomotora central ($21,6 \pm 2,2$ vs. normotensos: $5,8 \pm 1,2$ m), tempo gasto no centro (42 ± 8 vs. normotensos: 5 ± 1 seg.), tempo gasto na periferia (256 ± 8 vs. normotensos: 294 ± 1 seg.) e número de entradas no centro (14 ± 1 vs. normotensos: 3 ± 1 m).

Após o término do teste do apetite ao sódio, os SHRs apresentaram uma diminuição significativa na atividade locomotora periférica ($78,7 \pm 8,9$ vs. hidratado: $91 \pm 5,5$ m), atividade locomotora central ($14,4 \pm 1,5$ vs. hidratado: $23,2 \pm 2,6$ m), tempo gasto no centro

(25 ± 2 vs. hidratado: 46 ± 7 s) e número de entradas no centro (9 ± 1 vs. hidratado: 13 ± 1 s), bem como aumento no tempo gasto na periferia (274 ± 3 vs. hidratado: 253 ± 7 s) quando comparado com SHRs na condição hidratados.

Para os animais normotensos, houve um aumento na atividade locomotora total ($138,7 \pm 8,3$ vs. hidratado: $106,4 \pm 11,9$ m), bem como um aumento na velocidade média percorrida ($0,03 \pm 0,01$ vs. hidratado: $0,04 \pm 0,01$ m/s) quando comparado com ratos normotensos na condição hidratados.

ANOVA também mostrou diferenças significativas entre as linhagens em relação à atividade locomotora total (93 ± 2 vs. normotensos: $138,7 \pm 8,3$ m), atividade locomotora periférica ($78,7 \pm 8,9$ vs. normotensos: $132,6 \pm 7,5$ m), atividade locomotora central ($14,4 \pm 1,5$ vs. normotensos: $6,1 \pm 1,7$ m), tempo gasto no centro (25 ± 2 vs. normotensos: 5 ± 1 s), tempo gasto na periferia (274 ± 3 vs. normotensos: 294 ± 1 s), número de entradas no centro (9 ± 1 vs. normotensos: 4 ± 1) e velocidade média percorrida ($0,03 \pm 0,01$ vs. normotensos: $0,04 \pm 0,01$ s).

Na tabela 4.3 estão apresentados os resultados da ANOVA dos respectivos resultados.

- Normotensos - Hidratados (n = 12)
- Normotensos - Após 24 h de privação hídrica (n = 12)
- Normotensos - Após 2 h de reidratação parcial (n = 11)
- Normotensos - Após 1 h de livre acesso ao NaCl 0,3 M e água (n = 12)
- ▨ SHRs - Hidratados (n = 14)
- ▨ SHRs - Após 24 h de privação hídrica (n = 13)
- ▨ SHRs - Após 2 h de reidratação parcial (n = 13)
- ▨ SHRs - Após 1 h de livre acesso ao NaCl 0,3 M e água (n = 12)

* Diferente de HTZ
 # Diferente de saciado (mesma linhagem)
 α Diferente de privado (mesma linhagem)
 β Diferente de reidratado (mesma linhagem)
 & Diferente de HTZ - após apetite ao sódio

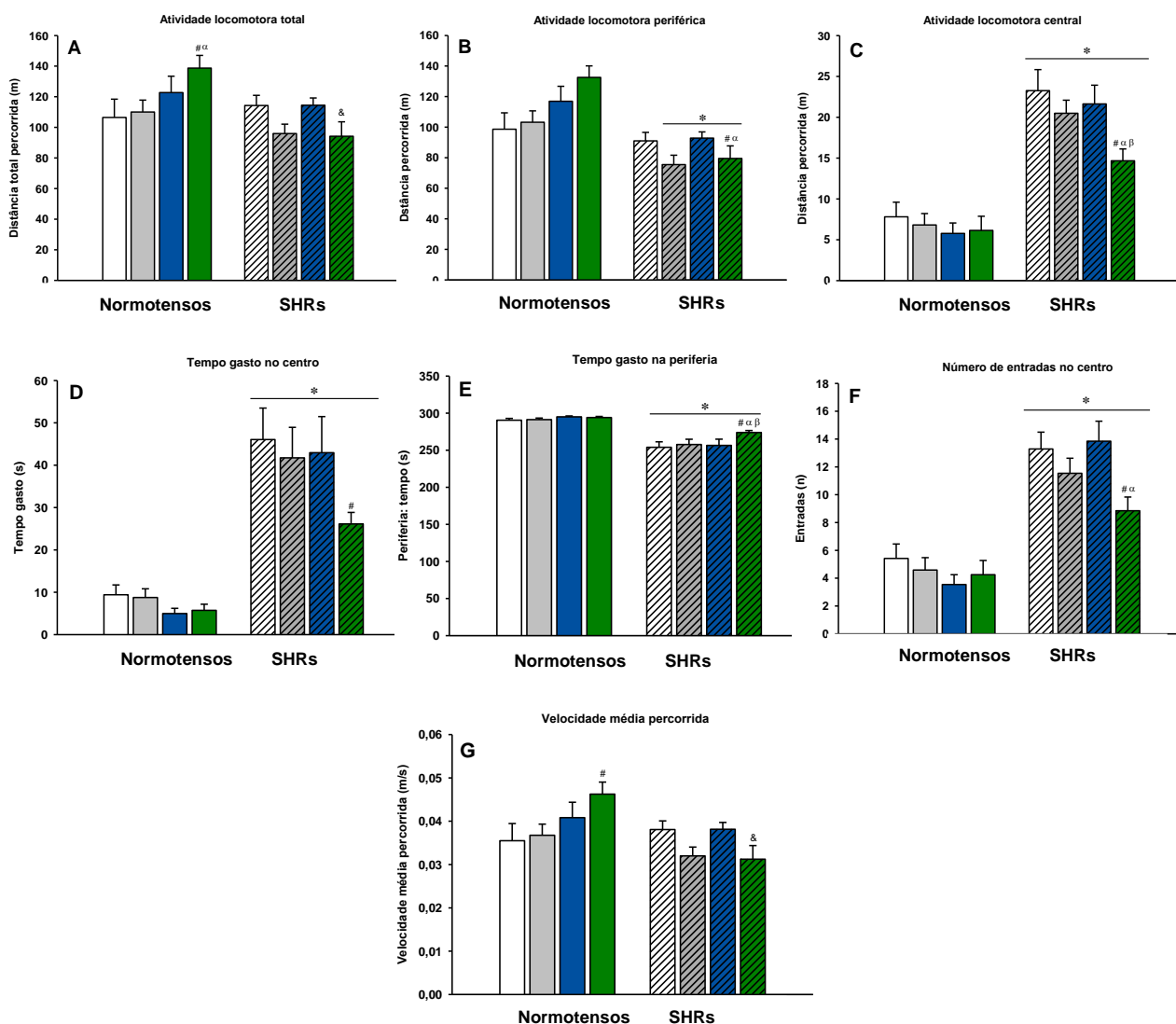


Figura 4.2: Atividade locomotora e comportamentos relacionados à ansiedade no campo aberto em ratos normotensos e SHRs, submetidos ao protocolo de PH-RP. **A**, atividade locomotora total (metros); **B**, atividade locomotora na periferia do aparato (metros); **C**, atividade locomotora no centro do aparato (metros); **D**, tempo gasto no centro do aparato (segundos); **E**, tempo gasto na periferia (segundos); **F**, número de entradas no centro; **G**, velocidade média percorrida (metros por segundo). As barras representam a média ± EPM, N = número de animais por grupo.

Tabela 4.3: Análise estatística dos resultados dos testes de CA.

Resultados	ANOVA (2 fatores)
Atividade locomotora total (Figura 4.2A)	LINHAGEM [F(1,91)=6,350; p=0,013]
	Tratamento [F(3,91)=1,331; p= 0,269]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=3,507; p= 0,018]
Atividade locomotora periférica (Figura 4.2B)	LINHAGEM [F(1,91)=27,688; p<0,001]
	Tratamento [F(3,91)=2,163; p= 0,098]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=3,164; p= 0,028]
Atividade locomotora central (Figura 4.2C)	LINHAGEM [F(1,91)=99,400; p<0,001]
	Tratamento [F(3,91)=2,681; p= 0,05]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=1,668; p= 0,179]
Tempo gasto no centro (Figura 4.2D)	LINHAGEM [F(1,91)=70,355; p<0,001]
	Tratamento [F(3,91)=1,947; p= 0,128]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=1,212; p= 0,310]
Tempo gasto na periferia (Figura 4.2E)	LINHAGEM [F(1,91)=72,415; p<0,001]
	Tratamento [F(3,91)=1,991; p= 0,121]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=1,302; p= 0,279]
Número de entradas no centro (Figura 4.2F)	LINHAGEM [F(1,91)=92,764; p<0,001]
	Tratamento [F(3,91)=2,171; p= 0,097]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=2,062; p= 0,111]
Velocidade média percorrida (Figura 4.2G)	LINHAGEM [F(1,91)=6,453 p=0,013]
	Tratamento [F(3,91)=1,282; p= 0,285]
	Tratamento x linhagem: [F(3,91)=3,582; p= 0,017]

3.3. *Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos normotensos e SHRs submetidos aos testes de LCE e CA*

A ingestão de água e NaCl 0,3 M pelos ratos normotensos e SHRs submetidos aos testes de LCE e CA estão apresentadas na tabela 4.4. Essa ingestão está relacionada ao protocolo de PH-RP. Os animais hidratados, que não passaram pelo protocolo de PH-RP, após a realização dos testes comportamentais também tiveram livre acesso à água e NaCl 0,3 M pelo mesmo período que os demais grupos, tendo sido registrado os volumes ingeridos. Os animais dos demais grupos que passaram pelo protocolo de PH-RP apresentaram um aumento na ingestão de água e NaCl 0,3 M quando comparado com hidratados (controle).

ANOVA mostrou diferença entre ratos normotensos e SHRs na ingestão de NaCl 0,3 M [$F(1,91)=185,471$; $p < 0,001$], bem como na ingestão de água [$F(1,91)=17,452$; $p < 0,001$], para os grupos privação hídrica (PH), reidratação parcial (RP) e grupo 1 h após acesso ao NaCl 0,3 M.

O peso corporal dos SHRs e ratos normotensos estão apresentados na tabela 4.5.

Tabela 4.4: Ingestão de água e NaCl 0,3 M em SHRs e normotensos submetidos ao protocolo de PH-RP (ml/100 g pc).

Ratos	Tratamento	Reidratação parcial (120 min)	Ingestão de água (60 min)	Ingestão de NaCl 0,3 M (60 min)
Normotensos	Hidratados (basal)	0,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Normotensos	Após 24 h de privação hídrica (PH)	4,9 ± 0,5*	0,5 ± 0,1	0,5 ± 0,1
Normotensos	Após 2 h livre acesso à água (RP)	6,3 ± 0,5* ^α	0,7 ± 0,3	0,5 ± 0,1
Normotensos	Após 1 h de livre acesso ao NaCl 0,3 M e água (apetite ao sódio)	6 ± 0,3* ^α	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1
SHRs	Hidratados (basal)	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1
SHRs	Após 24 h de privação hídrica (PH)	4 ± 0,3*	1,4 ± 0,2* [#]	3 ± 0,2* [#]
SHRs	Após 2 h livre acesso à água (RP)	4,7 ± 0,3* [#]	1,6 ± 0,6* [#]	2,9 ± 0,3* [#]
SHRs	Após 1 h de livre acesso ao NaCl 0,3 M e água (apetite ao sódio)	4,5 ± 0,3* [#]	1 ± 0,1*	2,8 ± 0,3* [#]

* Diferente de hidratados
Diferente de normotensos
^α Diferente de após 24 h de privação hídrica (PH)

Tabela 4.5: Peso corporal (g) de SHRs e ratos normotensos.

Ratos	Tratamento	Peso (g)
Normotensos	Hidratados (basal)	356,4 ± 5,5
Normotensos	Após 24 h de privação hídrica (PH)	346,6 ± 5
Normotensos	Após 2 h livre acesso à água (RP)	341,8 ± 5
Normotensos	Após 1 h de livre acesso ao NaCl 0,3 M e água	341 ± 6
SHRs	Hidratados (basal)	323,5 ± 6
SHRs	Após 24 h de privação hídrica (PH)	323,4 ± 5 [#]
SHRs	Após 2 h livre acesso à água (RP)	322,1 ± 6 [#]
SHRs	Após 1 h de livre acesso ao NaCl 0,3 M e água	326,7 ± 6 [#]

Diferente de normotensos

4. DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostram que em condições basais, os SHRs apresentam maior tempo gasto nos braços abertos do LCE e um aumento na atividade locomotora central, bem como o número de entradas e tempo gasto no centro do aparato do campo aberto, sugerindo um padrão de comportamento do tipo menos ansioso que os ratos normotensos. A privação hídrica de 24 h e reidratação parcial não produziram nenhuma alteração em comparação ao respectivo basal, no comportamento semelhante à ansiedade de animais normotensos e SHRs. Entretanto, após o período correspondente ao teste do apetite ao NaCl foi observado um aumento na atividade locomotora total, bem como na velocidade média percorrida em ratos normotensos. Em SHRs, após o término do apetite ao sódio, foi observada uma diminuição significativa no tempo gasto nos braços abertos do LCE, diminuição na atividade locomotora periférica, central, número de entradas e permanência no centro do aparato do CA, além de um aumento no tempo gasto na periferia, quando comparado a sua condição basal (hidratado).

Nossos resultados corroboram com estudos anteriores, mostrando que SHRs apresentam maior tempo gasto nos braços abertos do LCE, sugerindo um padrão de comportamento do tipo menos ansioso que ratos normotensos, (GENTSCH; LICHTSTEINER; FEER, 1987; RAMOS et al., 1997; FERGUSON; CADA, 2004; FERGUSON; GRAY, 2005; STERLEY; HOWELLS; RUSSELL, 2011; ZUBCEVIC et al., 2018). O aumento da atividade de locomoção observada em SHRs no presente estudo parece estar associado ao reduzido nível de ansiedade em SHRs, de acordo com estudos prévios (HOWELLS; BINDEWALD; RUSSELL, 2009; GARCIA; KIRKPATRICK, 2013; TSAI et al., 2017; REPOVA et al., 2019).

Vários estudos têm demonstrado a associação entre o comportamento emocional do tipo ansiedade e ANG II. A infusão crônica de ANG II promoveu aumento de indicadores de ansiedade em ratos e camundongos normotensos, verificado pelo menor tempo gasto nos braços abertos no labirinto em cruz elevado (DUCHEMIN et al., 2013). Por outro lado, a administração de um antagonista do receptor AT1 da ANG II aumentou o tempo gasto nos braços abertos do LCE e o número de entradas nos braços abertos em ratos normotensos, sugerindo uma redução da ansiedade (PAVEL et al., 2008). Além disso, camundongos *knock-out* para os receptores AT1 no hipotálamo passou significativamente mais tempo os braços abertos no LCE quando comparado aos controles (WANG et al., 2016), sugerindo

que ANG II, atuando especificamente no hipotálamo desempenha um papel significativo no comportamento semelhante à ansiedade.

Dados prévios da literatura mostraram que em ratos Wistar, por meio do teste da caixa de luz escura para avaliar o estado de ansiedade, foi verificado um aumento significativo do tempo gasto no compartimento escuro a partir da primeira semana de privação hídrica em comparação aos ratos controle, continuando ao longo da segunda semana de privação completa de água (CHATOUI et al., 2020). Outro estudo mostrou que ratos Wistar com diabetes tipo 1 (induzido por estreptozotocina) e ratos Wistar privados de água, de forma semelhante, tiveram um aumento no número de entradas nos braços abertos do LCE e passaram mais tempo nesses braços em comparação com seus respectivos grupos de controle, (REBOLLEDO-SOLLEIRO et al., 2013). Em conjunto esses resultados sugerem que a desidratação tem efeito ansiolítico em animais normotensos.

Em nosso estudo testamos se aumento fisiológico de angiotensina II, induzido por privação hídrica de 24 h, seguida de reidratação parcial (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010), influenciaria as respostas comportamentais relacionadas à ansiedade em ratos normotensos e SHRs. Em ratos normotensos, o protocolo de PH-RP não alterou as respostas comportamentais do tipo ansiedade e atividade locomotora. Contudo, após a fase de apetite ao sódio houve um aumento na atividade locomotora nesses animais, quando comparado com a condição basal. Como discutimos no capítulo 2, os ratos normotensos não apresentaram um aumento na palatabilidade ao NaCl, bem como na ingestão de NaCl 0,3 M durante a fase de apetite ao sódio, induzido pelo protocolo de PH-RP. Em conjunto, esses sugerem que nem a palatabilidade ao sódio nem o perfil de respostas relacionadas ao comportamento do tipo ansiedade são modificados por 24 h de PH-RP. Entretanto, após finalizar o teste de apetite ao sódio, houve um aumento na atividade locomotora em relação à condição basal, ou seja, foi observado um aumento na atividade exploratória e velocidade média percorrida nesses animais. Contudo, mais estudos são necessários para esclarecer esse efeito observado após livre acesso ao sódio em animais normotensos.

Em relação aos SHRs, também foi visto que a privação hídrica, bem como a reidratação parcial não causou diferença no perfil de respostas comportamentais ligadas à ansiedade e atividade locomotora, quando comparadas com condição basal. Interessantemente, após o episódio de apetite ao sódio, os SHRs apresentaram uma mudança nesse perfil de comportamento, isto é, apresentaram uma menor atividade exploratória, quando comparado com a condição basal. Isso pode ser inferido pela diminuição da

atividade locomotora central, periférica, número de entradas e tempo de permanência no centro do CA e aumento do tempo gasto na periferia, além de apresentar um menor tempo gasto nos braços abertos do LCE. Esses resultados sugerem que após o animal ingerir sódio, induzido por um estímulo osmótico, eles tendem a apresentar uma menor atividade exploratória, ou seja, os SHR^s passaram a explorar menos o ambiente, próximo aos níveis de animais normotensos, o que pode estar relacionado à menor necessidade do animal de busca e aquisição do íon sódio.

Em suma, em condições basais os SHR^s apresentam um padrão de comportamento do tipo menos ansioso que os ratos normotensos. A privação hídrica de 24 h e reidratação parcial, não produziram nenhuma alteração em comparação ao respectivo basal, no comportamento semelhante à ansiedade de animais normotensos e SHR^s. Contudo, após o período de apetite ao sódio, os ratos normotensos apresentaram um aumento na atividade locomotora. Para os SHR^s, após o término do apetite ao sódio, houve uma diminuição significativa no tempo gasto nos braços abertos do LCE, diminuição na atividade locomotora, quando comparado a sua respectiva condição basal (hidratado). Mais estudos são necessários para se elucidar os mecanismos envolvidos.

Capítulo 5

**PADRÃO DE EXPRESSÃO DE RNA HIPOTALÂMICO NÃO
CODIFICANTE INDUZIDO POR DESIDRATAÇÃO EM
NEURONIOS DO NÚCLEO SUPRA-ÓPTICO**

1. INTRODUÇÃO

Uma intensa ingestão de sódio e/ou de solutos osmoticamente ativos promove aumento da osmolaridade plasmática, estabelecendo um quadro de desidratação intracelular. A síntese e secreção de AVP são reguladas centralmente pelo sistema hipotálamo-neurohipofisário. Esse sistema consiste nos grandes neurônios peptidérgicos magnocelulares (NMC) dos núcleos hipotalâmicos supra-ópticos (SON) e núcleos paraventricular (PVN), cujos axônios se projetam para a eminência mediana e terminam em capilares sanguíneos da glândula hipófise posterior. Os aumentos de osmolaridade plasmática detectados pelos neurônios osmossensíveis localizados nos órgãos circumventriculares, dentre eles o órgão subfornical –SFO é que fornecem entradas excitatórias diretas que levam ao aumento da síntese AVP por neurônios magnocelulares do SON e PVN, bem como a secreção de AVP da hipófise posterior (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; ANTUNES-RODRIGUES et al., 2014).

Durante estimulação osmótica, o SON sofre uma plasticidade neural relacionada à sua função desencadeando uma resposta hormonal adequada. Como consequência da depleção dos estoques hipofisários de AVP, que ocorre durante a estimulação osmótica crônica, há a necessidade de sintetizar mais AVP. A estimulação osmótica crônica, induzida por privação hídrica por 72 h (PH) ou sobrecarga crônica de sal (7 dias com apenas NaCl 2% - SS), promove um robusto aumento nos níveis de mRNA para AVP por aproximadamente duas vezes no SON e PVN, com um aumento paralelo na secreção de AVP (KONDO et al., 2004; HAYASHI et al., 2006; YUE et al., 2008).

Em relação ao comportamento ingestivo durante a sobrecarga crônica de sódio (SS – acesso somente a solução de NaCl 2% - 7 dias), (GREENWOOD et al., 2015), foi verificado que animais submetidos à sobrecarga de sódio (SS) ingerem mais solução de NaCl 2% do que os animais controles (que tinham água *ad libitum*) ingerem água, chegando o volume de solução NaCl 2% ingerido ser quase o dobro do volume de água ingerido pelo grupo controle no sétimo dia do experimento. Diante de escolha, os ratos consomem NaCl 0,9 % (isotônico) em vez de água, mas preferem consumir água do que NaCl 2%, solução hipertônica (aversão) (GREENWOOD et al., 2014). No entanto, durante a sobrecarga de sal (SS), a solução salgada é consumida avidamente (GREENWOOD et al., 2014; GREENWOOD et al., 2015). Ainda permanece a questão se esse intenso consumo da

solução salgada, especificamente neste modelo, seria devido a uma alteração da palatabilidade ao sódio, ou apenas pelo fato de ser a única opção hídrica disponível.

Estudos anteriores utilizaram transcriptomas para catalogar todos os genes expressos no SON e PVN, e para identificar genes que são regulados diferencialmente pelos desafios hiperosmóticos da desidratação em machos (HINDMARCH et al., 2006) e fêmeas (QIU et al., 2011), e sobrecarga de sal (GREENWOOD et al., 2014; JOHNSON et al., 2015). Um dos transcritos identificados como sendo regulados positivamente foi o RNA do fator de transcrição 1 indutível por gonadotrofina, “*Gonadotrophin inducible ovarian transcription factor 1*” - **Giot1**, (ortólogo humano ZNF709). Já foi verificado que o Giot1 é regulado positivamente pela desidratação em núcleos hipotalâmicos, como o núcleo supra-óptico (SON) e núcleo paraventricular (PVN) em machos (QIU et al., 2007) e fêmeas (QIU et al., 2011). Semelhante ao efeito observado com as lesões SON e PVN (COVIAN; ANTUNES-RODRIGUES, 1963), resultados ainda não publicados do grupo de pesquisa do Dr. Murphy mostram que, *knockdown* bilateral de Giot1 no SON e PVN bloqueou drasticamente a ingestão de sal durante a sobrecarga de sal, sugerindo que Giot1 permitiria uma alta ingestão de sal. Recente estudo verificou que a diminuição experimental na expressão de Giot1, no PVN de ratas normotensas ovariectomizadas (OVX) submetidas a privação hídrica por 48 h, induziu uma diminuição na ingestão de água e sódio, bem como uma redução na secreção de AVP e ocitocina (OT) (TERRA DOS SANTOS et al., 2021).

Contudo, ainda não se sabe a dinâmica espaço-temporal da expressão de RNA Giot1, o que irá proporcionar maiores informações no entendimento sobre suas funções. Assim sendo, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a expressão hipotalâmica de RNA Giot1, a fim de identificar regiões específicas de neurônios magnocelulares que expressam Giot1.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Os procedimentos experimentais envolvendo animais foram realizados em estrita conformidade com o disposto na *UK Animals (Scientific Procedures) Act (1986)*, assim como as normas vigentes do CONCEA. Foram utilizados ratos Sprague-Dawley, provenientes de Envigo, UK, Home Office UK (PPL 30/3278). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais de aço inoxidável suspensas em estantes (gaioleiros), com livre

acesso a ração comercial e água. Os ratos foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade $50 \pm 10\%$) com ciclo claro-escuro 12-12 h (luz 7:00 – 19:00 h). Os ratos foram eutanasiados por decapitação e os encéfalos foram coletados em gelo seco e imediatamente armazenados no freezer a uma temperatura de -80 graus.

2.2. Protocolo de hibridização in situ RNA Scope

O protocolo utilizado foi o de hibridização in situ RNA Scope para investigar a expressão de Giot1 em neurônios magnocelulares AVP e OT após estresse osmótico. Esta técnica foi realizada de acordo com estudos prévios (BAREZ-LOPEZ et al., 2022). De forma resumida, os cérebros congelados foram cortados em seções coronais de $16 \mu\text{m}$ e montados em lâminas *Superfrost Plus* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) e armazenados à -80 até serem usados. Os cérebros foram fixados em paraformaldeído 4% por 15 min, lavados em PBS e desidratados em concentrações ascendentes de etanol (50%, 70% e 2 vezes 100%) por 5 min cada. O tecido foi tratado com reagente de protease RNAscope IV (*Advanced Cell Diagnostics, 320850*) durante 30 min à temperatura ambiente e lavado duas vezes em água miliquê. As sondas de RNAscope foram hibridizadas por 2 h a 40° em um forno *HyBEZ* (*Advanced Cell Diagnostics, Newark, CA, EUA*). As sondas foram incubadas na seguinte combinação: C1 – Giot1(branco), C2 – AVP (vermelho) e C3 – OT (verde), tendo como DAPI na cor azul. A amplificação do sinal foi realizada usando o *RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit* (*Advanced Cell Diagnostics, 320850*) seguindo as orientações do fabricante e usando o amplificador 4A.

2.3. Caracterização da dinâmica espaço-temporal da expressão de RNA Giot1

A fim de caracterizar completamente os padrões celulares da expressão de Giot1, foi realizada hibridização in situ RNA Scope em combinação com RNAm de AVP e RNAm de OT para marcação de neurônios magnocelulares AVP e OT, respectivamente. Os animais em condições basais (hidratados), desidratados (submetidos à privação hídrica por 72 h), desidratados e após 4 h, 8 h e 24 h da reidratação com acesso à água foram submetidos à eutanásia por decapitação e os encéfalos coletados em gelo seco e armazenados à -80 até serem realizados os cortes encefálicos. Foram utilizados um total de 5 animais por grupo. Foi quantificada a expressão de RNA Giot1 no núcleo e citoplasma de neurônios magnocelulares que expressam AVP (NMC – AVP) e OT (NMC – OT).

2.4. *Aquisição de imagens e análise de dados*

A aquisição das imagens foi realizada com um microscópio confocal de varredura a laser Leica SP5-II AOBS acoplado a uma microscopia de epifluorescência invertida Leica DMI 6000. Arquivos de imagem bruta foram processados para gerar imagens compostas usando o software de análise de imagem de acesso aberto, FIJI. As imagens foram analisadas e quantificadas na região do SON por meio do programa de edição ImageJ. Foi utilizado apenas um corte de encéfalo por animal, num total de 5 encéfalos por grupo.

2.5. *Análise estatística*

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média foram representados em gráficos. Análise de variância (ANOVA) com pós-teste de Newman Keuls (para 1 ou 2 fatores) foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos (significância para $p < 0,05$).

3. RESULTADOS

3.1. *Expressão de RNA Giot1 em neurônios magnocelulares que expressam AVP (NMC – AVP) e OT (NMC – OT) no SON de ratos normotensos*

A privação hídrica de 72 h levou a um aumento na expressão de RNA Giot1 no citoplasma ($0,240 \pm 0,043$ vs. Hidratado: $0,007 \pm 0,0029$) [$F(4,19) = 12,846$; $p < 0,001$] (Figura 5.1.B, 5.2.A) e no núcleo ($0,643 \pm 0,107$ vs. Hidratado: $0,0034 \pm 0,0014$) [$F(4,19) = 39,579$; $p < 0,001$] (Figura 5.1.B, 5.2.B) de neurônios AVP e no citoplasma ($0,0472 \pm 0,0147$ vs. Hidratado: $0,00255 \pm 0,00111$) [$F(4,19) = 6,569$; $p < 0,002$] (Figura 5.1.B, 5.2.C) e núcleo ($0,067 \pm 0,027$ vs. Hidratado: $0,0032 \pm 0,0017$) [$F(4,19) = 15,626$; $p < 0,001$] (Figura 5.1.B, 5.2.D) de neurônios OT, quando comparado com ratos normohidratados.

Além disso, a expressão de Giot1 diminui gradualmente no citoplasma e núcleo de células AVP e OT, de modo que 4 h (Figura 5.1.C), 8 h (Figura 5.1.D) e 24 h (Figura 5.1.E) após a reidratação, a expressão de Giot1 não é significativamente diferente dos níveis de hidratados.

No entanto, é importante destacar que, embora RNA Giot1 aumente sua expressão tanto em neurônios AVP quanto em neurônios OT em resposta à desidratação, neste estado, estimulado osmoticamente, a expressão de RNA Giot1 é maior no citoplasma (Citoplasma AVP: $0,240 \pm 0,043$ vs. Citoplasma OT: $0,047 \pm 0,014$) ($t = 4,189$, GL 8 ($P = 0,003$)) (Figura

5.2.G) e núcleo (Núcleo AVP: $0,643 \pm 0,107$ vs. Núcleo OT: $0,067 \pm 0,027$) ($t = 5,201$, GL 8 ($P < 0,001$)) (Figura 5.2.H) de neurônios AVP em comparação com NMC - OT.

Por outro lado, em ratos hidratados não houve diferença significativa na expressão de RNA Giot1 no citoplasma de NMC – AVP quando comparado com a expressão de RNA Giot1 no citoplasma de NMC – OT (citoplasma AVP: $0,007 \pm 0,002$ vs. Citoplasma OT: $0,002 \pm 0,001$) ($t = 1,401$, GL 8 ($P > 0,05$)) (Figura 5.2.E). O mesmo foi visto para a expressão de RNA Giot1 no núcleo de NMC – AVP e OT (Núcleo AVP: $0,0034 \pm 0,0014$ vs. Núcleo OT: $0,0032 \pm 0,0017$) ($t = 0,0576$, GL 8 ($P > 0,05$)) (Figura 5.2.F).

Realizando uma análise da expressão do transcrito de Giot1 em resposta à desidratação, foi possível verificar uma maior expressão de RNA Giot1 na região nuclear de NMC – AVP quando comparado com a região citoplasmática de NMC – AVP (Núcleo: $0,643 \pm 0,107$ vs. Citoplasma: $0,240 \pm 0,043$) [$F(3,16) = 26,912$; $p < 0,001$](Figura 5.2.I), sem diferença para no grupo hidratado. Em NMC – OT, não houve diferença significativa na expressão de RNA Giot1 no núcleo de NMC – OT quando comparado com a região do citoplasma (Núcleo: $0,067 \pm 0,027$ vs. Citoplasma: $0,047 \pm 0,014$), nem para o grupo de ratos hidratados (Figura 5.1.J).

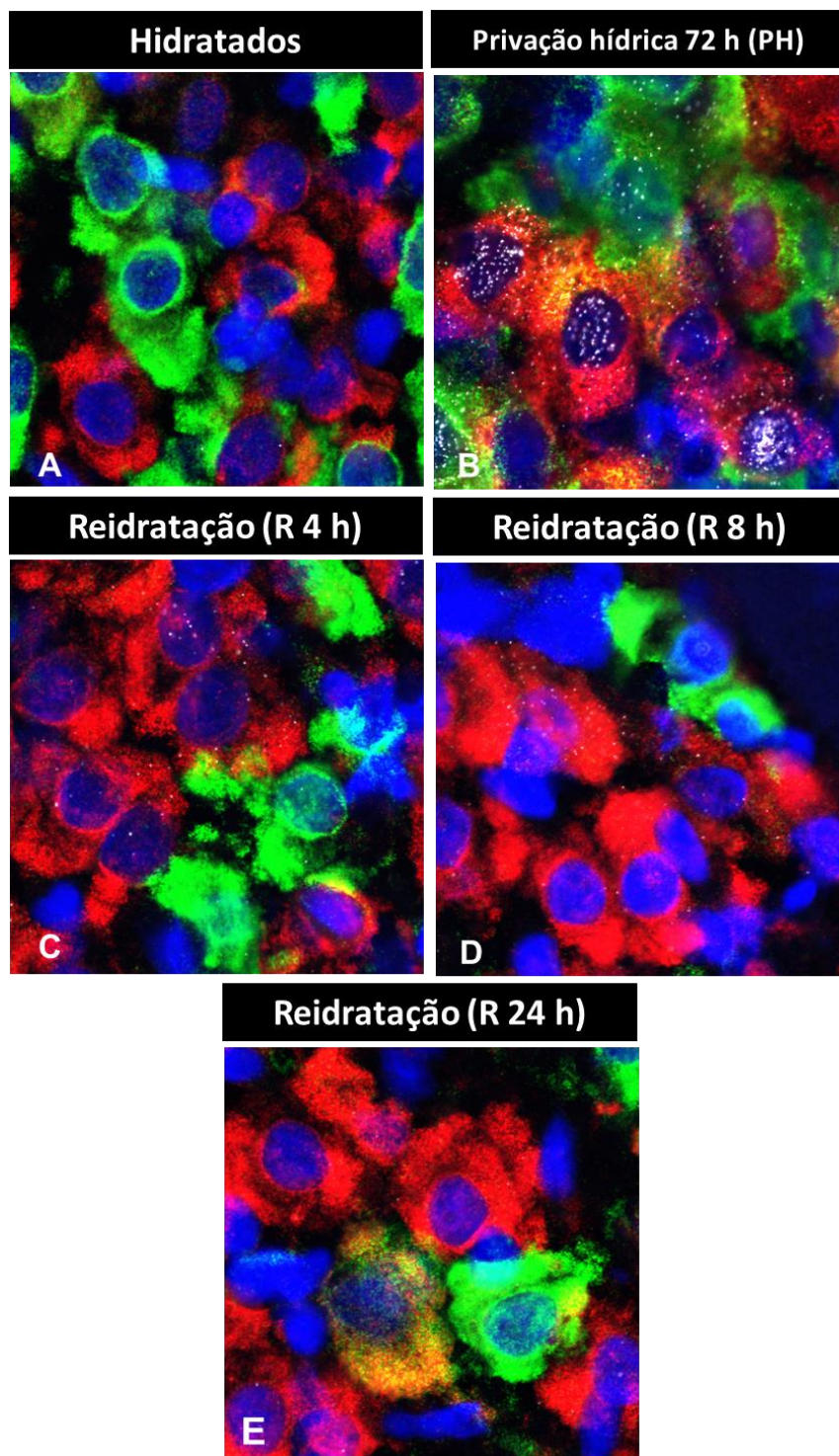


Figura 5.1: Expressão de RNA Giot1 no SON por meio da hibridização in situ RNA *Scope* em combinação com RNAm de AVP e RNAm de OXT para marcação de neurônios magnocelulares AVP e OXT nas condições **A)** Hidratados, **B)** após 72 h de privação hídrica (PH), **C)** após 72 h de privação hídrica seguido por 4 h de reidratação (R 4 h), **D)** após 72 h de privação hídrica seguido por 8 h de reidratação (R 8 h), **E)** após 72 h de privação hídrica seguido por 24 h de reidratação (RH 24 h), DAPI: azul, AVP: vermelho, OT: verde, Giot1: branco.

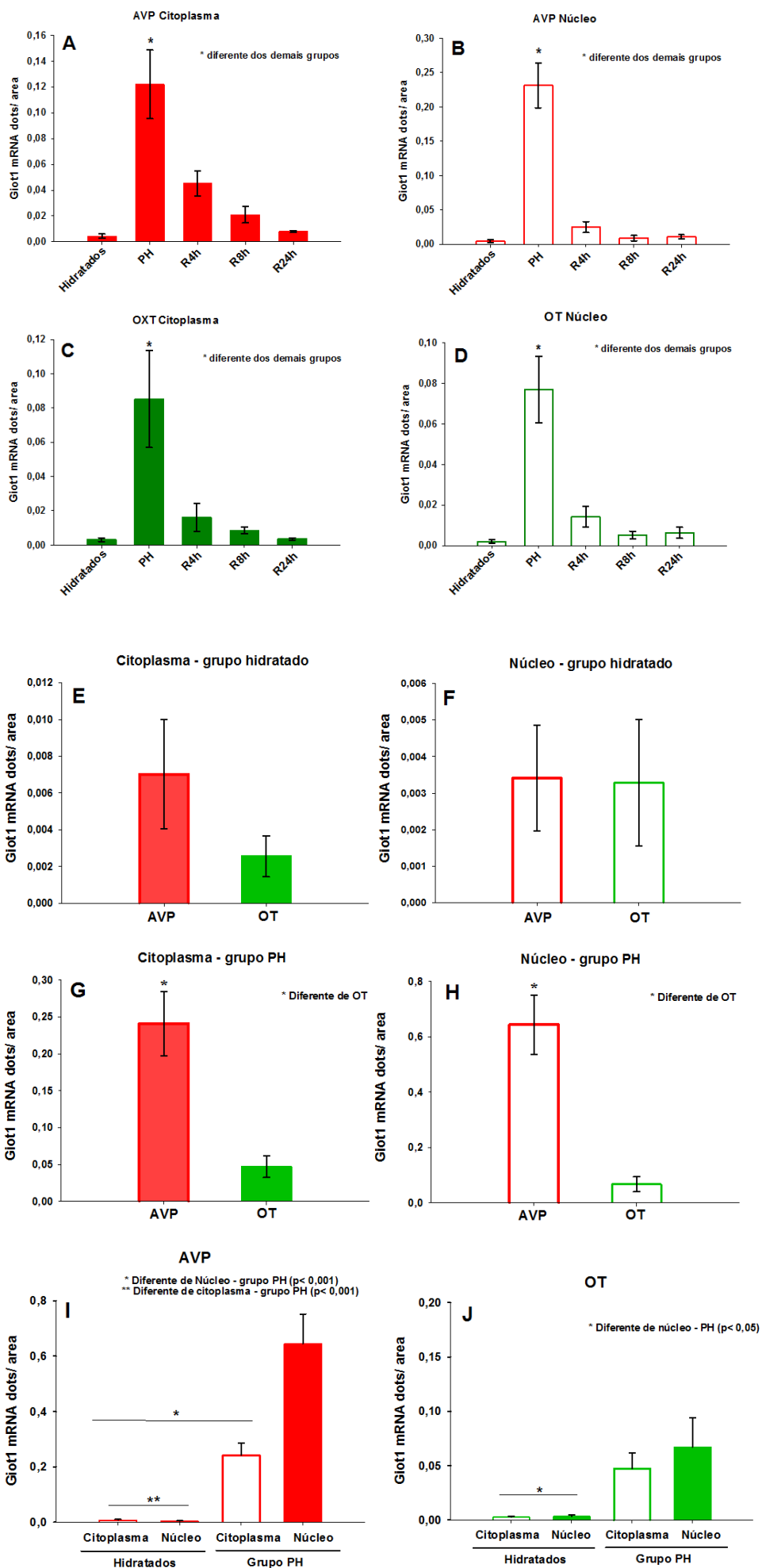


Figura 5.2. Gráficos mostrando expressão gênica de RNA Giot1 em ratos hidratados e após 72 h de privação hídrica (PH) no **A)** citoplasma de neurônios AVP, **B)** expressão de RNA Giot1 no núcleo de neurônios AVP, **C)** expressão de RNA Giot1 no citoplasma de neurônios OT, **D)** expressão de RNA Giot1 no núcleo de neurônios OT, **E)** expressão de RNA Giot1 no citoplasma de neurônios AVP vs. neurônios OT na condição hidratado, **F)** expressão de RNA Giot1 no citoplasma de neurônios AVP vs. neurônios OT no grupo PH, **G)** expressão de RNA Giot1 no núcleo de neurônios AVP vs. neurônios OT na condição hidratados, **H)** expressão de RNA Giot1 no núcleo de neurônios AVP vs. neurônios OT no grupo PH, **I)** expressão de RNA Giot1 no núcleo vs. citoplasma de neurônios AVP em ratos hidratados e PH e **J)** expressão de RNA Giot1 no núcleo vs. citoplasma de neurônios OT em ratos hidratados e PH. Barra de escalas representa 10 μ m. Foram utilizados número de 5 amostras por grupo. Valores são representados como média \pm EPM, sendo considerado $p < 0,05$.

4. DISCUSSÃO

Os presentes resultados mostraram que o estímulo osmótico pela privação hídrica leva a um aumento na expressão de RNA Giot1 no núcleo e no citoplasma de NMC's AVP e OXT. No entanto, a expressão de RNA Giot1 é maior no citoplasma e núcleo de neurônios AVP que em neurônios OXT, sendo que no núcleo essa expressão é maior.

Estudos anteriores evidenciaram que o Giot1 é regulado positivamente pela desidratação em núcleos hipotalâmicos, como o núcleo supra-óptico (SON) e núcleo paraventricular (PVN) em machos (QIU et al., 2007) e fêmeas (QIU et al., 2011). Semelhantemente, os presentes resultados mostraram um aumento na expressão de RNA Giot1 em neurônios AVP e OXT no SON, após a estimulação osmótica induzida por privação hídrica de 72 h.

Além disso, alterações na osmolaridade plasmáticas são responsáveis por promover um significativo aumento nos níveis de mRNA para AVP no SON com consequente aumento na secreção de AVP (KONDO et al., 2004; HAYASHI et al., 2006; YUE et al., 2008). A síntese e secreção do hormônio vasopressina são reguladas centralmente pelo sistema hipotálamo-neurohipofisário. Esse sistema consiste nos grandes neurônios peptidérgicos magnocelulares (NMC) dos núcleos hipotalâmicos supra-ópticos (SON) e núcleos paraventricular (PVN) (ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004; ANTUNES-RODRIGUES et al., 2014). Em nossos resultados, vimos um aumento na expressão de RNA Giot1 em neurônios AVP no SON, podemos dessa forma sugerir que esses genes podem ser profundamente reguladores da expressão do hormônio AVP, particularmente em resposta à desidratação. Uma descrição precisa da expressão desses genes fornecerá, portanto, maiores informações sobre sua função na regulação do equilíbrio hidroeletrólítico.

Estabelecendo uma relação de Giot1 com o comportamento ingestivo, foi demonstrado anteriormente que a ablação do SON e PVN não tem efeito sobre a ingestão de água, mas bloqueia completamente a ingestão de NaCl 2%, (COVIAN; ANTUNES-RODRIGUES, 1963). Semelhante ao efeito observado com as lesões SON e PVN (COVIAN; ANTUNES-RODRIGUES, 1963), o *knockdown* bilateral de Giot1 no SON e PVN bloqueou drasticamente a ingestão de sal durante a sobrecarga de sal, sugerindo que Giot1 permite uma alta ingestão de sal. Corroborando com nossos resultados anteriores, temos mostrado que a estimulação osmótica por privação hídrica promove um aumento na ingestão de sódio, sugerindo dessa forma uma possível relação do gene Giot1 no controle da ingestão de sódio.

Novos estudos estão em andamento na busca de identificar estruturas nucleares e sub-nucleares específicas que expressam RNA Giot1, de forma a proporcionar maiores informações no entendimento sobre suas funções. A marcação de mRNA Giot1 através do protocolo de hibridização *in situ* RNA *Scope* em combinação com imunohistoquímica para várias proteínas de regiões sub-nucleares do SON de ratos hidratados e desidratados tem sido uma ótima ferramenta. A utilização por exemplo de anticorpos específicos contra FIRILARIN (para identificar a região dos nucleolus), SC35 (para identificar região nuclear speckels), PSPC1(nuclear paraspeckels), COILIN (corpo de cajal) para a indentificação de regiões sub-nucleares que contém RNA Giot1, obteremos maiores informações sobre sua eventual função nos núcleos.

Em suma, os resultados mostram que Giot1 é expresso em neurônios AVP e OT no SON e que após uma estimulação osmótica pela privação hídrica ocorre um aumento significativo na expressão de RNA Giot1, sendo que esse aumento é maior no núcleo de neurônios AVP. Além disso, existe uma possível relação de Giot1 com a ingestão de sódio, dessa forma podemos sugerir que parte da ingestão de sódio desencadeada pela privação hídrica seja responsável pela expressão de Giot1 em áreas responsáveis pelo balanço hidroeletrólítico. Os estudos ainda precisam seguir em processo a fim de caracterizarmos por completo a dinâmica espaço-temporal da expressão de Giot1, de forma a obtermos maiores informações sobre suas funções.

Considerações finais

O primeiro conjunto de resultados apresentados nessa tese indicam que SHRs apresentam um intenso apetite e palatabilidade ao NaCl independente das condições do balanço hidroeletrolítico e, parte desse efeito é devido ativação de receptores angiotensinérgicos AT1 centrais.

Assim como para o gosto salgado, SHRs apresentam um aumento na frequência de respostas hedônicas para sacarose e um aumento no número de respostas aversivas para o gosto amargo, sugerindo que a elevada resposta dos SHRs as recompensas ao gosto não correspondem a uma diminuição da palatabilidade a um gosto típico aversivo.

O efeito pressor induzido pelos estímulos gustatórios foi abolido pela prévia administração de prazosina, tanto para animais SHRs quanto animais normotensos, sem diferença entre as linhagens. Esses dados sugerem que o componente afetivo do paladar induz respostas cardiovasculares mediadas pelo sistema nervoso simpático. Além disso, essas respostas encontram-se elevadas em SHRs.

Sensações sensoriais de sabor salgado atingem o núcleo do trato solitário (NTS) através da inervação facial (VII) da parte anterior da língua via fibras do nervo corda do tímpano (BRADLEY, 2007). As projeções ascendentes do NTS para o PVN são bem conhecidas (PALKOVITS, 1999), embora um papel no apetite ao sal não tenha sido descrito ainda. O NTS também está envolvido na recepção de outras aferências viscerais, incluindo informações cardiovasculares, uma região de integração dessas informações. Por outro lado, as projeções do NTS para o núcleo parabraquial lateral (NPBL) na ponte estão relacionadas ao controle do apetite ao sódio. O NPBL recebe projeções do núcleo do trato solitário (NTS) e da área postrema (AP), importantes sítios de integração de informações da periferia (NORGREN, 1981; CIRIELLO; LAWRENCE; PITTMAN, 1984; FULWILER; SAPER, 1984; LANCA; VAN DER KOOY, 1985; HERBERT; MOGA; SAPER, 1990; KRUKOFF; HARRIS; JHAMANDAS, 1993; JHAMANDAS et al., 1996; JOHNSON, 2007). O NPBL também envia projeções para áreas prosencefálicas essenciais para o controle do balanço hidroeletrolítico como o núcleo préóptico mediano, os núcleos supra-óptico (SON) e paraventricular (PNV) do hipotálamo e o núcleo central da amígdala (NORGREN, 1981; CIRIELLO; LAWRENCE; PITTMAN, 1984; FULWILER; SAPER, 1984; LANCA; VAN DER KOOY, 1985; HERBERT; MOGA; SAPER, 1990; KRUKOFF; HARRIS; JHAMANDAS, 1993; JHAMANDAS et al., 1996). O PVN e SON também recebem projeções do OSF (MISELIS, 1981). Por sua vez, o PVN envia projeções colaterais para áreas límbicas, como a amígdala (HERNANDEZ et al., 2015), podendo provocar alterações

nos comportamentos motivacionais, talvez codificando a intensidade da gustação ao sódio (ZARDETTO-SMITH; BELTZ; JOHNSON, 1994; LI et al., 2012). Em relação aos SHRs, foi observado maior aumento na imunorreatividade da proteína Fos em áreas como órgão subfornical (SFO), região comissural núcleo do trato solitário (NTSc) e pré *locus coeruleus* (pré-LC) em comparação as linhagens de ratos normotensos (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010).

Em nossos resultados foi observado que SHRs apresentaram um aumento na intensidade das respostas somáticas, bem como cardiovasculares quando comparadas com ratos normotensos. Além disso, já foi mostrado que SHRs apresentam um maior aumento na imunorreatividade da proteína Fos em áreas como órgão subfornical (SFO), região comissural núcleo do trato solitário (NTSc) e pré *locus coeruleus* (pré-LC) (PEREIRA-DERDERIAN et al., 2010). Tendo em vista esses achados, podemos sugerir que o aumento da atividade dessas regiões possa estar envolvido na maior intensidade das respostas observadas em SHRs.

Especificamente ao gosto salgado, conforme vimos no capítulo 1, os receptores centrais angiotensinérgicos AT1 fazem parte dos mecanismos ativados para aumento da ingestão e palatabilidade ao NaCl em SHRs. Ao contrário do efeito da ativação do receptor AT1 central sobre o aumento da palatabilidade ao NaCl em SHRs, foi mostrado que a ANG II agindo periféricamente nos receptores AT1, em células gustativas, reduz a palatabilidade do NaCl em ratos normotensos (SHIGEMURA et al., 2013). A investigação desse mecanismo periférico de ANG II em receptores AT1 de células gustativas em SHRs é importante para responder questões sobre a palatabilidade em SHRs. Além disso, também é possível que os SHRs sejam menos responsivos aos sinais inibitórios produzidos pela ingestão de NaCl, o que é semelhante aos ratos normotensos com bloqueio dos mecanismos inibitórios do núcleo parabraquial lateral (NPBL) (ANDRADE et al., 2011). Portanto, estudos também podem investigar as vias que transmitem sinais inibitórios, incluindo a integração central de sinais inibitórios em SHRs, particularmente a modulação da palatabilidade e ingestão de NaCl pelos mecanismos do NPBL.

Assim como para o gosto salgado, nossos resultados mostraram que SHRs apresentam um aumento na frequência de respostas hedônicas para sacarose. Podemos sugerir que essa preferência pelo gosto doce, pode estar associada a um aumento nas respostas do sistema β -endorfinérgicos hipotalâmicos (ZHANG; ROCKHOLD, 1993). Além disso, outra via que possa estar envolvida nessas respostas é através da atividade de áreas

límbicas, uma vez que o PVN envia projeções colaterais para áreas límbicas, como a amígdala (HERNANDEZ et al., 2015), podendo provocar alterações nos comportamentos motivacionais, isto é, podendo codificar a intensidade da gustação. O aumento de FOS no NTS de SHRs pode estar contribuindo com uma maior ativação dessa via, contribuindo com o aumento nas propriedades hedônicas ao gosto doce quando comparado com normotensos.

Outras áreas que possam estar envolvidas nas respostas observadas em SHRs são as regiões AV3V e NTS comissural, uma vez que lesões simultâneas nessas regiões produzem uma redução duradoura da pressão arterial em SHRs adultos. (MOREIRA et al., 2009).

Em condições basais os SHRs apresentam um padrão de comportamento do tipo menos ansioso que os ratos normotensos. Ao contrário do que esperávamos, a PH-RP não produziu nenhuma alteração em comparação ao respectivo basal, no comportamento semelhante à ansiedade de animais normotensos e SHRs. Por outro lado, após o término do apetite ao sódio, os SHRs apresentaram uma diminuição significativa no tempo gasto nos braços abertos do LCE, diminuição na atividade locomotora, quando comparado a sua respectiva condição basal (hidratado). Mais estudos são necessários para elucidar os mecanismos envolvidos nesta resposta.

Por fim, por meio da hibridização *in situ* RNA *Scope* para expressão de *Giot1* em neurônios magnocelulares AVP e OT no SON, foi visto que após uma estimulação osmótica pela privação hídrica, ocorre um aumento significativo na expressão de RNA *Giot1*, sendo que esse aumento é maior no núcleo de neurônios AVP. Assim sendo, a expressão de RNA *Giot1* em NMC – AVP e OT no SON de ratos normotensos é regulada por estímulo osmótico. O possível envolvimento de *Giot1* nessas áreas hipotalâmicas sobre a modulação da ingestão e palatabilidade ao sódio, durante condições basais e durante estímulo osmótico, ainda permanece desconhecido.

Em suma, podemos concluir que ratos SHRs apresentam um intenso apetite e palatabilidade ao NaCl independente das condições do balanço hidroeletrólítico e, parte desse efeito, é devido ativação de receptores angiotensinérgicos AT1 centrais. Além do gosto salgado, SHRs tem um aumento nas respostas hedônicas para sacarose, e um aumento no número de respostas aversivas para o gosto amargo, independente das condições do balanço hidroeletrólítico. O componente afetivo do paladar induz respostas cardiovasculares mediadas pelo sistema nervoso autônomo simpático, sendo que nos SHRs essas respostas são observadas com maior intensidade. O comportamento semelhante à ansiedade e atividade locomotora não foram alterados pelo ciclo de privação hídrica e reidratação parcial em

ambas as linhagens. Por outro lado, em ratos normotensos, a desidratação levou a um aumento na expressão do RNA *Giot1* em NMC AVP e OT no SON, em sua maior quantidade no núcleo de NMC AVP, sugerindo uma possível função do gene *Giot1* no controle da secreção de vasopressina.

Os resultados aqui apresentados refletem uma grande realidade em que vivemos atualmente. A alimentação com alta ingestão de sal está diretamente relacionada com problemas cardiovasculares, além disso, a preferência por alimentos salgados é algo que tem contribuído grandemente para o agravamento dessas doenças crônicas, principalmente por parte de pacientes hipertensos. Entender os mecanismos envolvidos no controle da ingestão e preferência pelo gosto salgado irá proporcionar medidas de intervenção que poderá reverter essa situação, contribuindo grandemente na melhora no estilo de vida, bem como em uma alimentação mais saudável.

Bibliografia

ADRIANI, W. et al. The spontaneously hypertensive-rat as an animal model of ADHD: evidence for impulsive and non-impulsive subpopulations. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 27, n. 7, p. 639-51, Nov 2003. ISSN 0149-7634 (Print)

0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14624808> >.

AKEMI SATO, M. et al. Lesions of the commissural nucleus of the solitary tract reduce arterial pressure in spontaneously hypertensive rats. **Hypertension**, v. 38, n. 3 Pt 2, p. 560-4, Sep 2001. ISSN 1524-4563 (Electronic)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566931> >.

ANDRADE-FRANZE, G. M. et al. Lateral parabrachial nucleus and opioid mechanisms of the central nucleus of the amygdala in the control of sodium intake. **Behav Brain Res**, v. 316, p. 11-17, Jan 1 2017. ISSN 1872-7549 (Electronic)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27544874> >.

ANDRADE, C. A. et al. Changes in taste reactivity to intra-oral hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an alpha2-adrenergic receptor agonist. **Physiol Behav**, v. 104, n. 5, p. 702-8, Oct 24 2011. ISSN 1873-507X (Electronic)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803064>
http://ac.els-cdn.com/S0031938411003726/1-s2.0-S0031938411003726-main.pdf?_tid=4b1c24c8-1f98-11e3-9ac0-00000aacb35d&acdnat=1379422650_0f545d577f0275496f8f8ed532a7f802 >.

ANDRADE, C. A. et al. Role of alpha2-adrenoceptors in the lateral parabrachial nucleus in the control of body fluid homeostasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 1, p. 11-8, Jan 2014. ISSN 1414-431X (Electronic)

0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24519089> >.

ANDRADE, C. A. et al. Activation of alpha2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 25-34, 2004. ISSN 0306-4522 (Print)

0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15489025>
http://ac.els-cdn.com/S0306452204006918/1-s2.0-S0306452204006918-main.pdf?_tid=4ea63aa2-1f98-11e3-9c38-00000aab0f6c&acdnat=1379422656_a98cadfab8bd9e7888b17a286a75f26d >.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiol Rev**, v. 84, n. 1, p. 169-208, Jan 2004. ISSN 0031-9333 (Print)

0031-9333 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14715914>
<http://physrev.physiology.org/content/84/1/169.full.pdf> >.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Controle neuroendócrino do balanço hidroeletrólítico. In: (Ed.). **Fisiologia, Aires, M. M.** 4. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012. cap. 75, p.1182-1198.

ANTUNES-RODRIGUES, J. et al. Neuroendocrinology of Hydromineral Homeostasis. In: DE LUCA, L. A.; MENANI, J. V., et al (Ed.). **Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration**. Boca Raton (FL), 2014. (Frontiers in Neuroscience). ISBN 9781466506930.

ASMUNDSON, G. J. G. et al. Do pre-existing anxiety-related and mood disorders differentially impact COVID-19 stress responses and coping? **J Anxiety Disord**, v. 74, p. 102271, Aug 2020. ISSN 1873-7897 (Electronic)

0887-6185 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32673930> >.

BANDELOW, B.; MICHAELIS, S. Epidemiology of anxiety disorders in the 21st century. **Dialogues Clin Neurosci**, v. 17, n. 3, p. 327-35, Sep 2015. ISSN 1958-5969 (Electronic)
1294-8322 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26487813> >.

BAREZ-LOPEZ, S. et al. Transcriptional and post-transcriptional regulation of oxytocin and vasopressin gene expression by CREB3L1 and CAPRN2. **Neuroendocrinology**, Jan 20 2022. ISSN 1423-0194 (Electronic)
0028-3835 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/35051932> >.

BARROSO, W.K.S. et al. Diretrizes Brasileiras de Hipertensão Arterial – 2020. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 116, n. 3, p. 516-658, mar. 2021.

BERRIDGE, K. C. Modulation of taste affect by hunger, caloric satiety, and sensory-specific satiety in the rat. **Appetite**, v. 16, n. 2, p. 103-20, Apr 1991. ISSN 0195-6663 (Print)
0195-6663 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2064389> >.

_____. Measuring hedonic impact in animals and infants: microstructure of affective taste reactivity patterns. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 24, n. 2, p. 173-98, Mar 2000. ISSN 0149-7634 (Print)
0149-7634 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10714382> >.

_____. Motivation concepts in behavioral neuroscience. **Physiol Behav**, v. 81, n. 2, p. 179-209, Apr 2004. ISSN 0031-9384 (Print)
0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15159167> >.

_____. Evolving Concepts of Emotion and Motivation. **Front Psychol**, v. 9, p. 1647, 2018. ISSN 1664-1078 (Print)
1664-1078 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30245654> >.

_____. Berridge KC (2022) Kent Berridge Lab_ Multimedia Videos - 'Liking' (facial affective reactions to tastes). In: Affective taste 'liking'/'disliking' expressions: Human babies, adult apes, monkeys, and rats. Disponível em: < <https://sites.lsa.umich.edu/berridge-lab/multimedia-videos/> >. University of Michigan - 2022 BERRIDGE LAB. Acessado em: 18/09/2022.

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

BERRIDGE, K. C.; KRINGELBACH, M. L. Affective neuroscience of pleasure: reward in humans and animals. **Psychopharmacology (Berl)**, v. 199, n. 3, p. 457-80, Aug 2008. ISSN 0033-3158 (Print)
0033-3158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18311558> >.

_____. Pleasure systems in the brain. **Neuron**, v. 86, n. 3, p. 646-64, May 6 2015. ISSN 1097-4199 (Electronic)
0896-6273 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25950633> >.

BERRIDGE, K. C.; SCHULKIN, J. Palatability shift of a salt-associated incentive during sodium depletion. **Q J Exp Psychol B**, v. 41, n. 2, p. 121-38, May 1989. ISSN 0272-4995 (Print)
0272-4995 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2748936> >.

BIONDOLILLO, J. W.; WILLIAMS, L. A.; KING, M. S. Blocking glutamate receptors in the waist area of the parabrachial nucleus decreases taste reactivity behaviors in conscious rats. **Chem Senses**, v. 34, n. 3, p. 221-30, Mar 2009. ISSN 1464-3553 (Electronic)
0379-864X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19174448> >.

BLUME, A. et al. Increased brain transcription factor expression by angiotensin in genetic hypertension. **Hypertension**, v. 29, n. 2, p. 592-8, Feb 1997. ISSN 0194-911X (Print)

0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9040444> >.

BOOTH, R. E.; JOHNSON, J. P.; STOCKAND, J. D. Aldosterone. **Adv.Physiol.Educ.**, v. 26, p. 8-20, 2002 2002.

BRADLEY, R. M., EDITOR. **The Role of the Nucleus of the Solitary Tract in Gustatory Processing**. Boca Raton (FL): CRC Press, 2007.

BRESLIN, P. A.; SPECTOR, A. C.; GRILL, H. J. A quantitative comparison of taste reactivity behaviors to sucrose before and after lithium chloride pairings: a unidimensional account of palatability. **Behav Neurosci**, v. 106, n. 5, p. 820-36, Oct 1992. ISSN 0735-7044 (Print)

0735-7044 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1332732> >.

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

BRODY, M. J.; O'NEILL, T. P.; PORTER, J. P. Role of central catecholaminergic systems in pathogenesis and treatment of hypertension. **J Cardiovasc Pharmacol**, v. 6 Suppl 5, p. S727-41, 1984. ISSN 0160-2446 (Print)

0160-2446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6084116> >.

CABANAC, M.; LAFRANCE, L. Postingestive alliesthesia: the rat tells the same story. **Physiol Behav**, v. 47, n. 3, p. 539-43, Mar 1990. ISSN 0031-9384 (Print)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2359766> >.

CHATOUI, H. et al. Neurobehavioral and neurophysiological effects of prolonged osmotic stress in rats: A focus on anxiety state and pain perception. **J Chem Neuroanat**, v. 106, p. 101789, Jul 2020. ISSN 1873-6300 (Electronic)

0891-0618 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32334030> >.

CIRIELLO, J.; LAWRENCE, D.; PITTMAN, Q. J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Res**, v. 322, n. 2, p. 388-92, Nov 26 1984. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6509329> >.

CLARKE, S. N.; OSSENKOPP, K. P. Taste reactivity responses in rats: influence of sex and the estrous cycle. **Am J Physiol**, v. 274, n. 3 Pt 2, p. R718-24, Mar 1998. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9530238> >.

COSTA-FERREIRA, W. et al. The AT1 Receptor Antagonist Losartan Does Not Affect Depressive-Like State and Memory Impairment Evoked by Chronic Stressors in Rats. **Front Pharmacol**, v. 10, p. 705, 2019. ISSN 1663-9812 (Print)

1663-9812 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31293424> >.

COSTA, C. O. D. et al. Prevalência de ansiedade e fatores associados em adultos. **Jornal Brasileiro de Psiquiatria**, v. 68, p. 92-100, 2019. ISSN 0047-2085. Disponível em: <

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0047-20852019000200092&nrm=iso >.

COSTALL, B. et al. Effects of captopril and SQ29,852 on anxiety-related behaviours in rodent and marmoset. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 36, n. 1, p. 13-20, May 1990. ISSN 0091-3057 (Print)

0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2112256> >.

COVIAN, M. R.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Specific alterations in sodium chloride intake after hypothalamic lesions in the rat. **Am J Physiol**, v. 205, n. 5, p. 922-6, Nov 1963. ISSN 0002-9513 (Print)

0002-9513 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5877421> >.

DANIELS, D. et al. Angiotensin II stimulates water and NaCl intake through separate cell signalling pathways in rats. **Exp Physiol**, v. 94, n. 1, p. 130-7, Jan 2009. ISSN 1469-445X (Electronic)

0958-0670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723579> >.

DANIELS, D. et al. Divergent behavioral roles of angiotensin receptor intracellular signaling cascades. **Endocrinology**, v. 146, n. 12, p. 5552-60, Dec 2005. ISSN 0013-7227 (Print)
0013-7227 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16123155> >.

DANIELS, D.; YEE, D. K.; FLUHARTY, S. J. Angiotensin II receptor signalling. **Exp Physiol**, v. 92, n. 3, p. 523-7, May 2007. ISSN 0958-0670 (Print)
0958-0670 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329311> >.

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

DE LUCA, L. A., JR. et al. Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiol Behav**, v. 100, n. 5, p. 535-44, Jul 14 2010. ISSN 1873-507X (Electronic)
0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20226201> >.

DE LUCA, L. A., JR. et al. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 2, p. R552-9, Feb 2002. ISSN 0363-6119 (Print)
0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11792666> >.

DE LUCA, L. A.; MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration. In: (Ed.), 2014. ISBN 9781466506930.

DE PAIVA, V. N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behav Brain Res**, v. 215, n. 1, p. 146-51, Dec 20 2010. ISSN 1872-7549 (Electronic)
0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20654654> >.

DE SOUZA, I. M.; MACHADO-DE-SOUSA, J. P. Brazil: world leader in anxiety and depression rates. **Braz J Psychiatry**, v. 39, n. 4, p. 384, Oct-Dec 2017. ISSN 1809-452X (Electronic)
1516-4446 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29160532> >.

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

DI NICOLANTONIO, R. Why does the spontaneously hypertensive rat have an exaggerated preference for sweet and salty solutions? An hypothesis. **J Hypertens**, v. 22, n. 9, p. 1649-54, Sep 2004. ISSN 0263-6352 (Print)
0263-6352 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15311087> >.

DI NICOLANTONIO, R. et al. Salt preference of congenic strains derived from the spontaneously hypertensive rat. **Physiol Behav**, v. 80, n. 5, p. 617-22, Feb 2004. ISSN 0031-9384 (Print)
0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14984794> >.

DI NICOLANTONIO, R.; MENDELSON, F. A.; HUTCHINSON, J. S. Sodium chloride preference of genetically hypertensive and normotensive rats. **Am J Physiol**, v. 245, n. 1, p. R38-44, Jul 1983. ISSN 0002-9513 (Print)
0002-9513 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6869576> >.

DI NICOLANTONIO, R.; SILVAPULLE, M. J. Blood pressure, salt appetite and mortality of genetically hypertensive and normotensive rats maintained on high and low salt diets from weaning. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 15, n. 10, p. 741-51, Oct 1988. ISSN 0305-1870 (Print)
0305-1870 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3271179> >.

DINICOLANTONIO, R.; HUTCHINSON, J. S.; MENDELSON, F. A. Exaggerated salt appetite of spontaneously hypertensive rats is decreased by central angiotensin-converting enzyme blockade. **Nature**, v. 298, n. 5877, p. 846-8, Aug 26 1982. ISSN 0028-0836 (Print)
0028-0836 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7050726> >.

DOMMETT, E. J.; ROSTRON, C. L. Appetitive and consummative responding for liquid sucrose in the spontaneously hypertensive rat model of attention deficit hyperactivity disorder. **Behav Brain Res**, v. 238, p. 232-42, Feb 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic)
0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23117093> >.

DUCHEMIN, S. et al. Chronic perfusion of angiotensin II causes cognitive dysfunctions and anxiety in mice. **Physiol Behav**, v. 109, p. 63-8, Jan 17 2013. ISSN 1873-507X (Electronic)
0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23103834> >.

ELBAY, R. Y. et al. Depression, anxiety, stress levels of physicians and associated factors in Covid-19 pandemics. **Psychiatry Res**, v. 290, p. 113130, Aug 2020. ISSN 1872-7123 (Electronic)
0165-1781 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32497969> >.

ELY, D.; TURNER, M.; MILSTED, A. Review of the Y chromosome and hypertension. **Braz J Med Biol Res**, v. 33, n. 6, p. 679-91, Jun 2000. ISSN 0100-879X (Print)
0100-879X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10829096> >.

EPSTEIN, A. N. Instinct and motivation as explanations for complex behavior. In: DW, P. (Ed.). **The Physiological Mechanisms of Motivation**. New York: Ed. Springer-Verlag, 1982. p.25-58.

_____. Neurohormonal control of salt intake in the rat. **Brain Res Bull**, v. 27, n. 3-4, p. 315-20, Sep-Oct 1991. ISSN 0361-9230 (Print)
0361-9230 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1959025> >.

EPSTEIN, A. N.; STELLAR, E. The control of salt preference in the adrenalectomized rat. **J Comp Physiol Psychol**, v. 48, n. 3, p. 167-72, Jun 1955. ISSN 0021-9940 (Print)
0021-9940 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13242684> >.

FERGUSON, S. A.; CADA, A. M. Spatial learning/memory and social and nonsocial behaviors in the spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley rat strains. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 77, n. 3, p. 583-94, Mar 2004. ISSN 0091-3057 (Print)
0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15006470> >.

FERGUSON, S. A.; GRAY, E. P. Aging effects on elevated plus maze behavior in spontaneously hypertensive, Wistar-Kyoto and Sprague-Dawley male and female rats. **Physiol Behav**, v. 85, n. 5, p. 621-8, Aug 7 2005. ISSN 0031-9384 (Print)
0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16043200> >.

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. 865-72, Aug 1989. ISSN 0735-7044 (Print)
0735-7044 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2669838> >.

FITZSIMONS, J. T. Physiology and pathology of thirst and sodium appetite. In: DW, S. e G, G. (Ed.). **The kidney: physiology and pathophysiology**. New York: Raven Press, 1985. p.885-901.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, v. 78, n. 3, p. 583-686, Jul 1998. ISSN 0031-9333. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9674690> >.

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

FLYNN, F. W.; CULVER, B.; NEWTON, S. V. Salt intake by normotensive and spontaneously hypertensive rats: two-bottle and lick rate analyses. **Physiol Behav**, v. 78, n. 4-5, p. 689-96, Apr 2003. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12782224> >.

FORMAKER, B. K.; HILL, D. L. Peripheral taste responses in genetically hypertensive rats. **Physiol Behav**, v. 47, n. 6, p. 1229-37, Jun 1990. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2168566> >.

_____. Lack of amiloride sensitivity in SHR and WKY glossopharyngeal taste responses to NaCl. **Physiol Behav**, v. 50, n. 4, p. 765-9, Oct 1991. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1775551> >.

FRANK, M. E.; HETTINGER, T. P. What the tongue tells the brain about taste. **Chem Senses**, v. 30 Suppl 1, p. i68-9, Jan 2005. ISSN 1464-3553 (Electronic) 0379-864X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15738200> >.

FULWILER, C. E.; SAPER, C. B. Subnuclear Organization of the Efferent Connections of the Parabrachial Nucleus in the Rat. **Brain Research Reviews**, v. 7, n. 3, p. 229-259, 1984 1984. ISSN 0165-0173. Disponível em: < <Go to ISI>://WOS:A1984TM05800002 >.

GARCIA, A.; KIRKPATRICK, K. Impulsive choice behavior in four strains of rats: evaluation of possible models of Attention-Deficit/Hyperactivity Disorder. **Behav Brain Res**, v. 238, p. 10-22, Feb 1 2013. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23085479> >.

GENTSCH, C.; LICHTSTEINER, M.; FEER, H. Open field and elevated plus-maze: a behavioural comparison between spontaneously hypertensive (SHR) and Wistar-Kyoto (WKY) rats and the effects of chlordiazepoxide. **Behav Brain Res**, v. 25, n. 2, p. 101-7, Aug 1987. ISSN 0166-4328 (Print) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3675823> >.

GIRONACCI, M. M. et al. Protective axis of the renin-angiotensin system in the brain. **Clin Sci (Lond)**, v. 127, n. 5, p. 295-306, Sep 2014. ISSN 1470-8736 (Electronic) 0143-5221 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24827941> >.

GREENWOOD, M. P. et al. Salt appetite is reduced by a single experience of drinking hypertonic saline in the adult rat. **PLoS One**, v. 9, n. 8, p. e104802, 2014. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25111786> >.

GREENWOOD, M. P. et al. A comparison of physiological and transcriptome responses to water deprivation and salt loading in the rat supraoptic nucleus. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 308, n. 7, p. R559-68, Apr 1 2015. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25632023> >.

GRILL, H. J.; BERNSTEIN, I. L. Strain differences in taste reactivity to NaCl. **Am J Physiol**, v. 255, p. R424-R430, 1988 1988.

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

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

GRILL, H. J.; SCHWARTZ, G. J.; TRAVERS, J. B. The contribution of gustatory nerve input to oral motor behavior and intake-based preference. I. Effects of chorda tympani or glossopharyngeal nerve section in the rat. **Brain Res**, v. 573, n. 1, p. 95-104, Feb 21 1992. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1576537> >.

GRIPPO, A. J. et al. The effects of environmental enrichment on depressive and anxiety-relevant behaviors in socially isolated prairie voles. **Psychosom Med**, v. 76, n. 4, p. 277-84, May 2014. ISSN 1534-7796 (Electronic) 0033-3174 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24804886> >.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Textbook of medical physiology**. 10th. Philadelphia: Saunders, 2000. xxxii, 1064 p. ISBN 072168677X.

HAEUSLER, G.; FINCH, L.; THOENEN, H. Central adrenergic neurones and the initiation and development of experimental hypertension. **Experientia**, v. 28, n. 10, p. 1200-3, Oct 15 1972

HANAMORI, T.; ISHIKO, N. Cardiovascular responses to gustatory and mechanical stimulation of the nasopharynx in rats. **Brain Res**, v. 619, n. 1-2, p. 214-22, Aug 13 1993. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8374780> >.

HAY, M.; XUE, B.; JOHNSON, A. K. Yes! Sex matters: sex, the brain and blood pressure. **Curr Hypertens Rep**, v. 16, n. 8, p. 458, Aug 2014. ISSN 1534-3111 (Electronic) 1522-6417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24929952> >.

HAYASHI, M. et al. Vasopressin gene transcription increases in response to decreases in plasma volume, but not to increases in plasma osmolality, in chronically dehydrated rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 290, n. 2, p. E213-7, Feb 2006. ISSN 0193-1849 (Print) 0193-1849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16144818> >.

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

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

HERNANDEZ, V. S. et al. Extra-neurohypophyseal axonal projections from individual vasopressin-containing magnocellular neurons in rat hypothalamus. **Front Neuroanat**, v. 9, p. 130, 2015. ISSN 1662-5129 (Print) 1662-5129 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26500509> >.

HINDMARCH, C. et al. A comprehensive description of the transcriptome of the hypothalamoneurohypophyseal system in euhydrated and dehydrated rats. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 5, p. 1609-14, Jan 31 2006. ISSN 0027-8424 (Print) 0027-8424 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16432224> >.

HORIO, T. Effects of various taste stimuli on heart rate in humans. **Chem Senses**, v. 25, n. 2, p. 149-53, Apr 2000. ISSN 0379-864X (Print) 0379-864X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10781021> >.

HOWELLS, F. M.; BINDEWALD, L.; RUSSELL, V. A. Cross-fostering does not alter the neurochemistry or behavior of spontaneously hypertensive rats. **Behav Brain Funct**, v. 5, p. 24, Jun 23 2009. ISSN 1744-9081 (Electronic) 1744-9081 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19549323> >.

HURLEY, S. W.; JOHNSON, A. K. The biopsychology of salt hunger and sodium deficiency. **Pflugers Arch**, Jan 10 2015. ISSN 1432-2013 (Electronic) 0031-6768 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25572931> >.

INAGAMI, T. et al. Cross-talk between angiotensin II receptors and the tyrosine kinases and phosphatases. **J Am Soc Nephrol**, v. 10 Suppl 11, p. S57-61, Jan 1999. ISSN 1046-6673 (Print) 1046-6673 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9892141> >.

JHAMANDAS, J. H. et al. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: electrophysiological and anatomical observations. **Brain Res Bull**, v. 39, n. 2, p. 115-26, 1996 1996. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8846113> >.

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

JOHNSON, A. K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 8, p. 1388-400, Aug 2007. ISSN 0195-9131 (Print) 0195-9131 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17762373> >.

JOHNSON, A. K.; EDWARDS, G. L. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In: GANTEN, D. e PFAFF, D. (Ed.). **Current Topics in Neuroendocrinology, Behavioral Aspects of Neuroendocrinology**. Berlin: Heidelberg: Springer-Verlag, 1990. p.149-190.

JOHNSON, K. R. et al. A RNA-Seq Analysis of the Rat Supraoptic Nucleus Transcriptome: Effects of Salt Loading on Gene Expression. **PLoS One**, v. 10, n. 4, p. e0124523, 2015. ISSN 1932-6203 (Electronic) 1932-6203 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25897513> >.

JUDY, W. V. et al. Sympathetic nerve activity: role in regulation of blood pressure in the spontaneously hypertensive rat. **Circ Res**, v. 38, n. 6 Suppl 2, p. 21-9, Jun 1976. ISSN 0009-7330 (Print) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/178466> >.

KINZELER, N. R.; TRAVERS, S. P. mu-Opioid modulation in the rostral solitary nucleus and reticular formation alters taste reactivity: evidence for a suppressive effect on consummatory behavior. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 301, n. 3, p. R690-700, Sep 2011. ISSN 1522-1490 (Electronic) 0363-6119 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21697523> >.

KITAMURA, A. et al. Role played by afferent signals from olfactory, gustatory and gastrointestinal sensors in regulation of autonomic nerve activity. **Biol Pharm Bull**, v. 33, n. 11, p. 1778-82, 2010. ISSN 1347-5215 (Electronic) 0918-6158 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21048298> >.

KOGA, Y. et al. High salt intake enhances blood pressure increase during development of hypertension via oxidative stress in rostral ventrolateral medulla of spontaneously hypertensive rats. **Hypertens Res**, v. 31, n. 11, p. 2075-83, Nov 2008. ISSN 0916-9636 (Print) 0916-9636 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19098380> >.

KONDO, N. et al. Osmoregulation of vasopressin release and gene transcription under acute and chronic hypovolemia in rats. **Am J Physiol Endocrinol Metab**, v. 286, n. 3, p. E337-46, Mar 2004. ISSN 0193-1849 (Print) 0193-1849 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14613925> >.

KRUKOFF, T. L.; HARRIS, K. H.; JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Brain Res Bull**, v. 30, n. 1-2, p. 163-72, 1993 1993. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7678381> >.

LAKENS, D. Calculating and reporting effect sizes to facilitate cumulative science: a practical primer for t-tests and ANOVAs. **Front Psychol**, v. 4, p. 863, Nov 26 2013. ISSN 1664-1078 (Print)

1664-1078 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24324449> >.

LANCA, A. J.; VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 1117-26, Apr 1985. ISSN 0306-4522 (Print) 0306-4522 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2987755>
< http://ac.els-cdn.com/0306452285902817/1-s2.0-0306452285902817-main.pdf?_tid=7da2a8a4-1f98-11e3-89fe-00000aab0f6c&acdnat=1379422735_3a7d5323c2ba26dd0ed8fefef760c5e2 >.

LETERME, A. et al. Autonomic nervous system responses to sweet taste: evidence for habituation rather than pleasure. **Physiol Behav**, v. 93, n. 4-5, p. 994-9, Mar 18 2008. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18262575> >.

LI, J. et al. Lesions of the central nucleus of the amygdala decrease taste threshold for sodium chloride in rats. **Brain Res Bull**, v. 89, n. 1-2, p. 8-15, Oct 1 2012. ISSN 1873-2747 (Electronic) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22796484> >.

MANGIAPANE, M. L. et al. Lesion of the area postrema region attenuates hypertension in spontaneously hypertensive rats. **Circ Res**, v. 64, n. 1, p. 129-35, Jan 1989. ISSN 0009-7330 (Print) 0009-7330 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2909296> >.

MAY, C. N.; PARSONS, B. J. Salt and water intake and sodium and potassium excretion in spontaneously hypertensive rats. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 10, n. 1, p. 63-70, Jan-Feb 1983. ISSN 0305-1870 (Print) 0305-1870 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6839550> >.

MCKINLEY, M. J.; JOHNSON, A. K. The physiological regulation of thirst and fluid intake. **News Physiol Sci**, v. 19, p. 1-6, 2004 2004.

MCKINLEY, M. J. et al. The sensory circumventricular organs of the mammalian brain. Subfornical organ, OVLT and area postrema. **Adv Anat Embryol Cell Biol**, v. 172, p. 1-127, 2003 2003.

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

MENANI, J. V. et al. Central moxonidine on water and NaCl intake. **Brain Res Bull**, v. 49, n. 4, p. 273-9, Jul 1 1999. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10424847>
< http://ac.els-cdn.com/S0361923099000593/1-s2.0-S0361923099000593-main.pdf?_tid=8a24e448-1f98-11e3-ac08-00000aacb361&acdnat=1379422756_6fb2426d85df5d6d0529a572b9b5ba68 >.

MENTE, A. et al. Association of urinary sodium and potassium excretion with blood pressure. **N Engl J Med**, v. 371, n. 7, p. 601-11, Aug 14 2014. ISSN 1533-4406 (Electronic) 0028-4793 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25119606> >.

MESTIVIER, D.; DABIRE, H.; CHAU, N. P. Effects of autonomic blockers on linear and nonlinear indexes of blood pressure and heart rate in SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 281, n. 3, p. H1113-21, Sep 2001. ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11514277> >.

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

MISELIS, R. R. The efferent projections of the subfornical organ of the rat: a circumventricular organ within a neural network subserving water balance. **Brain Res**, v. 230, n. 1-2, p. 1-23, Dec 28 1981. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7317773> >.

MOAYED, M. S. et al. Depression, Anxiety, and Stress Among Patients with COVID-19: A Cross-Sectional Study. **Adv Exp Med Biol**, v. 1321, p. 229-236, 2021. ISSN 0065-2598 (Print)

0065-2598 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33656727> >.

MOREIRA, T. S. et al. Antihypertensive effects of central ablations in spontaneously hypertensive rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 296, n. 6, p. R1797-806, Jun 2009. ISSN 0363-6119 (Print)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19339677> >.

MORI, K. Participation of the sympathetic nervous system in spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 37, n. 6, p. 609-18, Jun 1973. ISSN 0047-1828 (Print)

0047-1828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4800400> >.

NAKAGAWA, P. et al. The Renin-Angiotensin System in the Central Nervous System and Its Role in Blood Pressure Regulation. **Curr Hypertens Rep**, v. 22, n. 1, p. 7, Jan 10 2020. ISSN 1534-3111 (Electronic)

1522-6417 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31925571> >.

NAM, H. et al. Learned helplessness and social avoidance in the Wistar-Kyoto rat. **Front Behav Neurosci**, v. 8, p. 109, 2014. ISSN 1662-5153 (Print)

1662-5153 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24744709> >.

NIH. **National Institutes of Health - Any Anxiety Disorder**. <https://www.nimh.nih.gov/health/statistics/any-anxiety-disorder.shtml>. Accessed: June, 12 2020 2020.

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

OHTA, Y. et al. Awareness of salt restriction and actual salt intake in hypertensive patients at a hypertension clinic and general clinic. **Clin Exp Hypertens**, v. 37, n. 2, p. 172-5, 2015. ISSN 1525-6006 (Electronic)

1064-1963 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25496285> >.

OKAMOTO, K.; AOKI, K. Development of a strain of spontaneously hypertensive rats. **Jpn Circ J**, v. 27, p. 282-93, Mar 1963. ISSN 0047-1828 (Print)

0047-1828 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13939773> >.

PALKOVITS, M. Interconnections between the neuroendocrine hypothalamus and the central autonomic system. Geoffrey Harris Memorial Lecture, Kitakyushu, Japan, October 1998. **Front Neuroendocrinol**, v. 20, n. 4, p. 270-95, Oct 1999. ISSN 0091-3022 (Print)

0091-3022 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10569279> >.

PAPA, M. et al. A rostro-caudal dissociation in the dorsal and ventral striatum of the juvenile SHR suggests an anterior hypo- and a posterior hyperfunctioning mesocorticolimbic system. **Behav Brain Res**, v. 130, n. 1-2, p. 171-9, Mar 10 2002. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11864732> >.

PAVEL, J. et al. Peripherally administered angiotensin II AT1 receptor antagonists are anti-stress compounds in vivo. **Ann N Y Acad Sci**, v. 1148, p. 360-6, Dec 2008. ISSN 1749-6632 (Electronic)

0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19120129> >.

PEREIRA-DERDERIAN, D. T. et al. Water deprivation-partial rehydration induces sensitization of sodium appetite and alteration of hypothalamic transcripts. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 310, n. 1, p. R15-23, Jan 1 2016. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26538239> >.

PEREIRA-DERDERIAN, D. T. et al. Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 298, n. 5, p. R1298-309, May 2010. ISSN 1522-1490 (Electronic)

0363-6119 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20200133> >.

PEREIRA, E. D., JR. et al. Estradiol modulates the palatability of 0.3M NaCl in female rats during sodium appetite. **Appetite**, v. 133, p. 252-261, Feb 1 2019. ISSN 1095-8304 (Electronic)

0195-6663 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30458200> >.

PEREIRA, E. D., JR. et al. Sodium palatability in male spontaneously hypertensive rats. **Horm Behav**, p. 104952, Feb 26 2021. ISSN 1095-6867 (Electronic)

0018-506X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33647281> >.

PEREIRA JR., E. D. et al. Central angiotensinergic mechanisms in female spontaneously hypertensive rats treated with estradiol. **Appetite**, v. 106012, 2022. ISSN 0195-6663. Disponível em: <

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195666322001039> >.

PETEET, J. R. COVID-19 Anxiety. **J Relig Health**, v. 59, n. 5, p. 2203-2204, Oct 2020. ISSN 1573-6571 (Electronic)

0022-4197 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32415426> >.

PINHEIRO, S. H. et al. Elevated mazes as animal models of anxiety: effects of serotonergic agents. **An Acad Bras Cienc**, v. 79, n. 1, p. 71-85, Mar 2007. ISSN 0001-3765 (Print)

0001-3765 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17401477> >.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **Eur J Pharmacol**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, Feb 28 2003. ISSN 0014-2999 (Print)

0014-2999 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600700> >.

QIU, J. et al. Transcriptomic analysis of the osmotic and reproductive remodeling of the female rat supraoptic nucleus. **Endocrinology**, v. 152, n. 9, p. 3483-91, Sep 2011. ISSN 1945-7170 (Electronic)

0013-7227 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21791562> >.

QIU, J. et al. Transcription factor expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the dehydrated rat: upregulation of gonadotrophin inducible transcription factor 1 mRNA is mediated by cAMP-dependent protein kinase A. **J Neurosci**, v. 27, n. 9, p. 2196-203, Feb 28 2007. ISSN 1529-2401 (Electronic)

0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17329416> >.

RAMOS, A. et al. A multiple-test study of anxiety-related behaviours in six inbred rat strains. **Behav Brain Res**, v. 85, n. 1, p. 57-69, Apr 1997. ISSN 0166-4328 (Print)

0166-4328 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9095342> >.

REBOLLEDO-SOLLEIRO, D. et al. Role of thirst and visual barriers in the differential behavior displayed by streptozotocin-treated rats in the elevated plus-maze and the open field test. **Physiol Behav**, v. 120, p. 130-5, Aug 15 2013. ISSN 1873-507X (Electronic)

0031-9384 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23948672> >.

REPOVA, K. et al. Lisinopril reverses behavioural alterations in spontaneously hypertensive rats. **Gen Physiol Biophys**, v. 38, n. 3, p. 265-270, May 2019. ISSN 0231-5882 (Print)

0231-5882 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31184313> >.

RHEE, S. G.; CHOI, K. D. Regulation of inositol phospholipid-specific phospholipase C isozymes. **J Biol Chem**, v. 267, n. 18, p. 12393-6, Jun 25 1992. ISSN 0021-9258 (Print)

0021-9258 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1319994> >.

RICHTER, C. P.; ECKERT, J. F. Mineral metabolism of adrenalectomized rats studied by the appetite method. **Endocrinology**, v. 22, n. 2, p. 214-224, 1938. ISSN 0013-7227. Disponível em: < <https://doi.org/10.1210/endo-22-2-214> >. Acesso em: 4/5/2022.

RONCARI, C. F. et al. The lateral parabrachial nucleus and central angiotensinergic mechanisms in the control of sodium intake induced by different stimuli. **Behav Brain Res**, v. 333, p. 17-26, Aug 30 2017. ISSN 1872-7549 (Electronic) 0166-4328 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28625546> >.

ROWLAND, N. E. et al. Fos induced in brain of spontaneously hypertensive rats by angiotensin II and co-localization with AT-1 receptors. **Brain Res**, v. 675, n. 1-2, p. 127-34, Mar 27 1995. ISSN 0006-8993 (Print) 0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7796121> >.

SAKAKI, M.; TSUCHIHASHI, T.; ARAKAWA, K. Characteristics of the hypertensive patients with good and poor compliance to long-term salt restriction. **Clin Exp Hypertens**, v. 36, n. 2, p. 92-6, 2014. ISSN 1525-6006 (Electronic) 1064-1963 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24625335> >.

SANTOLLO, J.; TORREGROSSA, A. M.; DANIELS, D. Sex differences in the drinking response to angiotensin II (AngII): Effect of body weight. **Horm Behav**, v. 93, p. 128-136, Jul 2017. ISSN 1095-6867 (Electronic) 0018-506X (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28571936> >.

SANTOS, R. A. et al. Angiotensin-converting enzyme 2, angiotensin-(1-7) and Mas: new players of the renin-angiotensin system. **J Endocrinol**, v. 216, n. 2, p. R1-R17, Feb 2013. ISSN 1479-6805 (Electronic) 0022-0795 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23092879> >.

SARNO, F. et al. [Estimated sodium intake for the Brazilian population, 2008-2009]. **Rev Saude Publica**, v. 47, n. 3, p. 571-8, Jun 2013. ISSN 1518-8787 (Electronic) 0034-8910 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24346570> >.

SATO, M. A.; COLOMBARI, E.; MORRISON, S. F. Inhibition of neurons in commissural nucleus of solitary tract reduces sympathetic nerve activity in SHR. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 282, n. 5, p. H1679-84, May 2002. ISSN 0363-6135 (Print) 0363-6135 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11959631> >.

SATO, M. A. et al. Recovery of high blood pressure after chronic lesions of the commissural NTS in SHR. **Hypertension**, v. 42, n. 4, p. 713-8, Oct 2003. ISSN 1524-4563 (Electronic) 0194-911X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12900428> >.

SATO, M. A.; YADA, M. M.; DE LUCA, L. A., JR. Antagonism of the renin-angiotensin system and water deprivation-induced NaCl intake in rats. **Physiol Behav**, v. 60, n. 4, p. 1099-104, Oct 1996. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8884939> >.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Strain differences in open-field and elevated plus-maze behavior of rats without and with pretest handling. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 59, n. 4, p. 807-11, Apr 1998. ISSN 0091-3057 (Print) 0091-3057 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9586835> >.

SCHULKIN, J. The allure of salt. **Psychobiology**, v. 19, n. 2, p. 116-121, June 01 1991. ISSN 0889-6313. Disponível em: < <https://doi.org/10.3758/BF03327180> >.

SHIGEMURA, N. et al. Angiotensin II modulates salty and sweet taste sensitivities. **J Neurosci**, v. 33, n. 15, p. 6267-77, Apr 10 2013. ISSN 1529-2401 (Electronic) 0270-6474 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23575826> >.

SHIOZAWA, P.; UCHIDA, R. R. An updated systematic review on the coronavirus pandemic: lessons for psychiatry. **Braz J Psychiatry**, v. 42, n. 3, p. 330-331, 2020. ISSN 1809-452X (Electronic) 1516-4446 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32374797> >.

SÖDERPALM, A. H. V.; BERRIDGE, K. C. The hedonic impact and intake of food are increased by imidazolam microinjection in the parabrachial nucleus. **Brain Res.**, v. 877, p. 288-297, 2000 2000.

STEINER, J. E. The gustofacial response: observation on normal and anencephalic newborn infants. **Symp Oral Sens Percept**, n. 4, p. 254-78, 1973. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4612820> >.

_____. Discussion paper: innate, discriminative human facial expressions to taste and smell stimulation. **Ann N Y Acad Sci**, v. 237, n. 0, p. 229-33, Sep 27 1974. ISSN 0077-8923 (Print) 0077-8923 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4529591> >.

_____. Human facial expressions in response to taste and smell stimulation. **Adv Child Dev Behav**, v. 13, p. 257-95, 1979. ISSN 0065-2407 (Print) 0065-2407 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/484324> >.

STERLEY, T. L.; HOWELLS, F. M.; RUSSELL, V. A. Effects of early life trauma are dependent on genetic predisposition: a rat study. **Behav Brain Funct**, v. 7, p. 11, May 6 2011. ISSN 1744-9081 (Electronic) 1744-9081 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21548935> >.

TANAKA, J. et al. Differences in electrophysiological properties of angiotensinergic pathways from the subfornical organ to the median preoptic nucleus between normotensive Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. **Exp Neurol**, v. 134, n. 2, p. 192-8, Aug 1995. ISSN 0014-4886 (Print) 0014-4886 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7556538> >.

TERRA DOS SANTOS, A. L. R. et al. Effects of gonadotropin inducible ovarian transcription factor 1 in the paraventricular nucleus on fluid intake after dehydration of ovariectomized female rats. **Exp Physiol**, v. 106, n. 12, p. 2391-2399, Dec 2021. ISSN 1469-445X (Electronic) 0958-0670 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/34713942> >.

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. R458-65, Feb 1994. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8141403> >.

THUNHORST, R. L. et al. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **Am J Physiol**, v. 274, n. 6 Pt 2, p. R1807-14, Jun 1998. ISSN 0002-9513 (Print) 0002-9513 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9841553> >.

TORDOFF, M. G.; ALARCON, L. K.; LAWLER, M. P. Preferences of 14 rat strains for 17 taste compounds. **Physiol Behav**, v. 95, n. 3, p. 308-32, Oct 20 2008. ISSN 0031-9384 (Print) 0031-9384 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639567> >.

TSAI, M. L. et al. Social factors affect motor and anxiety behaviors in the animal model of attention-deficit hyperactivity disorders: A housing-style factor. **Psychiatry Res**, v. 254, p. 290-300, Aug 2017. ISSN 1872-7123 (Electronic) 0165-1781 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28501734> >.

VEERASINGHAM, S. J.; RAIZADA, M. K. Brain renin-angiotensin system dysfunction in hypertension: recent advances and perspectives. **Br J Pharmacol**, v. 139, n. 2, p. 191-202, May 2003. ISSN 0007-1188 (Print) 0007-1188 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12770924> >.

VENDRAMINI, R. C. et al. Damage to the central amygdala produces differential encephalic c-fos expression in the water deprivation-partial rehydration protocol. **Brain Res**, v. 1304, p. 80-9, Dec 22 2009. ISSN 1872-6240 (Electronic)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19782659> >.

VERBALIS, J. G. Disorders of body water homeostasis. **Best Pract Res Clin Endocrinol Metab**, v. 17, n. 4, p. 471-503, Dec 2003. ISSN 1521-690X (Print)

1521-690X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14687585> >.

VIGITEL. **VIGITEL BRASIL 2018**. <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/julho/25/vigitel-brasil-2018.pdf>

Ministério da Saúde 2019.

VIVAS, L. et al. Neurochemical Circuits Subserving Fluid Balance and Baroreflex: A Role for Serotonin, Oxytocin, and Gonadal Steroids. In: DE LUCA, L. A., JR.; MENANI, J. V., *et al* (Ed.). **Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration**. Boca Raton (FL), 2014. (Frontiers in Neuroscience). ISBN 9781466506930.

WANG, L. et al. Angiotensin type 1a receptors in the paraventricular nucleus of the hypothalamus control cardiovascular reactivity and anxiety-like behavior in male mice. **Physiol Genomics**, v. 48, n. 9, p. 667-76, Sep 1 2016. ISSN 1531-2267 (Electronic)

1094-8341 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27468749> >.

WHO. In: (Ed.). **Guideline: Sodium Intake for Adults and Children**. Geneva, 2012. (WHO Guidelines Approved by the Guidelines Review Committee). ISBN 9789241504836.

_____. World Health Organization. (2016) . Global NCD target: reduce high blood pressure., <https://apps.who.int/iris/handle/10665/312279>, 2016.

_____. **World Health Organization - Depression and Other Common Mental Disorders: Global Health Estimates**. Geneva:

https://www.who.int/mental_health/management/depression/prevalence_global_health_estimates/en/

2017a.

_____. World Health Organization. Top 10 causes of death. Global Health Observatory (GHO) data., 2017b. Disponível em: < http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/ >.

WILCZYNSKI, E. A.; LEENEN, F. H. Dietary sodium intake and age in spontaneously hypertensive rats: effects on blood pressure and sympathetic activity. **Life Sci**, v. 41, n. 6, p. 707-15, Aug 10 1987. ISSN 0024-3205 (Print)

0024-3205 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2886872> >.

YONEMURA, K. et al. The ability of gustatory stimuli to modify the cardiac sympathetic and vagus nerve activities. **Neurosci Lett**, v. 97, n. 1-2, p. 85-90, Feb 13 1989. ISSN 0304-3940 (Print)

0304-3940 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2919014> >.

YUE, C. et al. Differential kinetics of oxytocin and vasopressin heteronuclear RNA expression in the rat supraoptic nucleus in response to chronic salt loading in vivo. **J Neuroendocrinol**, v. 20, n. 2, p. 227-32, Feb 2008. ISSN 1365-2826 (Electronic)

0953-8194 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18088359> >.

ZARDETTO-SMITH, A. M.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Role of the central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. **Brain Res**, v. 645, n. 1-2, p. 123-34, May 9 1994. ISSN 0006-8993 (Print)

0006-8993 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8062074> >.

ZENATTI, A. A. et al. Interference with the renin-angiotensin system reduces the palatability of 0.3 M NaCl in sodium-deplete rats. **Appetite**, v. 158, p. 105037, Nov 10 2020. ISSN 1095-8304 (Electronic)

0195-6663 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33186624> >.

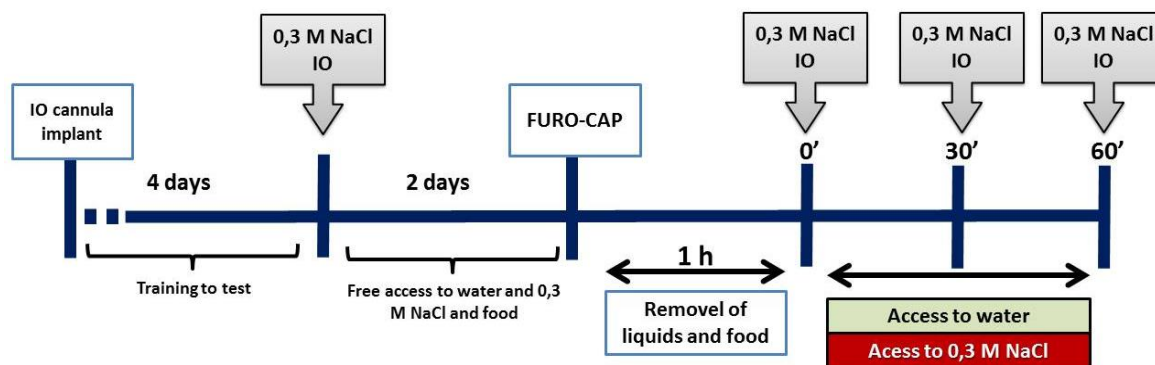
_____. Interference with the renin-angiotensin system reduces the palatability of 0.3 M NaCl in sodium-deplete rats. **Appetite**, v. 158, p. 105037, Mar 1 2021. ISSN 1095-8304 (Electronic) 0195-6663 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33186624> >.

ZHANG, T.; ROCKHOLD, R. W. Sucrose drinking reduces dorsal hypothalamic beta-endorphin levels in spontaneously hypertensive rats but not in Wistar-Kyoto rats. **Brain Res Bull**, v. 32, n. 3, p. 261-5, 1993. ISSN 0361-9230 (Print) 0361-9230 (Linking). Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8374805> >.

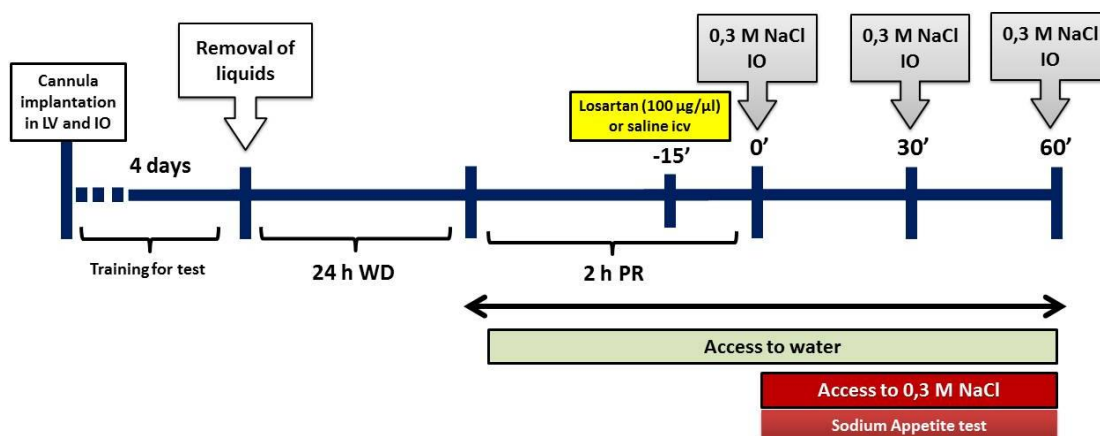
ZUBCEVIC, J. et al. MEMRI reveals altered activity in brain regions associated with anxiety, locomotion, and cardiovascular reactivity on the elevated plus maze in the WKY vs SHR rats. **Brain Imaging Behav**, v. 12, n. 5, p. 1318-1331, Oct 2018. ISSN 1931-7565 (Electronic) 1931-7557 (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29181695> >.

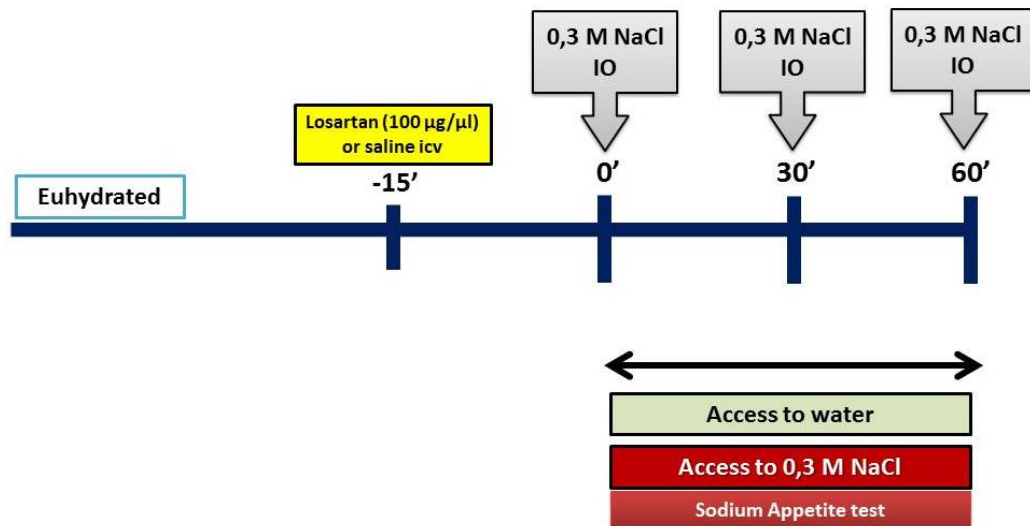
APÊNDICE

Item 1.1: Esquema do protocolo experimental 3.1 (Capítulo 1).

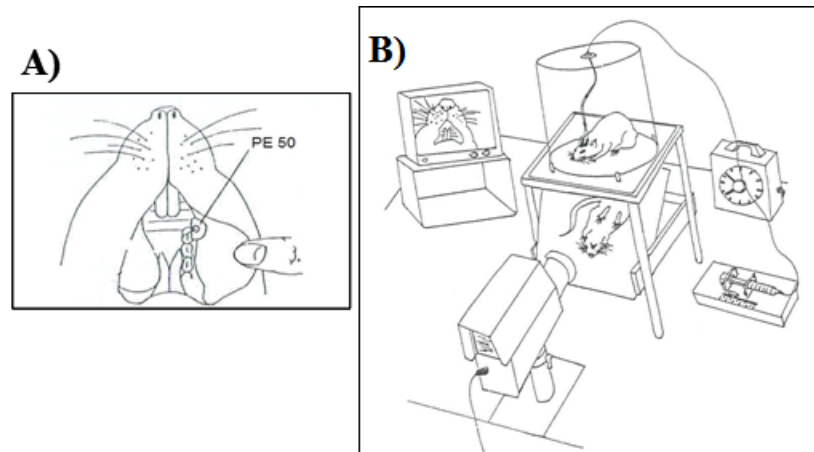


Item 1.2: Esquema do protocolo experimental 3.3 (Capítulo 1).

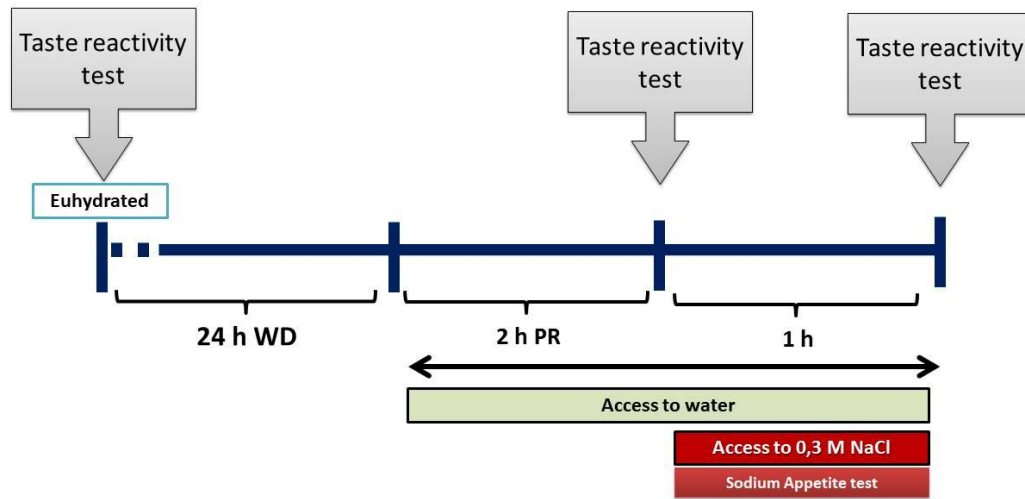


Item 1.3: Esquema do protocolo experimental 3.4 (Capítulo 1).

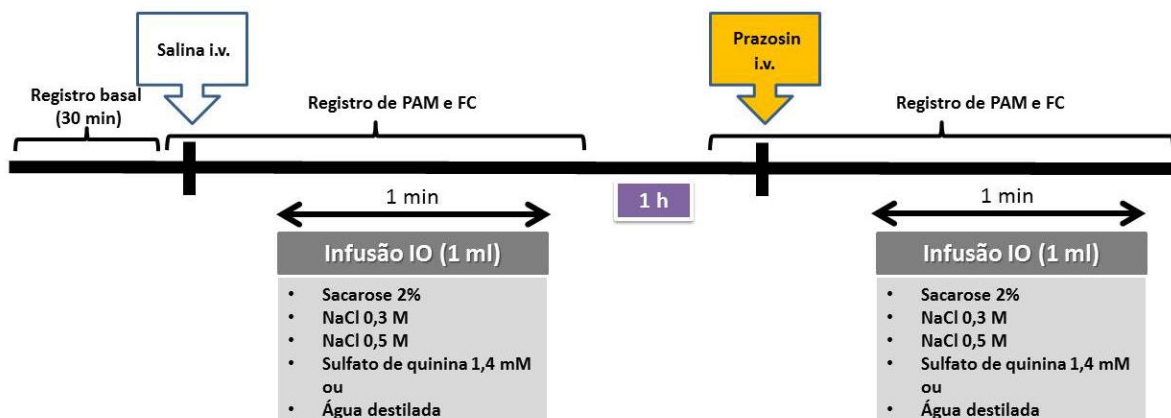
Item 2.1. A) Esquema da localização do local de implante da cânula intraoral e b) esquema do aparato experimental para o estudo da palatabilidade (teste de reatividade gustatória) a soluções infundidas diretamente na cavidade oral (Grill e Berridge, 1985).



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

Item 2.2: Esquema do protocolo experimental 3.1 (Capítulo 2).

Item 3.1: Esquema do protocolo experimental 3.1 (Capítulo 3).



Item 3.2: Esquema do protocolo experimental 3.2 (Capítulo 3).

