

Universidade Federal de Ouro Preto

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Dissertação

**Avaliação do Apetite ao Sódio
e da Sede Induzida por
Privação Hídrica em Ratos
sob Dieta com Sobrecarga de
Sódio a Partir do Desmame**

Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas

Ouro Preto

2022



Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas

**Avaliação do Apetite ao Sódio e da Sede Induzida
por Privação Hídrica em Ratos sob Dieta com
Sobrecarga de Sódio a Partir do Desmame**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso

SISBIN - SISTEMA DE BIBLIOTECAS E INFORMAÇÃO

F866a Freitas, Flavio Eduardo Dias Araújo.

Avaliação do Apetite ao Sódio e da Sede Induzida por Privação Hídrica em Ratos sob Dieta com Sobrecarga de Sódio a Partir do Desmame.

[manuscrito] / Flavio Eduardo Dias Araújo Freitas. et al. - 2021.

77 f.: il.: color., gráf..

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso.

Coorientadora: Profa. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade Federal de Ouro Preto. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de Concentração: Bioquímica Metabólica e Fisiológica.

1. Apetite ao sódio. 2. Ingestão. 3. c-Fos. 4. Privação hídrica. I. Batista, Marcos Adriano Carlos. II. Antunes, Vagner Roberto. III. Braga, Daiane Cristina de Assis. IV. Cardoso, Leonardo Máximo. V. de Oliveira, Lisandra Brandino. VI. Universidade Federal de Ouro Preto. VII. Título.

CDU 577.12

Bibliotecário(a) Responsável: Luciana De Oliveira - SIAPE: 1.937.800



FOLHA DE APROVAÇÃO

Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas

Avaliação do Apetite ao Sódio e da Sede Induzida por Privação Hídrica em Ratos sob Dieta com Sobrecarga de Sódio a Partir do Desmame

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (PPG-CBiol) da Universidade Federal de Ouro Preto como requisito parcial para obtenção do título de mestre.

Aprovada em 17 de setembro de 2021

Membros da banca

Dr. Leonardo Máximo Cardoso - Orientador(a) - Universidade Federal de Ouro Preto
Dr. José Vanderlei Manani - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho"
Dr. Mauro César Isoldi - Universidade Federal de Ouro Preto

Leonardo Máximo Cardoso, orientador do trabalho, aprovou a versão final e autorizou seu depósito no Repositório Institucional da UFOP em 11/03/2022.



Documento assinado eletronicamente por **Leonardo Máximo Cardoso, PROFESSOR DE MAGISTERIO SUPERIOR**, em 11/03/2022, às 13:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site http://sei.ufop.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0291729** e o código CRC **6DF48636**.

Dedico esse trabalho aos meus pais, Antônio Flávio e Maria José, por todo o tempo estarem sempre ao meu lado. À minha esposa Bárbara Brasil, pelo apoio incondicional.

Agradecimentos

A Deus por, mais uma vez, me fortalecer para chegar ao fim desse desafio.

A minha família, em especial a minha tia Ana, pelo incentivo ao longo desse período.

Aos meus sogros Wertson e Katia Brasil e minha cunhada Raissa Brasil, por estarem sempre ao meu lado.

Aos meus amigos presentes, com os quais pude compartilhar momentos felizes e tristes no decorrer dessa caminhada.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso, meus mais sinceros agradecimentos. Pela oportunidade e por confiar em meu trabalho. Por ter acrescentado muito em minha trajetória seja pelo ensinamento, seja por me orientar a manter o foco nos meus objetivos.

Ao Prof. Dr. Vagner Roberto Antunes, pela generosidade, colaboração e constante disponibilidade. Gratidão por todos os momentos.

À Prof. Dra. Lisandra Brandino de Oliveira por toda ajuda e apoio ao longo desse trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular, pela agradável convivência e por tornar os dias mais tranquilos, em especial Daiane Braga e meu padrinho de casamento Marcos Batista.

Aos colegas do NUPEB.

Ao Centro de Ciências Animal CCA/UFOP pelo fornecimento dos animais.

À Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e toda sua direção

Esse trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular (LFEC) do Departamento de Ciências Biológicas, vinculado ao Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas (CBIOL/NUPEB) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

“Eu tentei 99 vezes e falhei, mas na centésima tentativa eu consegui, nunca desista de seus objetivos mesmo que esses pareçam impossíveis, a próxima tentativa pode ser a vitoriosa.”

Albert Einstein

Colaboradores

Dr. Vagner Roberto Antunes¹;

Dra. Lisandra Brandino de Oliveira²;

Bel. Marcos Adriano Carlos Batista³;

Msc. Daiane Cristina de Assis Braga³.

1-Departamento de Fisiologia e Biofísica, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.

2-Departamento de Alimentos e Medicina, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, Minas Gerais, Brasil.

3– Departamento de Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas e NUPEB, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Minas Gerais, Brasil.

Apoio

Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP

Universidade de São Paulo - USP

Apoio Financeiro

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES);

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG);

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq);

Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Recursos próprios dos pesquisadores envolvidos com o desenvolvimento do projeto.

Resumo

O apetite ao sódio que se caracteriza como um estado comportamental de busca específica para a ingestão de sódio. Os estímulos que podem levar ao apetite ao sódio ativam mecanismos tanto centrais quanto periféricos que atuam, simultaneamente, no controle da ingestão e excreção de sódio. Dentre os mecanismos centrais, vários estudos demonstram que os órgãos circunventriculares (OCVs) são de grande importância para o controle do apetite ao sódio. Além do controle do apetite ao sódio, os OCVs possuem alta influência no controle da pressão arterial, isso devido a suas projeções para áreas de controle do tônus simpático central, como o núcleo paraventricular hipotalâmico.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi investigar o apetite ao sódio induzido pela dieta com sobrecarga de sódio durante doze semanas a partir do desmame em ratos Wistar adultos. Para tanto, ratos Wistar foram divididos em dois grupos HS e SD. Os ratos *high-sodium* (HS) receberam uma dieta contendo 0,9% de Na⁺ durante 12 semanas, porém os ratos controles (SD) receberam uma dieta contendo 0,27% de Na⁺ durante o período de 12 semanas. Findo o período de 12 semanas, os animais HS foram divididos em dois grupos, sendo o HS-HS, ou seja, que mantiveram a ração com 0,9% de Na⁺ e os ratos HS-SD que a partir da 13^a semana receberam dieta contendo 0,27% de sódio. A partir da 13^a, semana ambos os grupos (SD; HS-HS; HS-SD) foram submetidos a um protocolo de avaliação de ingestão hidro salina, com a oferta de duas buretas, uma com água e outra com salina 1,8% de Na⁺. Os ratos Wistar HS-SD que tiveram sua dieta substituída, reduziram o consumo de água (10,73 mL/100g p.c) em relação aos ratos HS-HS (18,95 mL/100g p.c). Após a análise comportamental, os animais foram classificados de acordo com a sua busca por sódio, como bebedores ou não bebedores de salina 1,8%. No grupo controle, 43,75% dos animais assumiram comportamento de bebedores de salina 1,8%; no entanto, entre os ratos HS-SD, apenas 15,38% foram classificados como bebedores de salina 1,8%. Além disso, os resultados demonstram uma correlação positiva entre pressão arterial e volume de ingestão de salina nos animais SD. Os resultados sugerem que a substituição da dieta HS pela ração SD não eleva o apetite ao sódio e que o maior consumo espontâneo de salina está relacionado com a baixa pressão arterial dos animais SD.

Abstract

The state of appetite for specific consumption that is characterized as drug ingestion in medicine. Stimuli that stimulate the ingestion and excretion of substances can also stimulate live appetite, both active and concentrated, simultaneously, do not control the ingestion and excretion of kidneys. Among the central organs, several studies that the circumventricular organs are of importance for the control of the appetite to the large volume. In addition to appetite control to uncontrolled control, OCVs have blood pressure influence, due to their weightings for areas of central sympathetic tone control, such as the hypothalamic paraventricular nucleus.

In this way, this work investigated the objective of the objective induced by the diet with overload for twelve weeks the appetite from weaning in adult Wistar rats. Therefore, Wistar rats were divided into two groups, HS and SD. Rats during the high-sodium period (HS) received a diet containing 0.9% Na⁺ for 12 weeks, however control rats (SD) received a diet containing 0.27% Na⁺ for the 12-week period. After 12 weeks, the HS animals were divided into two groups, the HS-HS, that is, which maintained the duration of feeding with 0.9% Na⁺ and the HS-SD rats, which from the 13th week onwards received a diet containing 0.27% of. From the 13th week onwards, both groups (SD; HS-HS; HS-SD) were selected for an assessment protocol for hydro-saline intake, with the provision of two burettes, one with water and the other with saline 1.8% Na⁺. Wistar rats had their diet changed, reduced water consumption (10.73 mL/100g mL/100g b.w.) in HS-HS rats (18.95/100g). After a behavioral analysis, the animals were classified according to their drug search as drinkers or non-drinkers of 1.8% saline. In the control group, 43.75% of the animals showed saline drinking behavior 1.8%; however, among HS-SD rats, only 15.38% were classified as 1.8% saline drinkers. Furthermore, the results may cause a positive intake between blood pressure and saline in SD animals. The results of replacing the HS diet with the SD diet did not increase the appetite of the SD animals.

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos:

Aldo: Aldosterona

AngII: Angiotensina II

AT1R: Receptor angiotensina tipo 1

SNC: Sistema nervoso central

ECA: Enzima conversora de angiotensina

HSD2: 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo dois

I.V: intravenosa

LEC: Liquido extra celular

LIC: Liquido intracelular celular

LT: Lâmina terminal

MnPO: Núcleo pré-óptico mediano

MR: Receptores de mineralocorticoides

NPBL: Núcleo parabraquial lateral

NTS: Núcleo do trato solitário

OCVs: Órgãos circumventriculares

OT: Oxitocina

OVLT: Órgão vascular da lâmina terminal

PAS: Pressão arterial sistêmica

PVN: Núcleo paraventricular do hipotálamo

RAAS: Sistema renina angiotensina aldosterona

SON: Núcleo hipotalâmico supra-óptico

VL: Ventrículo lateral

VP: Vasopressina

Lista de Figuras

Figura 1: Vias responsáveis pela detecção de sódio no SNC e aumento da pressão arterial.	7
Figura 2 Esquema adaptado da cascata da RAAS	11
Figura 3: Protocolo experimental da Gaiola metabólica	18
Figura 4: Protocolo experimental substituição da ração HS pela ração SD.....	19
Figura 5: Esquema demonstrando o procedimento de aferição da pressão arterial dos animais.....	21
Figura 6: Protocolo de privação hídrica.....	22
Figura 7: Protocolo realizado para a imuno-histoquímica.....	24
Figura 8: Níveis de ingestão de ração, água e volume urinário em ratos HS e SD, realizadas após 12ª semana após o desmame. Círculos (SD) e quadrados (HS) representam valores individuais e as barras a média dos grupos. *Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$	25
Figura 9: Níveis de ingestão de água e salina 1,8% em ratos SD-SD, HS-HS e HS-SD, realizadas no decorrer de 35 dias. Azul (SD-SD), rosa (HS-HS) e vermelho (HS-SD) representam valores da média dos grupos. *Diferente do grupo controle, # HS-HS diferente do controle, @ HS-SD diferente do controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$	26
Figura 10: Frequência de distribuição para classificação de bebedores e não bebedores de salina 1,8% NaCl	27
Figura 11: Percentual do consumo de salina hipertônica em ratos classificados como bebedores e não bebedores de salina	28
Figura 12 Níveis de ingestão de água e salina 1,8% em ratos SD-SD, HS-HS e HS-SD classificados como bebedores, realizadas após 35 dias. Azul (SD-SD), rosa (HS-HS) e vermelho (HS-SD) representam a média dos grupos. * Diferente do grupo controle, # HS-SD diferente do controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$	29
Figura 13: Níveis de ingestão de água e salina 1,8% em ratos SD-SD,HS-HS e HS-SD não bebedores de salina, obtidos no decorrer de 35 dias. Azul (SD), rosa (HS) e vermelho (HS-SD) representam valores da média dos grupos	30
Figura 14: Correlação entre a ingestão de salina 1,8% e os níveis basais de pressão arterial média (PAM) em ratos SD-SD bebedores e HS-HS realizados após o protocolo de análise comportamental. Quadrado vermelho (HS) e quadrado azul (SD) representam valores individuais.	31

Figura 15 Níveis de ingestão de salina 1,8% em ratos HS12W submetidos ao protocolo de privação hídrica. Azul (SD), vermelho (HS), os símbolos representam valores da média dos grupos. 24H, 48H, 72H e 96H correspondem ao período pós privação hídrica *Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$	32
Figura 16: Níveis de ingestão de água em ratos HS12W submetidos ao protocolo de privação hídrica. Azul (SD), vermelho (HS), os símbolos representam a média dos grupos. * Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$	33
Figura 17: Níveis de ingestão de ração em ratos HS12W submetidos ao protocolo de privação hídrica. Azul (SD), vermelho (HS), os símbolos representam a média dos grupos. *Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$	34
Figura 18: Níveis de ingestão de água em ratos HS12W submetidos ao protocolo de reidratação, após o protocolo de privação hídrica. Azul (SD), vermelho (HS), os símbolos representam valores individuais e as barras a média dos grupos. * Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$	35
Figura 19: Imagem da marcação c-Fos em neurônios do PVN (Bregma -1.8).	36

Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
2. REFERENCIAL TEÓRICO	3
2.1 História do Consumo do Sódio	3
2.2 Importância do Sódio na Homeostase.....	3
2.3 Consumo de Sódio e Hipertensão	4
2.4 Apetite ao Sódio e Modelos Experimentais.....	8
2.5 Sistema Periférico no Controle do Apetite ao Sódio	10
2.6 Sistema nervoso central e apetite ao sódio	12
3. OBJETIVOS	15
3.1 Objetivo Geral.....	15
3.1 Objetivos Específicos	15
4. METODOLOGIA	16
4.1 Modelo Animal.....	16
4.2 Soluções	16
4.2.1 Salina tamponada com fosfato (PBS).....	16
4.2.2 Anticoagulante para registro de pressão arterial.....	16
4.2.3 Solução TrisPB (TPBS)	17
4.2.4 Solução ImmunoBuffer (IB)	17
4.2.5 Solução Paraformaldeído 4%	17
4.3 Protocolo da Gaiola metabólica	17
4.4 Protocolo de substituição da ração HS pela ração SD	18
4.4.1 Confecção das cânulas artérias	19
4.4.2 Medida direta da pressão arterial	19
4.4.3 Registro da pressão arterial	20
4.5 Protocolo Privação Hídrica.....	21
4.7 Análise Estatística.....	24
5.1 Balanço hidroeletrolítico.....	25
5.2 Avaliação comportamental do consumo de água e salina 1,8%.....	25
5.3 Privação hídrica.....	32
7. CONCLUSÃO	41
ANEXOS	52

1. INTRODUÇÃO

O sódio (Na^+) é um íon de extrema importância para a regulação dos fluidos corporais, sendo ele responsável pelo controle da osmolaridade extracelular, contração muscular, impulsos nervosos entre outros (Seay, Lehrich et al. 2020). Pequena quantidade de ingestão de sódio já foi relatada há milhares de anos (Ha 2014). Com a evolução industrial, houve aumento do consumo de sódio, principalmente em função dos alimentos industrializados (Ha 2014).

A fome por sal é conhecida como apetite ao sódio que é um estado comportamental ocasionado em mamíferos para a busca de substâncias salgadas (Smith and Lawrence 2018). A falta de sódio no organismo pode ser estimulada por diversos fatores externos tais como: depleção de sódio, hemorragia, hipovolemia dentre outras (Jalowiec, Crapanzano et al. 1966, McKinley 2013, Leshem 2020). O apetite ao sódio acarretado pela baixa concentração de sódio ocasionada mediante esses estímulos é conhecido como *need-induced* (Yeomans, Blundell et al. 2004, Geerling and Loewy 2008). Entretanto, o aumento do consumo de sódio, quando não está relacionado com um quadro de perda de sódio no organismo, é caracterizado como *need-free* (Sakai, Frankmann et al. 1989, Yeomans, Blundell et al. 2004, Geerling and Loewy 2008). Neste caso, a ingestão pode ser ocasionada devido a palatabilidade ao íon Na^+ ou pela ação de mineralocorticoides atuando na retenção de sódio como mecanismo de defesa (Thornton, Omouessi et al. 2007).

No sistema nervoso central (SNC) o Na^+ atua inibindo ou exacerbando o apetite ao sódio (Geerling and Loewy 2008, Anesio, Barbosa et al. 2019). Esse controle é devido a alterações na concentração de sódio presente no plasma e no líquido cefalorraquidiano (LCR), no qual são detectados pelos núcleos que compõem os órgãos circunventriculares (OCVs) (Harrington, Salomon et al. 2010, Augustine, Lee et al. 2020). Outro possível mecanismo é a ação por parte da sinalização realizada pelos barorreceptores periféricos projetando nos: núcleo do trato solitário (NTS), órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), órgão subfornicial (SFO), núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN), núcleo pré-óptico mediano (MnPo) e do núcleo supra-óptico (SON) (Bourque, Oliet et al. 1994, Adams, Madden et al. 2007, Bourque 2008). Em conjunto com o SNC, o sistema periférico atua para a regulação da concentração de

sódio. Em caso de deficiência de sódio no organismo, o córtex adrenal produz o hormônio esteroide aldosterona, ocasionando a retenção de sódio(Funder 2017, Leenen, Wang et al. 2020). Em relação ao volume sanguíneo, nos casos de hipovolemia, há a liberação de angiotensina II (ang II), aldosterona e arginina vasopressina (AVP) (Braun and Mahowald 2017). Entretanto, no quadro de hipervolemia temos a ação do peptídeo natriurético atrial (ANP), ocasionando redução na liberação de ang II, aldosterona e AVP (Gasparini, Melo et al. 2019).

Assim exposto, justifica-se a realização deste trabalho para estudar o modelo de apetite ao sódio desencadeado pela ingestão crônica de sódio, equivalentes, ingeridas por seres humanos. Desta forma, no decorrer desta dissertação, foram estudados os efeitos ocasionados pela dieta com sobrecarga de sódio em ratos Wistar (HS12W), sobre os padrões comportamentais, cardiovascular e neurológico.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 História do Consumo do Sódio

Há milhares de anos, deparamo-nos com os primeiros relatos de consumo de Na^+ pela humanidade, que variava de 0,1 a 0,5 grama de sódio por dia, proveniente da carne de caça. Entretanto, com o advento da agricultura, houve redução no consumo de Na^+ , devido a uma redução no consumo de carne no qual o sal era utilizado para conservar os alimentos (Ha 2014). Após esse período, a população da Romênia realizava a extração de sal por meio da fervura da água (Ha, 2014). Há cerca de 5.000 anos, os chineses começaram a utilizar o sal com a finalidade de conservar alimentos (Ha, 2014). Com a descoberta da característica de conservar alimentos por meio do sal, o mesmo se tornou uma mercadoria extremamente preciosa, sendo uma das principais *commodities* no mundo, até mais valiosa que o ouro em diversos países. O sal foi responsável por rotas comerciais e conseqüentemente, no século XIX, houve aumento no consumo de sódio no ocidente, atingindo cerca de 5 g/dia.

Com a evolução industrial, acompanhada pelo aumento do consumo de *fast foods*, a média diária de consumo de sal aumentou significativamente, atingindo cerca de 12 g/dia (He & MacGregor, 2010). Atualmente, o consumo de sódio está entre de 10 e 11 g/dia por pessoa (Rodrigues et al., 2015). A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que a ingestão diária de sal não prejudicial à saúde seja de 5 g/dia, correspondendo a 2 g de sódio por dia (WHO, 2012). Nos dias atuais, o consumo elevado de sódio equivale a aproximadamente 10 vezes mais, se comparado com o consumo de tempos remotos (Geerling and Loewy 2008). O aumento abrupto de sal na alimentação vem sendo associado ao desenvolvimento de distúrbios metabólicos e ao aparecimento de diversas patologias, como a hipertensão (Rodrigues et al., 2015). Dos diversos sais que compõem os fluidos corporais, sódio (Na^+) é o mais consumido, devido a sua grande proporção na alimentação e esse seu consumo tende a afetar a homeostase do fluido corporal (Pollock, Ryan et al. 2014).

2.2 Importância do Sódio na Homeostase

No século passado, Walter Cannon reforçou o conceito da relação do sódio com a homeostase, elucidando a ideia de que o sódio é um eletrólito essencial para a autorregulação dos fluidos celulares (Guillaumin and DiBartola 2017) . Os seres vivos,

principalmente os mamíferos necessitam de diversos mecanismos que trabalham para o controle da homeostase nos fluidos corporais, principalmente nos meios intracelular (LIC) e extracelular (LEC). O LIC e o LEC possuem em sua composição diversos íons, dentre eles destacam-se o Na^+ e o potássio (k^+) que desempenham papéis importantes no controle da homeostase assim como excitabilidade celular (Friedman 1991). A homeostase é tida como uma série de mecanismos de regulação que possui a finalidade de manter o equilíbrio do nosso meio interno, a fim de manter a homeostase celular. Este equilíbrio é derivado de diversos fatores que atuam em conjunto, dentre eles: concentrações iônicas, pH, volume e osmolaridade cujo os valores variam de ~ 290 a 300 mOsm (Toney, Chen, Cato, & Stocker, 2003).

Em síntese, o sódio participa do controle da osmolaridade extracelular, da contração muscular, do transporte transmembrana e dos impulsos nervosos dentre outros estímulos (Haddy 1991, Rapoport 1993, Silveira, Haibara et al. 2005, Freeman, Desmazières et al. 2016)). Pelo fato de o Na^+ ter o papel de controlar tanto o volume quanto a composição/osmolaridade, ele acaba sendo um íon de extrema relevância para o controle do volume circulante e dos mecanismos de osmorregulação, por meio dos quais acaba interferindo de forma direta e indireta na pressão arterial sistêmica (PAS), sendo esse um dos principais fatores que fazem com que o sódio esteja relacionado com casos de hipertensão sódio-dependente (Crowley and Jeffs 2016, Guyenet 2017, Batista, Braga et al. 2020).

2.3 Consumo de Sódio e Hipertensão

O elevado consumo de sódio na alimentação está relacionado com distúrbios fisiopatológicos (Hurley and Johnson 2015). Durante décadas, tem sido discutido o efeito da ingestão elevada de sódio e a gênese de doenças cardiovasculares (Carney 2016). Segundo dados da OMS, cerca de 15,2 milhões de mortes ocorridas em 2016 foram decorrentes da combinação de doença isquêmica do coração e de derrame cerebral, sendo a primeira das dez principais causas de morte nos dias atuais (WHO, 2020). Além do mais, dentre as doenças cardiovasculares mais influenciadas pelo consumo de dieta *high-salt*, pode-se destacar a hipertensão sódio-dependente (Osborn and Provo 1992, Cappuccio 2013).

No sistema nervoso central (SNC), o sódio pode promover a ativação de neurônios simpáticos (Stocker, Osborn, & Carmichael, 2008 Antunes Rodrigues, 1963). Estes achados são evidenciados em estudos com modelos experimentais em que ratos Wistar e Sprague-Dawley demonstraram aumento de PAS, quando submetidos a alta ingestão de Na⁺. Nesses estudos, ocorreu a administração intravenosa de solução salina hipertônica contendo (2,5 a 3 mol/L) que permitiu perceber a elevação da concentração plasmática de sódio que, conseqüentemente, promoveu o aumento da atividade simpática lombar, ocasionando aumento de pressão arterial (PA) (Antunes, Yao et al. 2006, Stocker, Osborn et al. 2008). Além do SNC, o sódio também afeta sistemas periféricos que atuam diretamente no controle da PA. No sistema cardiovascular, notadamente no coração, o excesso de sódio na dieta pode levar à hipertrofia ventricular esquerda (Kupari, Koskinen et al. 1994, Jin, Kuznetsova et al. 2009). No sistema renal, a sobrecarga de sódio pode ocasionar nos túbulos renais e, conseqüentemente, levando ao quadro de hipertensão arterial sistêmica (Hosohata, Yoshioka et al. 2016).

A hipertensão sal-dependente é caracterizada pelo aumento sustentado dos níveis de pressão arterial devido à alta ingestão de sódio, sendo uma das doenças que mais afetam a saúde e a qualidade de vida humana (Giles, Materson et al. 2009). Atualmente, a hipertensão sal-dependente atinge cerca de 1,13 bilhão de pessoas no mundo, sendo umas das principais causas de mortes prematuras (WHO, 2020).

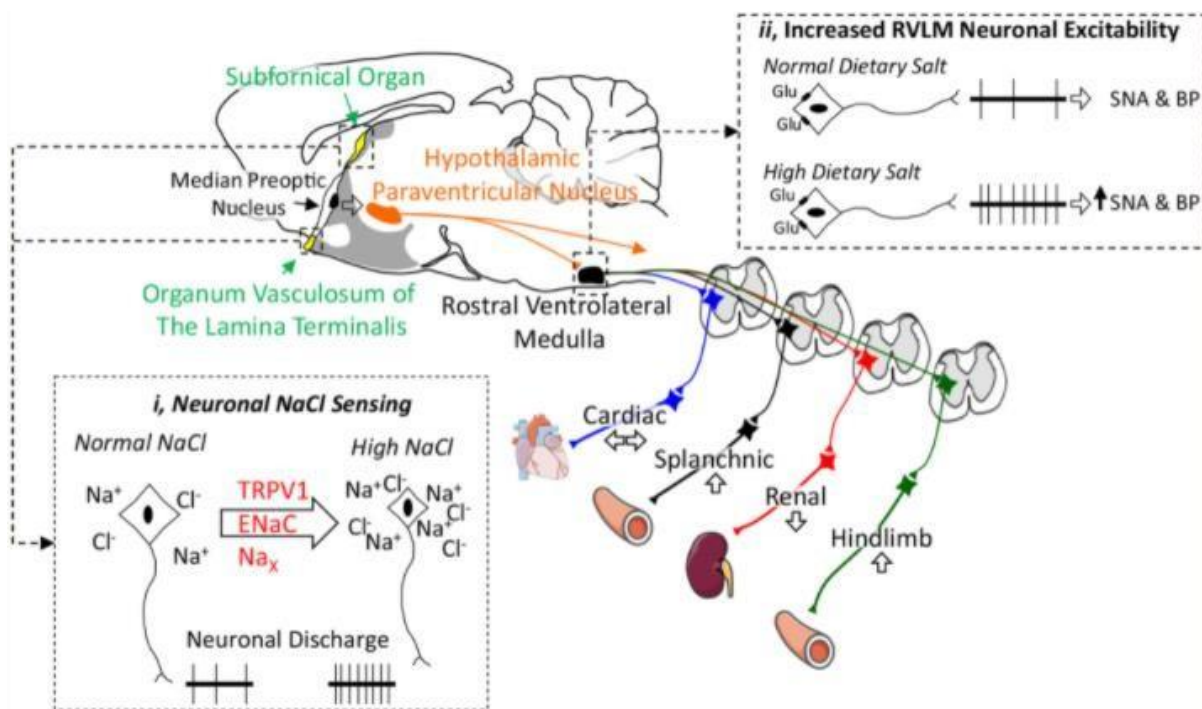
Um estudo experimental mostrou que ratos Dahl-salt, submetidos a dieta contendo 8% de cloreto de sódio, tiveram aumento nos níveis de pressão arterial em relação aos seus controles que receberam dieta regular (Huang, Van Vliet et al. 2004). Em outro estudo produzido por Gomes e colaboradores, ratos Wistar foram submetidos a uma dieta com alto teor de sódio (0.9%) durante 12 semanas pós desmame. Os resultados mostraram o aumento de pressão arterial, quando comparados aos seus respectivos controles que consumiram dieta padrão com 0,27% de sódio (Gomes, Sa, et al., 2017). Em outro protocolo, os animais também foram submetidos a alta ingestão de sódio durante 12 semanas. Entretanto, após 12 semanas, os ratos foram submetidos a dieta com Na⁺ na concentração padrão e depois foi realizada a medida direta de PA. Como resultado, os ratos que passaram pelas três semanas com o sódio na concentração padrão normalizaram a PA (Gomes, Sa, et al., 2017). Esse quadro de hipertensão é conhecido como hipertensão sensível

ao sal que é estabelecida pela correlação do aumento crônico da ingestão de sal e o aumento da pressão arterial.

Ao longo dos anos, evidências surgiram e propõem que o sistema nervoso simpático (SNS) estaria envolvido no desenvolvimento de hipertensão (Grassi, Mark et al. 2015). Relatos na literatura demonstraram que o elevado consumo de sódio estaria ocasionando uma elevação de sódio no plasma e no líquido cefalorraquidiano (LCR) (Stocker, Monahan et al. 2013). Os neurônios localizados nos órgãos circumventriculares (OCVs) detectam alterações no aumento da concentração de sódio (Bourque 2008, Kinsman, Nation et al. 2017).

Os OCVs são estruturas próximas ao terceiro ventrículo e possuem uma barreira hematoencefálica frouxa, permitindo a detecção de alterações nas concentrações de eletrólitos provenientes da circulação e do LCR (Toney and Stocker 2010). As detecções do sódio realizadas nos OCVs ocorrem por meio de neurônios sensíveis a flutuações na concentração de Na^+ (DeLalio, Sved et al. 2020). Essas alterações nas concentrações de eletrólitos desencadeiam a excitabilidade dos neurônios provenientes dos OCVs, sendo eles o órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e o órgão subfornicial (SFO) (McKinley, McAllen et al. 2003). Esses neurônios se projetam para o núcleo pré-óptico mediano (MnPO), núcleo paraventricular hipotalâmico (PVN) ou diretamente para o bulbo rostral ventro lateral (RVLM) responsável pela modulação do débito simpático, que pode levar ao quadro de HA (Adams, McCarthy et al. 2008, DeLalio, Sved et al. 2020) (Figura 1).

Figura 1: Vias responsáveis pela detecção de sódio no SNC e aumento da pressão arterial.



(DeLalio, Sved et al. 2020)

Além de estudos experimentais, ensaios clínicos também demonstraram a relação entre o consumo de Na^+ e HA. Um estudo denominado PREMIER, realizado entre os anos 2000 e 2001, envolvendo uma amostra de 810 indivíduos afro-americanos hipertensos, verificou que mudanças em hábitos de vida como atividade física induziram o aumento no consumo de vegetais e redução da ingestão de sódio e foram eficazes na redução da PA (Appel, Champagne et al. 2003). Outro ensaio clínico também reforçou a ideia de que o aumento de sal na dieta é um fator precursor da hipertensão (Rodrigues, Souza Júnior et al. 2015). O estudo utilizou uma amostra populacional e correlacionou os níveis de ingestão de sódio com elevação dos níveis de PA e volume urinário. Os autores apontam que o aumento do volume urinário é uma resposta de *feedback* positivo, a fim de aumentar a excreção de Na^+ e reduzir o volume plasmático (Rodrigues, Souza Júnior et al. 2015).

Por outro lado, há controvérsias científicas, apontando que a redução do consumo de sódio na dieta é um fator que pode ocasionar um aumento transitório da pressão arterial (Alderman 2000). Alderman, menciona em seu trabalho que a

redução de sódio pode levar a alterações glicêmicas e insulinêmicas, aumento da atividade da renina plasmática e atividade simpática, sendo estes fatores fortemente relacionados a complicações no sistema cardiovascular, podendo conseqüentemente desencadear o aumento da PA (Alderman 2000). Apesar de controversa a relação entre o aumento e a redução no consumo de sal produzindo a HÁ, os estudos descritos acima suportam a hipótese de que o alto consumo de sódio leva a quadros de hipertensão. Entretanto, a redução do consumo de sódio pode ocasionar apenas um aumento transitório da PA, que, de acordo com estudos matemáticos, não podem ser caracterizados e descritos como quadros de hipertensão arterial sistêmica (Averina, Othmer et al. 2012).

2.4 Apetite ao Sódio e Modelos Experimentais

O apetite ao sódio é caracterizado por ser um estado comportamental em mamíferos para a busca de sódio (Geerling and Loewy 2008). A ingestão de sódio nos mamíferos se dá por duas vias comportamentais: a primeira via é desencadeada pelo processo de necessidade do sódio, ocasionada pela falta do sódio no organismo, o qual é conhecido por *need-induced* (Geerling & Loewy, 2008). O *need-induced* é normalmente associado a fatores externos, tais como hemorragia, depleção de sódio, uso de diuréticos, sudorese, hipovolemia entre outros (Wolf and Stricker 1967, De Luca, Sugawara et al. 2000, Geerling and Loewy 2008, Pereira, Menani et al. 2010). A segunda via é conhecida como *need-free*, na qual se tem o aumento da ingestão de sódio, mesmo que o estado fisiológico não esteja com déficit de sódio. Normalmente, o *need-free* está relacionado com a palatabilidade ou com a ação de receptores de mineralocorticoides (MR) que atuam mesmo em condições “basais” na homeostase, com o intuito de reter ou armazenar o Na⁺ como prevenção de um possível déficit (Thornton, Omouessi, & Falconetti, 2007).

Com o objetivo de elucidar o apetite ao sódio, ao longo dos anos foram realizadas várias estratégias afins para estimular esse apetite. Os métodos abordados para avaliar o apetite ao sódio são provenientes da mudança na osmolaridade, na qual pode ser destacada a depleção de sódio por meio de diuréticos combinada com uma dieta com baixo teor de sódio (De Luca, Pereira-Derderian et al. 2010, Pereira, Menani et al. 2010, Leshem 2011). Ademais, estudos também associam a combinação de diuréticos e inibidores da enzima conversora de angiotensina 1 (ECA-

1), ou até mesmo pelo protocolo de privação hídrica (Barney, Threatte et al. 1983, Elfont, Epstein et al. 1984, Fitts and Masson 1989).

Estudos experimentais demonstraram que animais depletados de sódio entram no estado comportamental conhecido como *need-induced* (Puri and Lee 2021). Esses animais tendem a consumir substâncias contendo alto teor de sódio, com o intuito de manter a homeostase/osmolaridade (Rasouli 2016, Puri and Lee 2021). Com o intuito de observar quais as possíveis vias associadas com o *need-induced*, Curt Richter, submeteu seus animais a adrenalectomia juntamente com a redução de sódio na ração, ocasionando uma exacerbada resposta de apetite ao sódio motivado pelo decréscimo de aldosterona (Richter, 1936). Em 1984, Berridge demonstrou que ratos repletos de sódio tinham comportamentos aversivos a salina hipertônica, entretanto essas respostas aversivas se tornavam prazerosas, quando os animais eram submetidos aos protocolos de depleção de sódio (Berridge, Flynn, Schulkin, & Grill, 1984). Além da ação periférica, o apetite ao sódio é comumente relacionado com alterações no SNC, envolvendo sítios como o núcleo do trato solitário (NTS), OVLT, PVN, SFO, MnPO e o núcleo supra-optico (SON) sendo eles responsáveis por controlar o apetite ao sódio (Bourque 2008, Geerling and Loewy 2008, Noda and Sakuta 2013, Anesio, Barbosa et al. 2019).

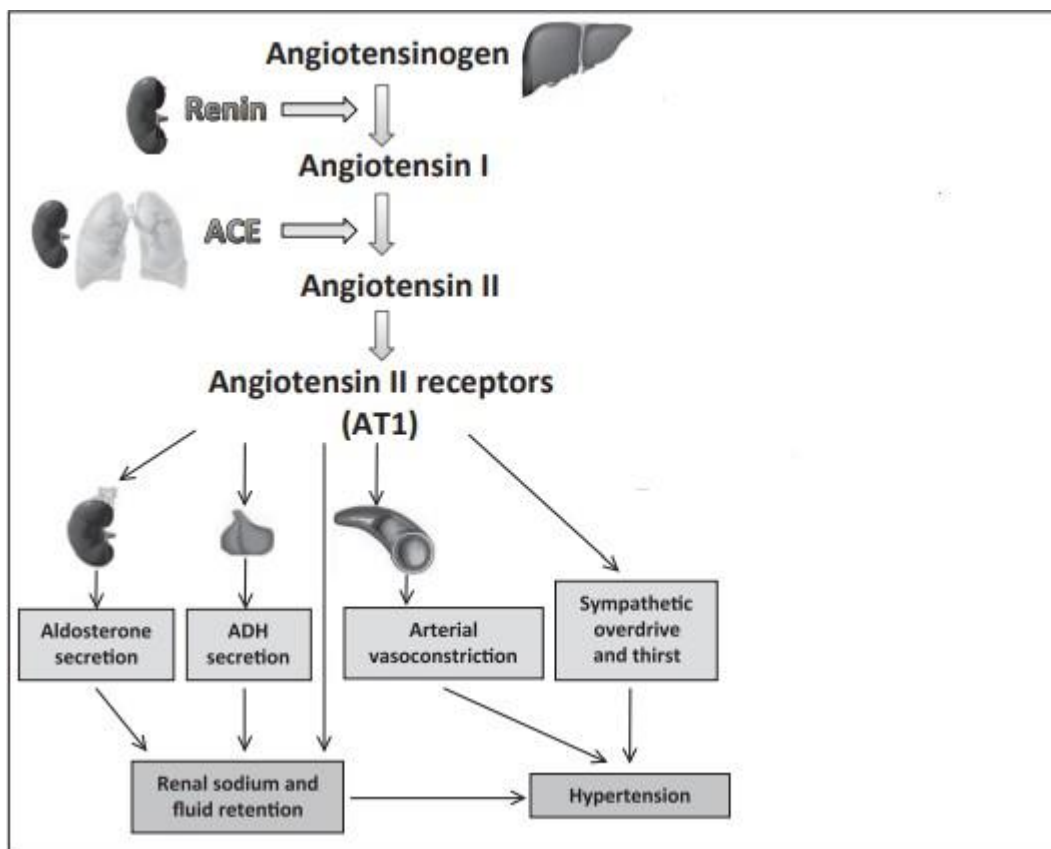
Um dos protocolos utilizados em ratos para induzir o apetite ao sódio é a privação hídrica (De Luca, Pereira-Derderian et al. 2010). Esse protocolo promove o estado de hipovolemia nos animais que tem a capacidade de induzir ao apetite ao sódio (Stricker, Gannon et al. 1992). O estudo realizado por De Luca e colaboradores (2002) utilizou o protocolo de privação hídrica em que os animais foram privados de água pelo período de 24 horas, fazendo com que ocorra a redução da natriurese com a finalidade de tentar manter a homeostase durante o processo de desidratação (De Luca et al., 2002). Nesse protocolo, os animais entram em estado de hipovolemia devido a combinação da depleção de sódio com a desidratação (De Luca, Pereira-Derderian et al. 2010). Após o período de privação hídrica, foram ofertados aos animais água até obterem a saciedade e, após esse período de reidratação, foram ofertadas buretas contendo água e salina 1,8% (De Luca, Xu et al. 2002). Realizado esse protocolo, foi identificada a sensibilização do apetite ao sódio, ou seja, ocorreu o aumento da ingestão de sódio classificado como *need-induced*. Outro estudo utilizado para avaliação do apetite ao sódio foi realizado por Pereira e colaboradores (2010).

Nesse estudo, foi utilizado o protocolo de depleção de sódio com o uso do diurético furosemida e o inibidor de ECA-1 captopril (FURO/CAP) (Pereira, Menani et al. 2010). Após a depleção de sódio induzido por FURO/CAP foi possível observar o aumento do apetite por sódio (Pereira, Menani, & De Luca, 2010).

2.5 Sistema Periférico no Controle do Apetite ao Sódio

A regulação para balanço de sódio ocorre no LEC e qualquer anormalidade que ocorra entre o balanço de água causa alterações nas concentrações séricas de Na⁺ e o contrário também acontece (Stanhewicz and Kenney 2015). Sendo que o controle de água varia de acordo com a quantidade de substâncias osmoticamente ativas presentes no LIC e LEC (Ueda and Hopper 2019). Em estudos clínicos e experimentais as concentrações séricas de Na⁺ no LEC giram em torno de 142 mmol/L (WARHOL, EICHENHOLZ et al. 1965, He, Fan et al. 2013). O aumento ou redução nas concentrações de Na⁺ desencadeia respostas regulatórias que tendem a retornar os valores para seu nível basal (Muhsin and Mount 2016, Weismann, Schneider et al. 2016). Um dos principais processos responsáveis por manter a osmolaridade é a produção dos hormônios aldosterona, vasopressina, renina e ang II. A produção de aldosterona é acarretada pela deficiência de sódio no organismo, produzindo a retenção de sódio (McEwen, Lambdin et al. 1986). A produção da aldosterona ocorre de acordo com a cascata do sistema renina angiotensina aldosterona (SRAA) (Patel, Rauf et al. 2017). Durante a cascata da RAAS, a renina é liberada pelo córtex renal mediante os estímulos de hipotensão, hipovolemia ou hiponatremia (Fitzsimons and Wirth 1978) Ela age metabolizando o angiotensinogênio, formando a angiotensina I. A angiotensina I circulante, ao passar pelos alvéolos pulmonares, é convertida em angiotensina II (ang II) por meio da ECA. A ang II estimula os receptores de angiotensina I (AT1R) no SNC, que, por sua vez, promovem a liberação de aldosterona por meio das glândulas suprarrenais (Figura 2) (Fregly and Rowland 1985, McKinley, Albiston et al. 2003, Adams, McCarthy et al. 2008, Wright and Harding 2013).

Figura 2 Esquema adaptado da cascata da SRAA.



(Santos, Krieger et al. 2012)

Além da cascata da SRAA, casos de hipovolemia também desencadeiam respostas humorais no controle do apetite ao sódio e sede (Grondin, Gobeil-Simard et al. 2011). Os principais hormônios liberados durante o estado hipovolêmico são: Ang II, aldosterona e arginina vasopressina (AVP), esses hormônios atuam no SNC e periféricamente, principalmente nos rins (Patel, Rauf et al. 2017). Entretanto, no caso de hipervolemia tem-se a redução da ingestão de água e sódio acarretada pelo peptídeo natriurético atrial (ANP), assim como redução da ang II, aldosterona e AVP (Farag, Sessler et al. 2017). Em 1998, Fitzsimons demonstrou que, no decorrer da hipovolemia, ocorria uma elevação de ang II e AVP circulante sendo responsáveis por ocasionar a produção da sede e tendo como efeito secundário a estimulação do apetite ao sódio (Fitzsimons, 1998). Outro estudo realizado por meio da administração de Ang II intravenosa demonstrou que o estímulo da ingestão de água induzia a geração do apetite ao sódio por meio de natriurese evocada pela Ang II sistêmica (Lucera, Menani et al. 2021). Contudo, outros ensaios demonstram que a

administração de Ang II em animais depletados de sódio tem um alongamento na geração do apetite ao sódio (Fitts *et al.*, 1985b). Entretanto, é possível observar uma resposta mais rápida do apetite ao sódio e da sede, quando se tem a combinação de mineralocorticoide e Ang II infundida no ventrículo lateral (VL) (Shade *et al.* 2002).

Além da RAAS e da AVP, alguns autores descrevem que o efeito dos barorreceptores não se deve apenas ao controle da pressão arterial (Kjolby, Kompanowska-Jezierska *et al.* 2005, Evans, Ivy *et al.* 2016), mas também no controle do apetite por sódio, que concomitantemente pode estar ligado a quadros de hipertensão sódio-dependente (Thunhorst, Lewis *et al.* 1994, Hendel and Collister 2005). Os estímulos que levam ao apetite por sódio, está primeiramente associado a características de redução e ou aumento de volume (Ployngam, Katz *et al.* 2012, Rakova, Kitada *et al.* 2017, Fortin and Roitman 2018), que se sabe é que os barorreceptores atriais detectam alterações de volume e podem estar envolvidos com o controle do apetite ao sódio (Vivas, Godino *et al.* 2014, Beltrán, Arce-Álvarez *et al.* 2020). Corroborando a ideia dos efeitos entre hipovolemia e apetite ao sódio, estudos demonstraram que o aumento na ingestão de sal induzida por hipovolemia e ou ação de mineralocorticoides é abruptamente atenuado, quando o átrio direito é distendido (Fletcher, Angus *et al.* 1975). A distensão atrial causa a “falsa” impressão de aumento de volume e imediatamente cessa a vontade por apetite ao sal (Korner, Oliver *et al.* 1975). Os barorreceptores periféricos são responsáveis por detectarem mudanças na pressão hidrostática e que possuem projeções aferentes para o NTS, que simultaneamente com o núcleo parabraquial lateral (NPBL) se projetam para o OVLT (Mckinley 2001 and Fluharty 2004).

2.6 Sistema nervoso central e apetite ao sódio

O sistema nervoso central tem importante papel na regulação do apetite ao sódio e da sede (Stricker and Verbalis 1996, Luz, Andrade *et al.* 2006, Bourque 2008). As regiões correlacionadas com esses sistemas de autorregulação são as regiões da lâmina terminal (LT) composta pelos dois órgãos circumventriculares (OCV): órgão subfornicial (SFO) e órgão vascular da lâmina terminal (OVLT) e do núcleo pré-óptico mediano (MnPO) (Anesio, Barbosa *et al.* 2019, Porcari, Debarba *et al.* 2020). Esses órgãos circumventriculares são adjacentes ao terceiro ventrículo e possuem a barreira hematoencefálica frouxa, fazendo com que possam monitorar o controle homeostático entre líquido e plasma sanguíneo (M. J. McKinley *et al.*, 2001). McKinley e

colaboradores realizaram o protocolo de privação hídrica durante o período de 24 e 48 horas. Passado o período de desidratação, os pesquisadores realizaram a marcação de Fos. A marcação da proteína permitiu visualizar que áreas como OVLT, núcleo pre-óptico mediano (MnPO), núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN) e núcleo hipotalâmico supra-óptico (SON) possuíam um aumento na ativação de neurônios após o procedimento de privação hídrica o que, no caso, não ocorreu com seu grupo controle que teve água ad libitum (McKinley, Gerstberger et al. 1999). Neste mesmo, estudo os pesquisadores injetaram um traçador retrogrado *cholera toxin B subunit conjugated to colloidal gold* (CTB-gold) no SON, para identificar quais destes neurônios marcados com Fos se projetavam para o SON. O resultado da injeção de CTB-gold no SON permitiu inferir que $\cong 30\%$ dos neurônios marcados no OVLT e MnPO se projetavam para o SON (McKinley, Gerstberger et al. 1999). Com esses resultados, os autores concluíram que esses órgãos presentes na lâmina terminal são imprescindíveis para o processo de homeostase (McKinley, Gerstberger et al. 1999).

O MnPO recebe projeções do SFO e OVLT (M. J. McKinley et al., 2001; Thrasher & Keil, 1987). Esses OCV do prosencéfalo são extremamente sensíveis a alterações na osmolaridade plasmática (Mimee, Smith et al. 2013, Noda and Sakuta 2013, Ferguson 2014) e contêm elevada expressão do receptor de angiotensina tipo 1 (AT1R) responsáveis pela ingestão de água e sal (Kakar, Riel, & Neill, 1992; Lenkei, Palkovits, Corvol, & Llorens-Cortès, 1997; M. McKinley, Badoer, & Oldfield, 1992). Uma segunda área responsável por controlar o apetite ao sódio está localizada no núcleo do trato solitário (NTS) (Ogihara, Schoorlemmer et al. 2009). O NTS tem uma subpopulação de neurônios que expressam a enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase do tipo dois (HSD2) que é responsável por metabolizar os glicocorticoides (Evans, Ivy et al. 2016). Os glicocorticoides atuam se ligando nas células que expressam receptores de mineralocorticoide (MR) por meio da aldosterona (Reul & de Kloet, 1985). Essa expressão do receptor realizada pela enzima HSD2 permite a ligação da aldosterona aos MR localizados no NTS, fazendo com que esse núcleo se torne altamente reativo à aldosterona (Geerling & Loewy, 2009). O SFO é responsável por diversas ações, dentre elas tem-se a regulação cardiovascular, balanço de energia e balanço hidrosalino (Smith & Ferguson, 2010). O SFO apresenta uma vasta rede de conectividade, sendo uma no núcleo ventromedial e outra na concha dorsolateral (M. J. McKinley, Allen, Burns, Colvill, &

Oldfield, 1998). A parte correspondente à concha dorsal projeta para a região com neurônios magnocelular do PVN, já a parte do núcleo ventromedial para a região dos neurônios parvocelular (Kawano & Masuko, 2010; M. J. McKinley et al., 2003). O SFO também envia projeções para o MNPO que projeta para o SON (Oldfield, Hards, & McKinley, 1991, 1992; Tanaka, Saito, & Kaba, 1987).

Em relação ao controle osmótico, a vasopressina (VP) é sintetizada pelos neurônios magnocelulares do SNC, principalmente localizadas no SON e no PVN, sendo a vasopressina um dos hormônios responsáveis pela indução da sede e retenção de água (Bourque, Ciura et al. 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar se a dieta contendo 0,9% de Na⁺ durante 12 semanas após o desmame (modelo HS12W) provocaria alterações sustentadas no consumo de água e salina 1,8% NaCl em ratos Wistar adultos.

3.1 Objetivos Específicos

- Avaliar a ingestão voluntária de salina hipertônica 1,8% e água, ao longo de 35 dias como ferramenta para inferir o apetite ao sódio.
- Correlacionar a ingestão de salina hipertônica com os níveis de pressão arterial.
- Avaliar a sede e o apetite ao sódio subsequente ao protocolo de privação hídrica em ratos HS12W;
- Avaliar a ativação de neurônios PVN comparando dietas distintas.

4. METODOLOGIA

4.1 Modelo Animal

Para a realização deste trabalho, foram utilizados ratos recém desmamados da linhagem Wistar com 21 dias de idade e colocados para receberem as dietas com níveis de sódio controlados pelo período de 12 semanas. Os animais foram alojados em *racks* ventilados fornecidos pelo Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP), com ração e água de torneira *ad libitum*, ciclo claro-escuro de 12 horas e temperatura média de 24 ± 1 °C e umidade (~ 60%) até a realização dos protocolos experimentais. Todos os protocolos desenvolvidos durante essa pesquisa foram realizados de acordo com a Lei Arouca (Lei 11.794/2008) e com a aprovação do projeto na Comissão de Ética em Uso Animal da Universidade Federal de Ouro Preto, sob o protocolo nº 3994070520.

A alimentação disponível para os ratos Wistar de todos os grupos foi a ração Nuvilab® (Quimtia®). Os *pellets* foram triturados e ofertados em pó. Para os animais designados para o grupo controle (SD), a ração teve seu teor de sódio ajustado para 0,27%, por 12 semanas. Outro grupo de ratos recebeu uma dieta acrescida de 0,9% de sódio denominado de grupo (HS). Para esse grupo, a dieta SD e HS foi fabricada no Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular. Nessa dieta, o cloreto de sódio foi micronizado de forma a facilitar a sua adição pelo método de quarteamento na ração Nuvilab® (Quimtia®).

4.2 Soluções

4.2.1 Salina tamponada com fosfato (PBS)

Para o preparo da solução, foram diluídos os sais NaCl, Na₂HPO₄.H₂O e NaH₂PO₄.H₂O P.A. (Sigma-Aldrich SP, Brasil) em q.s.p. 1000 mL de água ultrapura (Milli-Q). A solução foi ajustada, utilizando um pHmetro de bancada para obtenção do pH 7,2, transferida para o frasco Mariotte, e esterilizada por autoclavação durante 30 minutos e mantida à temperatura ambiente para uso.

4.2.2 Anticoagulante para registro de pressão arterial

Diluiu-se um frasco de heparina 5.000UI (Hemofol, Cristália Prod. Quím. Farm. Ltda.) em PBS filtrado para a preparação da solução final com concentração de

1000UI/mL. A solução foi alíquotada em microtubos de 1,5 mL (Eppendorf), armazenadas no freezer -20°C.

4.2.3 Solução TrisPB (TPBS)

Para o preparo das soluções de TPBS foram diluídos Trizma Base, NaCl, Thimerosal e tampão fosfato (PB) em 800 mL de água ultra pura (Milli-Q). Após a diluição, a solução foi transferida para o frasco Mariotte e completada para 1000 mL. A solução de TPBS foi ajustada utilizando pHmetro de bancada para o pH 7,4.

4.2.4 Solução ImmunoBuffer (IB)

Para o preparo da solução de IB, com auxílio de uma proveta de vidro graduada, acrescentaram-se 997 mL da solução de TPBS acrescido de 3 mL de Triton X-100, sendo dissolvida em um béquer de 1L.

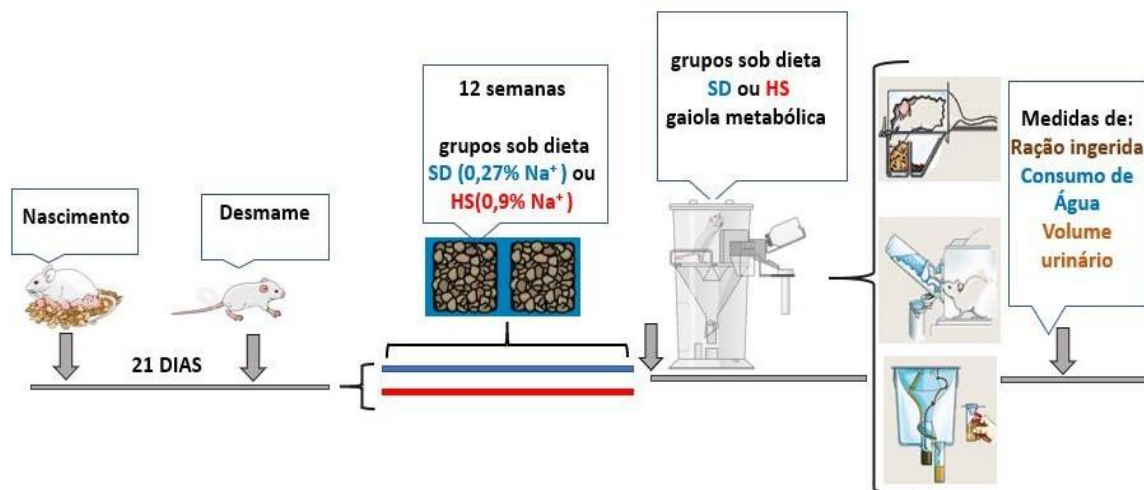
4.2.5 Solução Paraformaldeído 4%

Para o preparo das soluções, foram diluídos os sais PFA, Na₂HPO₄.H₂O e NaH₂PO₄ anidro (Sigma-Aldrich SP, Brasil) em q.s.p. 1000 mL de água destilada. A solução foi ajustada, utilizando um pHmetro de bancada para obtenção do pH 7,2, e armazenada em geladeira (4°C).

4.3 Protocolo da Gaiola metabólica

Ratos Wistar (n=12), na décima segunda semana após o desmame, foram alocados em gaiolas metabólicas (Tecnoplast®) e permaneceram por 48h no experimento, sendo as primeiras 24h para o período de adaptação dos animais às gaiolas metabólicas e as seguintes 24 horas para a realização da medição do volume urinário produzido, medição de volume de água ingerida por meio de uma proveta de polipropileno graduada. A ração ingerida foi pesada em uma balança digital da marca SF-400 (Figura 3) .

Figura 3: Protocolo experimental da Gaiola metabólica

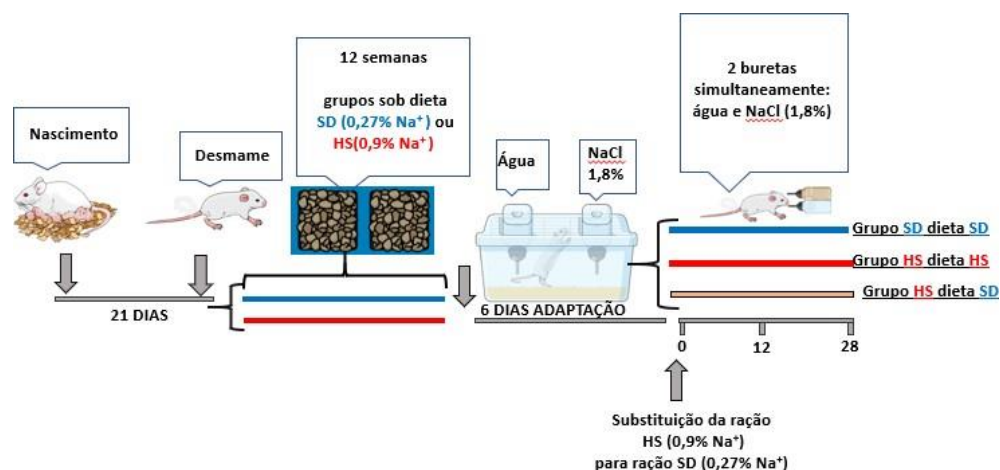


4.4 Protocolo de substituição da ração HS pela ração SD

Os ratos Wistar ($n=46$) HS e SD foram alocados em gaiolas individuais, tendo sido ofertadas, simultaneamente, duas buretas contendo água em uma e solução de cloreto de sódio 1,8% em outra. Durante 6 dias, os animais tiveram livre acesso às buretas e às respectivas rações de cada coorte (HS e SD), constituindo, assim, o período de adaptação à presença das duas fontes de líquido (água e salina 1,8%).

No sexto dia, os ratos HS foram divididos em dois subgrupos: um subgrupo teve a dieta HS substituída por SD (HS-SD) e o outro subgrupo permaneceu com a dieta HS (HS-HS). Os ratos controles tiveram suas rações SD mantidas durante todo o protocolo. Os animais, tanto HS quanto controle, permaneceram, com livre acesso à ração SD ou HS e às buretas por mais 28 dias (figura 4).

Figura 4: Protocolo experimental substituição da ração HS pela ração SD.



4.4.1 Confeção das cânulas artérias

Para a realização da confecção das cânulas arteriais, foram utilizados tubos de polietileno PE-50 soldados a tubos de polietileno PE-10, sendo as dimensões ajustadas de acordo com o peso individual de cada animal. Antes do implante nas artérias dos animais, o interior das cânulas foi lavado e preenchido com o veículo PBS. A extremidade da ponta da cânula PE-50 foi obstruída, utilizando um pino de aço-níquel rígido e esterilizado.

4.4.2 Medida direta da pressão arterial

Findos os 28 dias, os animais foram tratados com tramadol (dose) e anestesiados com ketamina (Syntec, SP, Brasil) (80mg/kg), acrescidos de xilazina (Syntec, SP, Brasil) (7mg/kg) intraperitonealmente. Após certificar o plano anestésico dos animais por meio do pinçamento nos espaços interdigitais, os animais foram colocados em posição de decúbito dorsal e tricotimizados na região ventral da pata esquerda traseira.

Após a assepsia do local com iodo, foi realizada uma incisão na região inguinal para expor o trígono femoral. Foram expostas e dissecadas a artéria e veia femoral dos animais. Em seguida, os vasos sanguíneos foram, então, cateterizados com a porção PE-10 da cânula e o PE-50 externo foi transposto subcutaneamente ao dorso do animal e sua extremidade foi suturada na região interescapular. Ao final da cirurgia de canulação, os animais foram suturados nas regiões expostas e receberam o

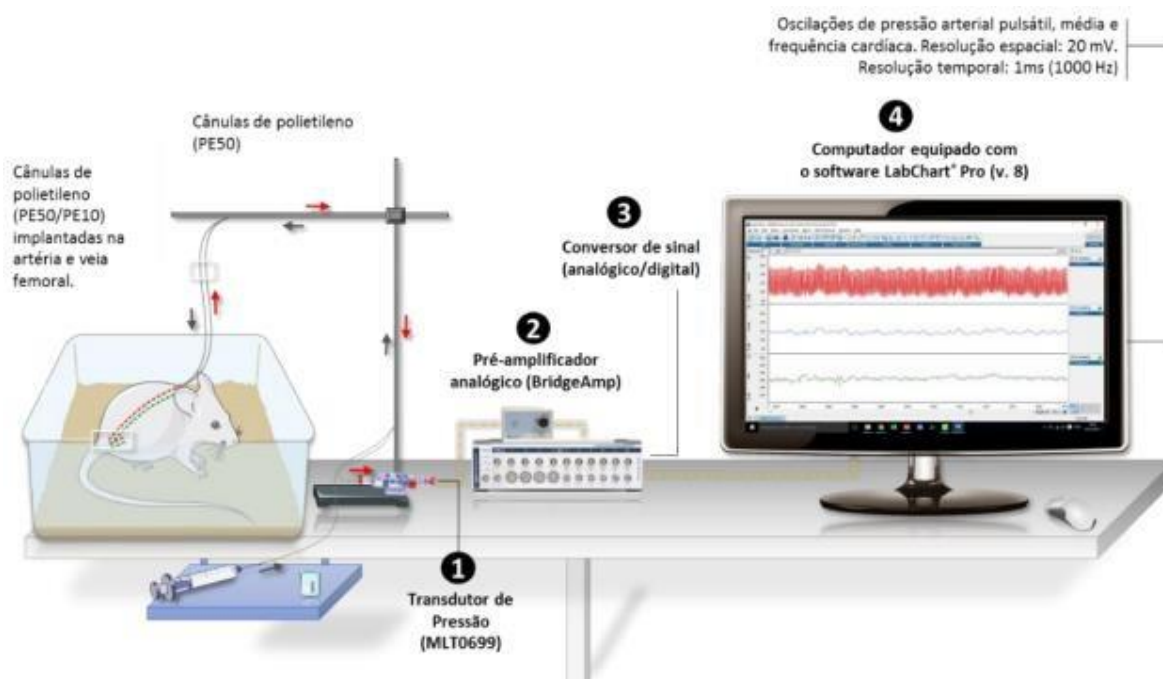
tratamento profilático por via subcutânea de antibiótico no volume de 0,1 ml por animal.

4.4.3 Registro da pressão arterial

Para a recuperação dos animais, após o procedimento de canulação, eles foram alocados em gaiolas individuais com duas buretas, água e solução salina 1,8% e as respectivas dietas recebidas previamente *ad libitum* por 48 horas. Para conduzir o registro da pressão arterial dos animais, foram retiradas das caixas dos animais as buretas contendo água e solução salina 1,8% e a dieta.

Para o registro da pressão arterial dos ratos, receberam heparina sódica (~100 UI.kg⁻¹) na cânula arterial para evitar formação de coágulos durante o registro da PAM. As cânulas foram conectadas a um transdutor de pressão (MLT0699), o qual é conectado ao amplificador BridgeAmp que envia os sinais para um conversor analógico digital PowerLab 4. Para evitar o aparecimento de coágulo, foi administrada nas artérias femorais heparina sódica (500 UI/MI). O *software* LabChart 7.1 foi utilizado com o intuito de criar o registro temporal da pressão arterial do animal. Utilizou-se uma frequência amostral de 1000Hz com a janela de digitalização de 20mV de amplitude para 16 bits do equipamento para a resolução espacial (figura 5).

Figura 5: Esquema demonstrando o procedimento de aferição da pressão arterial dos animais.

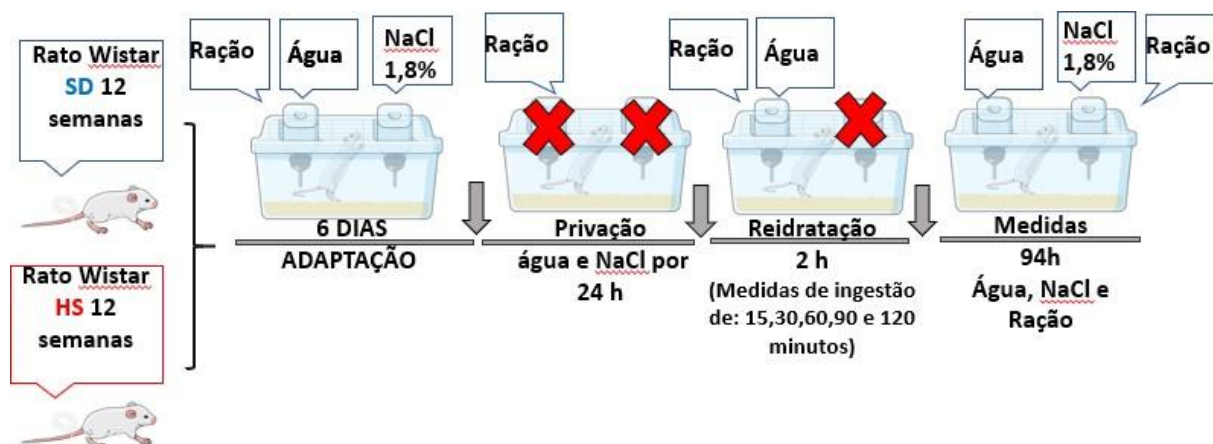


4.5 Protocolo Privação Hídrica

Os animais HS e SD alocados em caixas isoladas, receberam simultaneamente, duas buretas contendo água em uma e solução de cloreto de sódio 1,8%. Para constituir o período de adaptação dos animais, utilizamos o período de 6 dias, os animais tiveram livre acesso às buretas e às respectivas rações de cada coorte (HS ou SD) de adaptação à presença das duas fontes de líquido (água e salina 1,8%), caracterizando o período basal do experimento.

No sexto dia, as buretas contendo água e salina 1,8% foram retiradas e os animais permaneceram em privação hídrica pelo período de 24 horas. Findas as 24 horas, primeiramente, foi ofertada uma bureta contendo água por 2 horas, constituindo assim o período de reidratação, no qual foram realizadas medições no volume de ingestão de água no período de 15, 30, 60, 90 e 120 minutos. Após o período de reidratação, foi adicionada mais uma bureta, contendo solução salina 1,8% por mais 94 horas (Figura 6)

Figura 6: Protocolo de privação hídrica



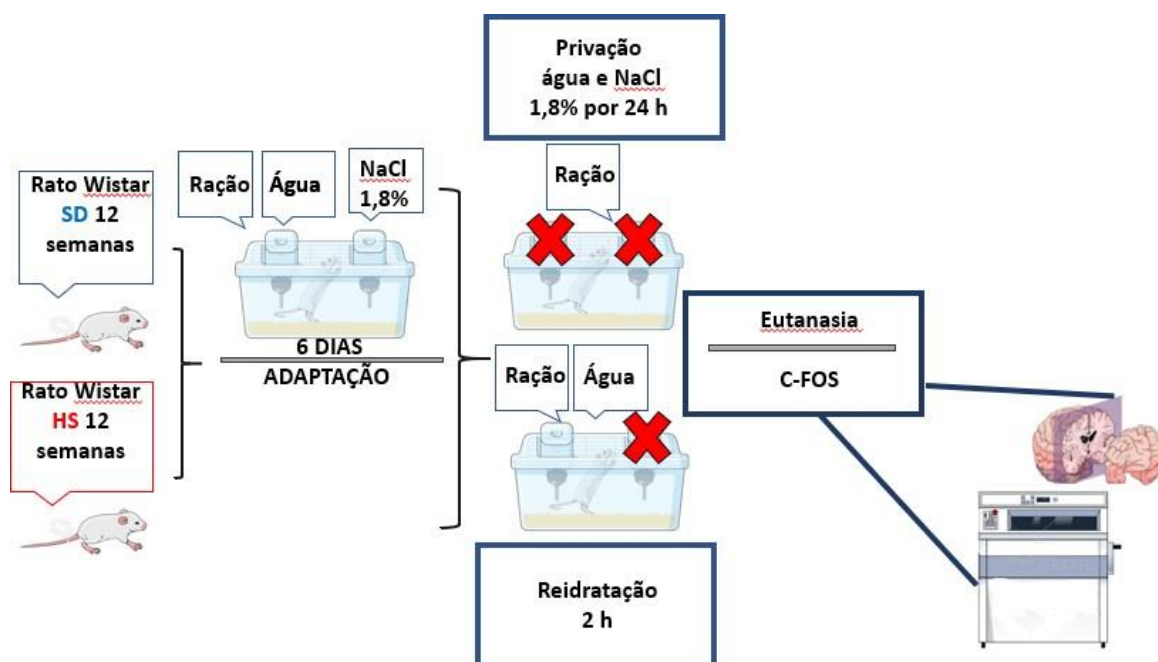
4.6 Protocolo Imuno-Histoquímica

Os animais HS e SD, foram alocados em caixas isoladas e receberam, simultaneamente duas buretas, uma contendo água e outra contendo solução hipertônica 1,8% NaCl. Durante o o protocolo, os animais passaram pelo período de adaptação de 6 dias, em que tiveram livre acesso às buretas e às respectivas rações de cada grupo (HS ou SD).

Após a adaptação os ratos HS e SD foram submetidos ao protocolo de privação hídrica. Imediatamente o período de 24 horas de privação os animais foram eutanasiados com sobredose de ketamina (240 mg/kg) e xilasina (21 mg/kg), quando ocorreu a remoção do encéfalo de ambos os grupos. Subsequente ao período de privação hídrica, outros ratos HS e SD passaram pelo período de reidratação durante 2 horas, e após este período o encéfalo destes animais também removidos. Para a remoção dos encéfalos os animais foram perfundidos com paraformaldeído (PFA 4%). Os encéfalos foram armazenados a temperatura de $\pm 4^{\circ}\text{C}$, imersos em solução de sacarose a 20% para a preservação total do tecido (Figura 7). Logo após foi utilizado o criostato Leica CM1860, para obter as secções dos encéfalos em $40\mu\text{M}$. As secções foram lavadas, utilizando a mesa de agitação Rocker 25 (Labnet) três vezes com a solução Immuno buffer (IB) pelo período de 10 minutos em cada lavagem. Findas as lavagens, as secções foram incubadas em soro NDS (Normal Donkey Serum) 2% mais IB pelo período de 45 minutos, antes de serem incubadas *overnight* por um período de 18 horas à temperatura ambiente, sob agitação com o anticorpo policlonal

Anti c-Fos de coelho (Calbiochem P38, EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA, USA). A diluição de escolha foi de 1:5000. Finda a primeira etapa de reação de imunohistoquímica, foram realizadas três lavagens utilizando TPBS por 10 minutos cada. A seguir, utilizou-se a incubação de IB acrescido de NDS 1% e o anticorpo secundário Alexa 594 anti coelho (Jackson 1:500) pelo período de duas horas. Por fim, as secções foram montadas em lâminas de vidro gelatinizadas e depois de secas foram protegidas com Vectashield e lamínula.

Figura 7: Protocolo realizado para a imuno-histoquímica.



4.7 Análise Estatística

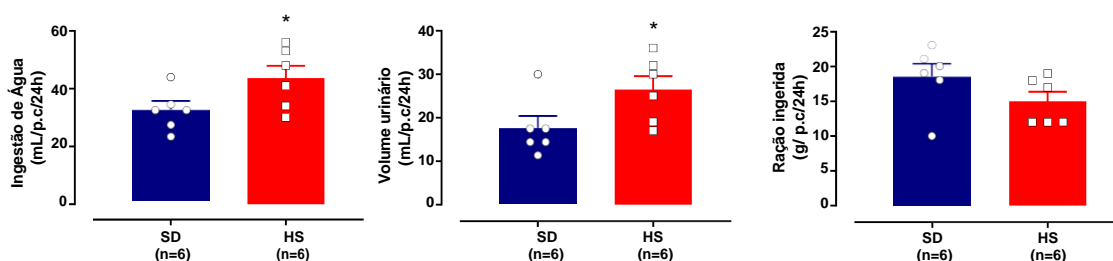
As análises estatísticas realizadas neste trabalho foram feitas no *software* GraphPad Prism 9.0 para *Windows*. Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Utilizou-se teste-*t* ou análise de variância *one* e *two-way* (ANOVA) para as análises de comparações entre os grupos. O pós-teste Tukey ou Bonferroni foi utilizado para comparações entre pares de médias. As diferenças significativas entre os pares de médias foram definidas quando a probabilidade de erro do Tipo II foi menor que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

5.1 Balanço hidroeletrólítico

De acordo com o protocolo experimental, foram realizadas medidas de volume urinário, ingestão de água e ração nos grupos HS e SD. Os dados mostram que os animais que ingeriram a ração HS tiveram um aumento na ingestão de água, quando comparados com seu controle SD, com valores de $43,67 \pm 4,26$ ml e $31,17 \pm 3,05$ ml respectivamente. A dieta HS também ocasionou o aumento no volume urinário ($26,50 \pm 3,06$ ml). Porém, com os animais SD ($17,17 \pm 2,72$ ml), entretanto, não houve diferença no consumo de ração desses animais (Figura 8).

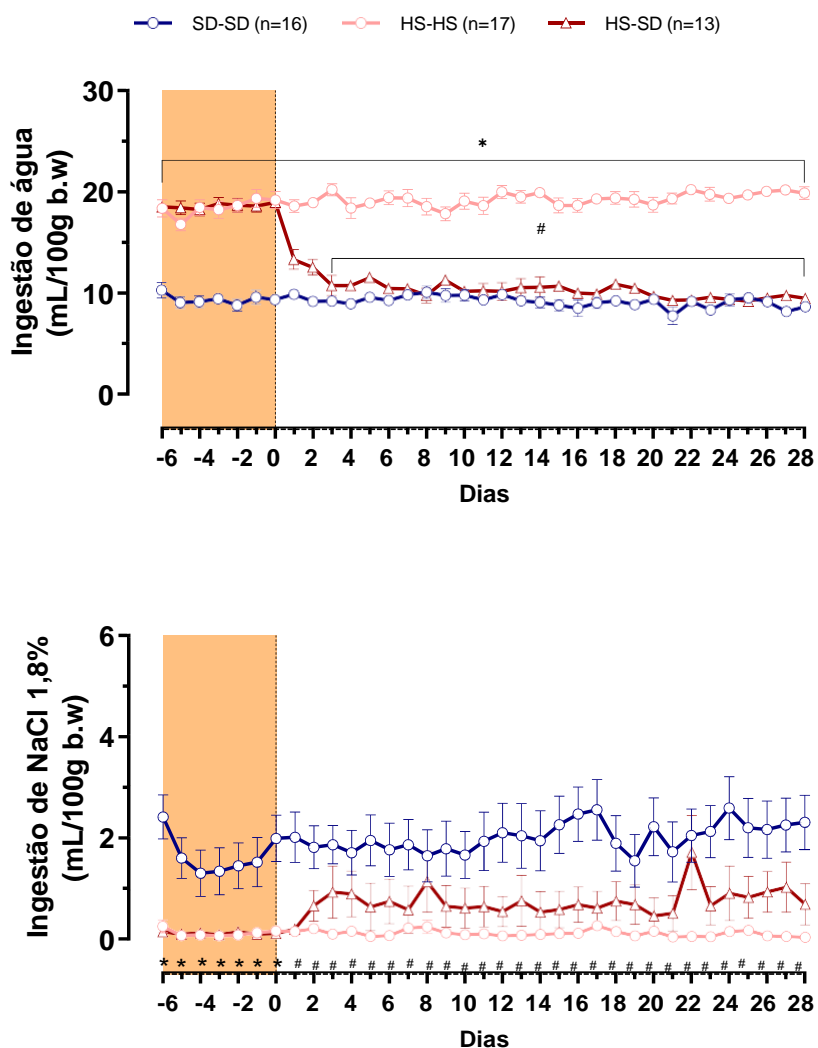
Figura 8: Níveis de ingestão de ração, água e volume urinário em ratos HS e SD, realizadas após 12ª semana após o desmame. Círculos (SD) e quadrados (HS) representam valores individuais e as barras a média dos grupos. *Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$.



5.2 Avaliação comportamental do consumo de água e salina 1,8%

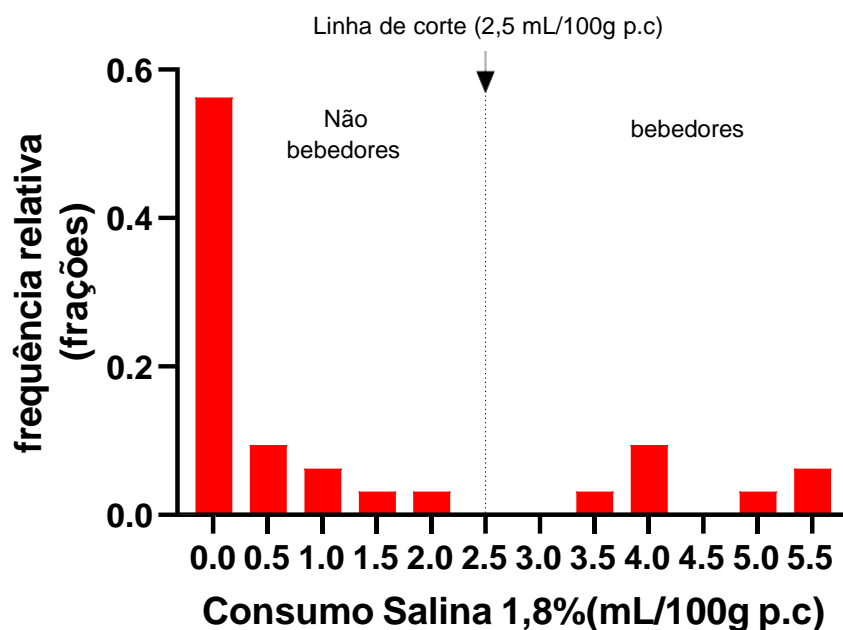
Como descrito acima, os animais HS-HS e HS-SD, durante o período basal demarcado de cor laranja, apresentaram elevação no consumo de água em relação aos grupos SD. Após o período basal e a troca da ração HS por SD o grupo HS-SD, reduziu a ingestão de água em 47,25%, quando comparado com o grupo HS-HS, sendo, neste caso, semelhante ao grupo SD-SD. Entretanto, não houve diferença no consumo de salina hipertônica 1,8% NaCl. Os dados estão apresentados na figura 9.

Figura 9: Níveis de ingestão de água e salina 1,8% em ratos SD-SD, HS-HS e HS-SD, realizadas no decorrer de 35 dias. Azul (SD-SD), rosa (HS-HS) e vermelho (HS-SD) representam valores da média dos grupos. Two Way Anova – seguido de pós teste de Tukeys * diferente de SD-SD; # diferente de HS-HS; $p < 0.05$.



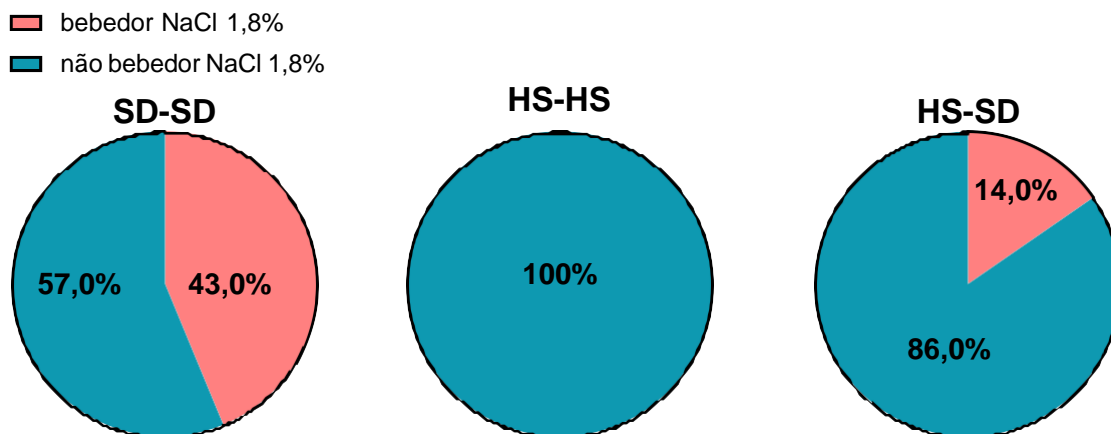
Outro resultado obtido por meio da análise comportamental foi a classificação dos ratos HS-HS, HS-SD e SD-SD como bebedores e não bebedores de salina 1,8% NaCl. Para tanto, foi realizada uma distribuição de frequência em que foram observadas duas populações distintas entre ratos classificados como bebedores de salina ($\geq 2,5$ ml) ou ratos não bebedores de salina ($\leq 2,0$ ml), apresentados na figura 10.

Figura 10: Frequência de distribuição para classificação de bebedores e não bebedores de salina 1,8% NaCl nos últimos cinco dias.



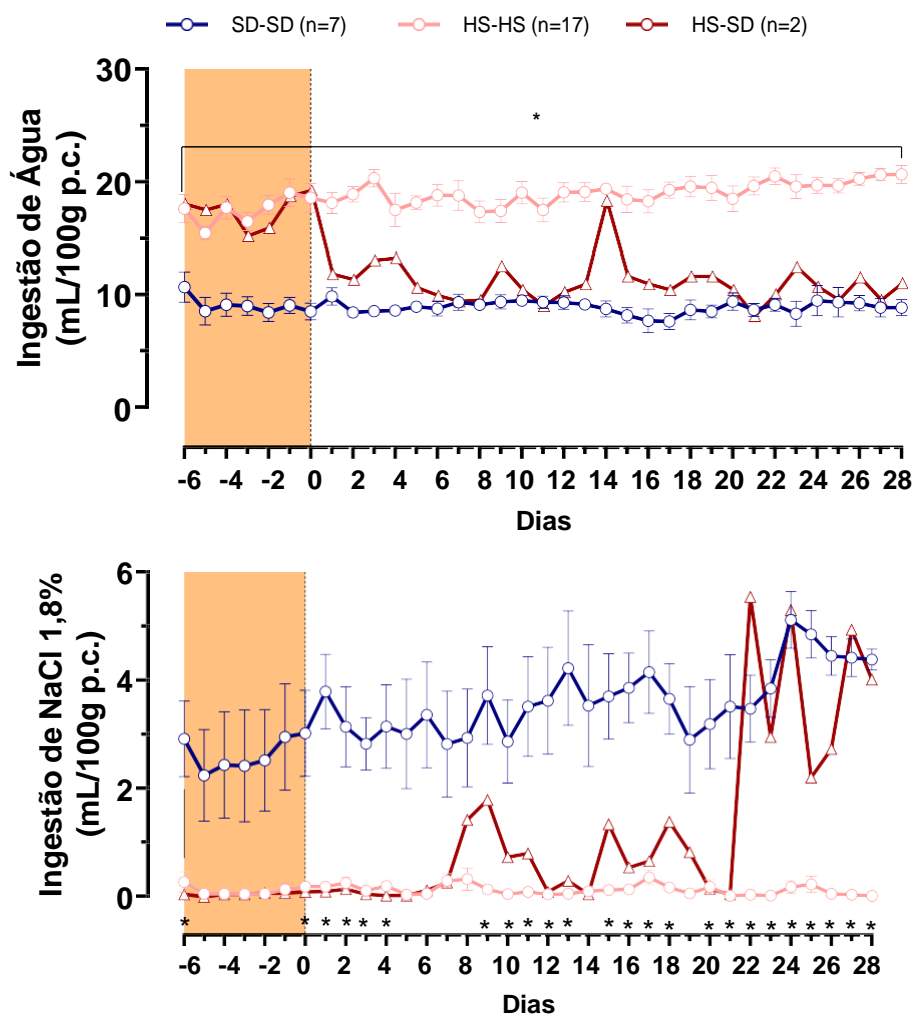
Com base nos dados obtidos, observa-se que 43,75% dos animais provenientes do grupo SD-SD se tornaram bebedores de salina. Contudo, apenas 15,38% dos ratos HS-SD foram classificados como bebedores de salina 1,8% NaCl. No grupo HS-HS não houve animais bebedores (Figura 11).

Figura 11: Percentual do comportamento de ingestão solução salina hipertônica 1,8% nos últimos 5 dias.



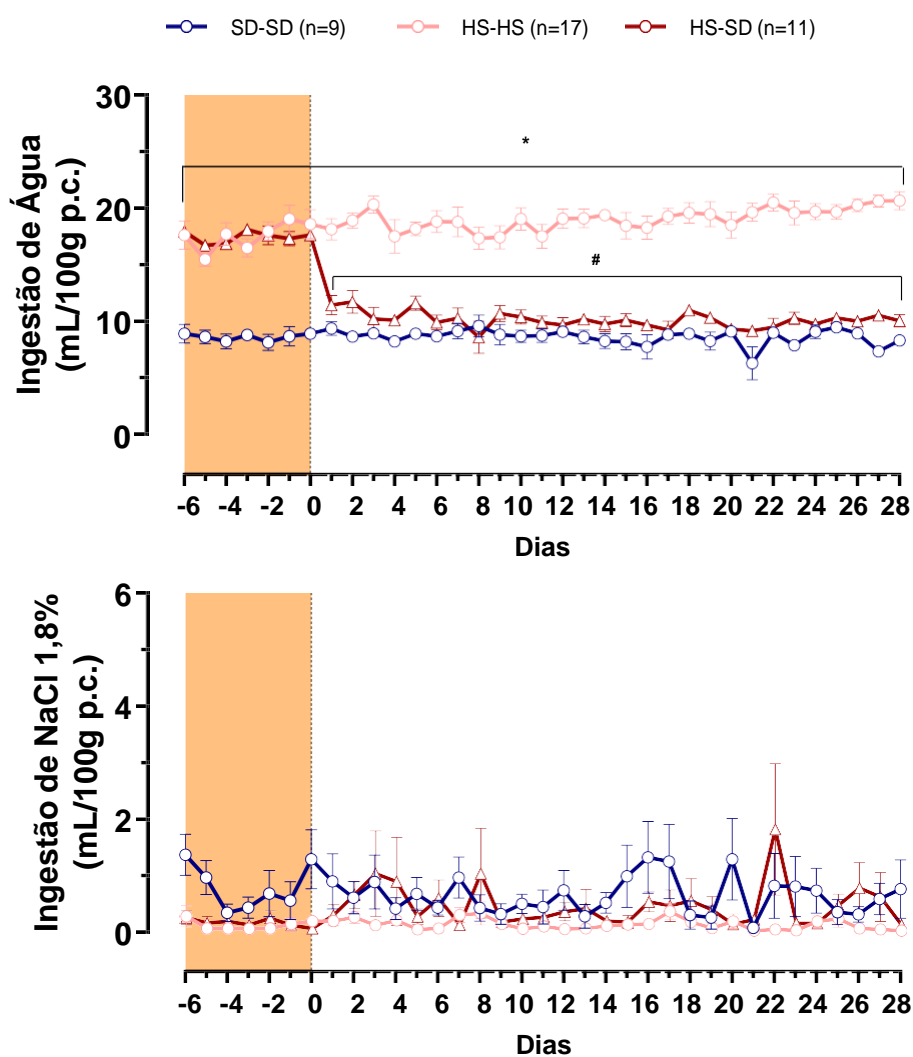
Em relação aos animais classificados como bebedores, observou-se um aumento no consumo de salina nos grupos SD-SD ($M_e \pm 4,37$ mL /100g p.c) em relação aos ratos do grupo HS-HS ($M_e \pm 0,13$ mL/100g p.c). Porém, a partir do 22º dia até o fim do protocolo experimental, não houve diferença entre o grupo SD-SD e HS-SD bebedores de salina 1,8% NaCl (Figura 12).

Figura 12 Níveis de ingestão de água e salina 1,8% em ratos SD-SD, HS-HS e HS-SD classificados como bebedores, realizadas após 35 dias. Azul (SD-SD), rosa (HS-HS) e vermelho (HS-SD) representam a média dos grupos. Two Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey; *HS-HS e HS-SD diferente de SD-SD; #HS-HS diferente de SD-SD; $p < 0.05$.



Nos animais classificados como não bebedores de salina não foi encontrada diferença significativa entre os grupos (Figura 13).

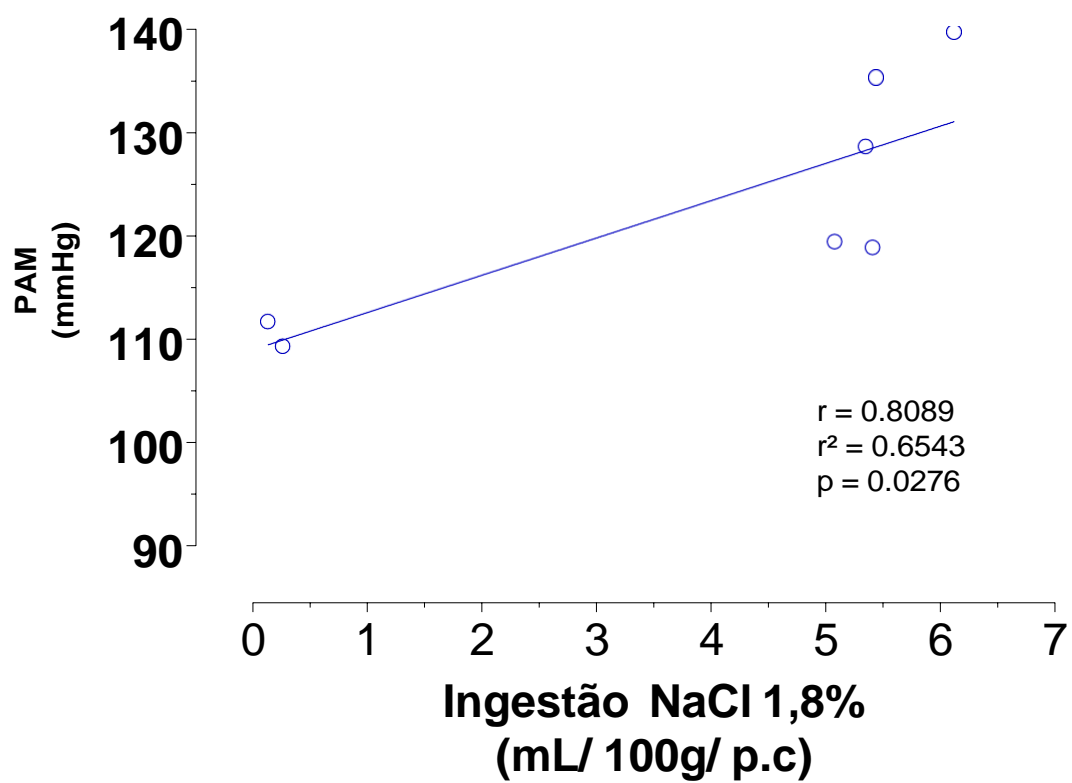
Figura 13: Níveis de ingestão de água e salina 1,8% em ratos SD-SD,HS-HS e HS-SD não bebedores de salina, obtidos no decorrer de 35 dias. Azul (SD), rosa (HS) e vermelho (HS-SD) representam valores da média dos grupos. Two Way ANOVA, seguido de pós teste de Tukey; *HS-HS diferente de SD-SD; # HS-HS diferente de SD-SD e HS-SD; $p < 0.05$.



Após 35 dias de ingestão crônica de salina, foi observada uma correlação positiva entre o aumento da ingestão de salina 1,8% NaCl com o aumento da pressão

arterial média (PAM) dos animais SD-SD classificados como bebedores de salina.
Figura:14.

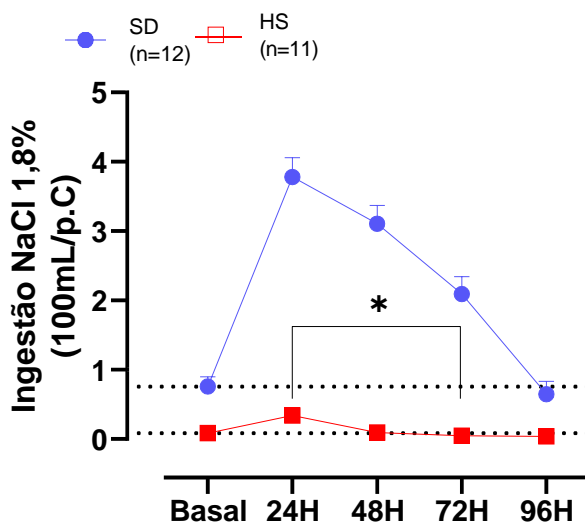
Figura 14: Correlação do efeito da ingestão de solução salina hipertônica 1,8% sobre a pressão arterial de ratos Wistar em repouso.



5.3 Privação hídrica

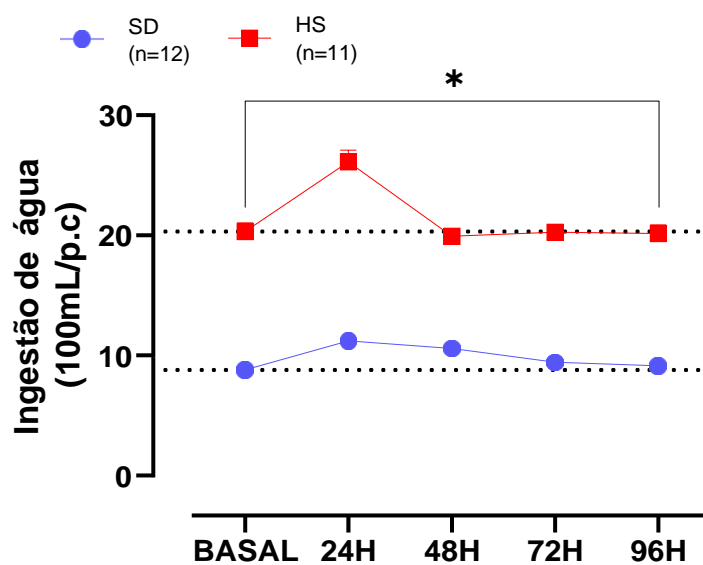
Após o estímulo de privação hídrica, os animais HS reduziram a ingestão de salina 1,8% NaCl pelo período de 24, 48 e 72 horas, como observado na figura 15.

Figura 15 Níveis de ingestão de salina 1,8% em ratos HS12W submetidos ao protocolo de privação hídrica. Azul (SD), vermelho (HS), os símbolos representam valores da média dos grupos. 24H, 48H, 72H e 96H correspondem ao período pós privação hídrica *Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$.



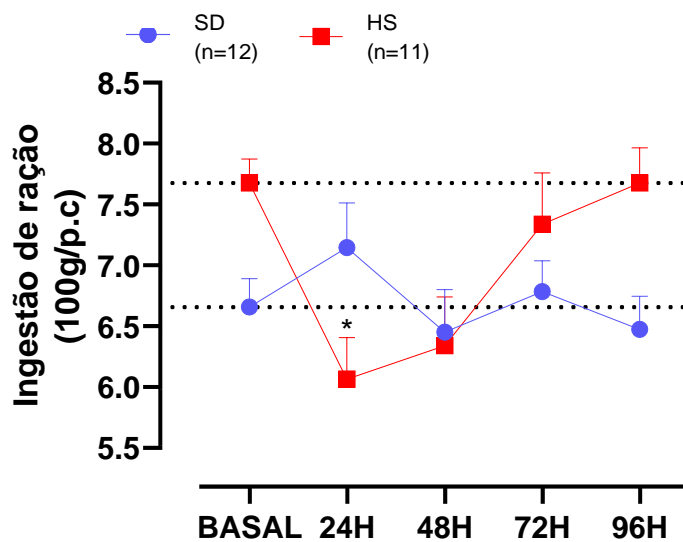
Em relação ao consumo de água, durante todo o protocolo, os animais que consumiram a ração HS (0,9% NaCl) apresentaram um aumento significativo na ingestão de água, como observado na figura 16.

Figura 16: Níveis de ingestão de água em ratos HS12W submetidos ao protocolo de privação hídrica. Azul (SD), vermelho (HS), os símbolos representam a média dos grupos. * Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$.



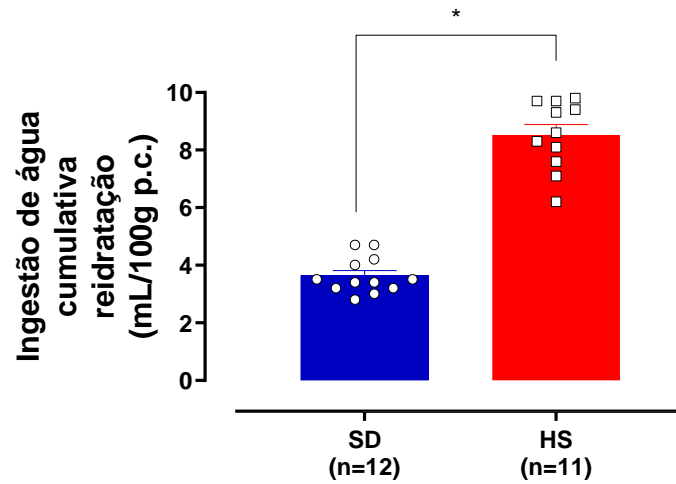
Em relação ao consumo de ração, os animais HS, apresentaram uma redução na ingestão de ração após o protocolo de privação hídrica em 24 horas (7.675 ± 0.525 , $n=11$ vs 6.066 ± 0.905 , $n=11$) conforme apresentado na figura 17.

Figura 17: Níveis de ingestão de ração em ratos HS12W submetidos ao protocolo de privação hídrica. Azul (SD), vermelho (HS), os símbolos representam a média dos grupos. *Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$



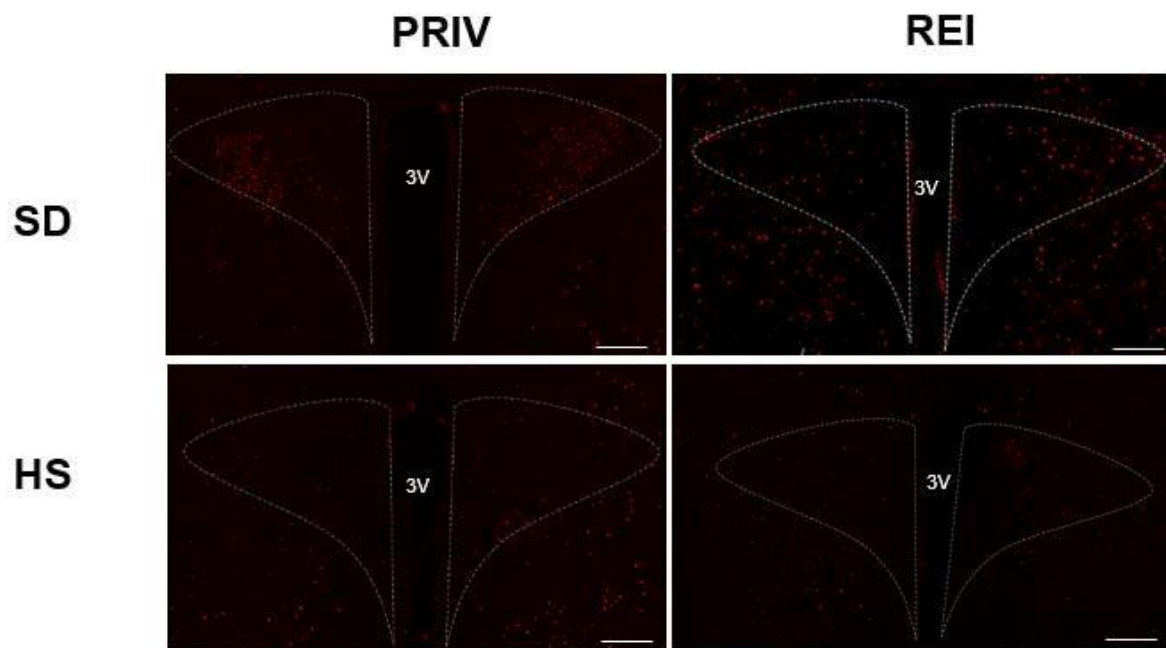
No período de reidratação, os animais HS apresentaram um aumento na ingestão de água durante a primeira hora de reidratação, como observado na figura 18.

Figura 18: Níveis de ingestão de água em ratos HS12W submetidos ao protocolo de reidratação, após o protocolo de privação hídrica. Azul (SD), vermelho (HS), os símbolos representam valores individuais e as barras a média dos grupos. * Diferente do grupo controle; teste-t não pareado; $p < 0,05$.



Após realizar a técnica de imuno-histoquímica, foi observado qualitativamente a expressão da proteína c-Fos em neurônios do PVN dos ratos HS e SD na privação hídrica e pós reidratação (Figura 19).

Figura 19: Avaliação dos neurônios do PVN (Bregma -1.8) em animais SD e HS submetidos ao protocolo de privação hídrica e reidratação.



6. DISCUSSÃO

Neste estudo, foi possível observar que a dieta crônica contendo alto teor de sódio foi responsável por aumentar a ingestão de água e conseqüentemente o volume urinário dos animais. Esses resultados corroboram com os dados da literatura que demonstraram que a dieta com alto teor de sódio origina o quadro de hiperosmolaridade no LEC (Toney and Stocker 2010). Como resposta a esse efeito hiperosmótico, ocorre a indução da sede para promover o aumento da ingestão de água e conseqüentemente o aumento do volume urinário (McKinley, Lichardus et al. 1992, Emmeluth, Goetz et al. 1996). Estudos utilizando o modelo HS12W também já demonstraram que a dieta contendo 0,9% de Na⁺ induz o aumento na ingestão de água, assim como seu volume urinário (Gomes, Sá et al. 2017). Além disso, existem relatos de que o aumento do consumo de sódio promove o aumento do volume urinário como resposta para manutenção e controle homeostático (Hosohata, Yoshioka et al. 2016). Portanto, o aumento do volume urinário, assim como o aumento no consumo de água, está envolvido diretamente no controle do balanço hidroeletrólítico, ou seja, o animal aumenta a ingestão de água e volume urinário, a fim de excretar o excesso de sódio.

Para identificar se a dieta com sobrecarga de sódio pós desmame seria capaz de induzir o estado comportamental do apetite ao sódio, foi realizado o protocolo de substituição da ração contendo alto teor de sódio pela dieta normal, para avaliar a busca por sal. Curiosamente, apenas uma pequena parte da população dos animais com dieta trocada desenvolveu o apetite por sódio. A substituição da ração HS para SD ocasionou uma redução de 30% na concentração de sódio. A baixa concentração de sódio na dieta, já havia sido relatada na literatura com o agravamento da sensibilização do sistema opioidérgico, ocasionando respostas comportamentais indesejadas como estresse, redução da motivação e do estímulo de recompensa (Grippe, Moffitt et al. 2006, Morris, Na et al. 2008). Em outro estudo, foi possível observar o efeito ansiogênico acarretado pela baixa concentração de sódio na dieta de ratos Sprague-Dawley. A baixa concentração de sódio na dieta em ratos já havia sido relatada na literatura com o agravamento da sensibilização do sistema opioidérgico, ocasionando respostas comportamentais indesejadas como estresse, e redução da motivação e do estímulo de recompensa (Grippe, Moffitt et al. 2006, Morris, Na et al. 2008). Em outro estudo, foi possível observar o efeito ansiogênico acarretado

pela baixa concentração de sódio na dieta de ratos Sprague-Dawley (Leshem 2011). Contudo, os ratos que sofreram estresse crônico leve ou agudo, porém suplementados com salina 3%, não apresentaram efeitos ansiogênicos (Leshem 2011). Além de estudos experimentais, ensaios clínicos demonstraram que a deficiência ou a depleção de sódio ocasionou o quadro de fadiga crônica (De Lorenzo, Hargreaves et al. 1997, Johnson and Grippo 2006, Leshem 2009). Estes estudos descritos acima sugerem que a redução no consumo de sódio pode levar a distúrbios comportamentais, podendo afetar sistemas de recompensa relacionados ao apetite ao sódio.

Outro achado importante foi a divisão populacional entre os ratos HS e SD bebedores ou não de salina hipertônica 1,8% NaCl. Desde o século passado alguns estudos vêm demonstrando que na mesma espécie de ratos existem subpopulações que podem ou não apresentar maior susceptibilidade ao sódio. Dahl, em 1962, identificou uma subpopulação de ratos Wistar sendo conhecidos como ratos Dahl sal sensíveis ou resistentes (Dahl, Heine et al. 1962). Os ratos Dahl sal sensíveis são susceptíveis a alta ingestão de sódio, podendo produzir quadros hipertensivos e até mesmo distúrbios metabólicos, diferentemente dos Dahl sal resistentes (Dahl and Heine 1961, Dahl, Heine et al. 1962, Liu, Yang et al. 2020). Outra subpopulação de ratos, também já relatada na literatura são os espontaneamente hipertensos (SHR) que são derivados dos Wistar (Okamoto and Aoki 1963). Neste caso, os SHR possuem uma predisposição a desenvolver casos de hipertensão (Okamoto and Aoki 1963). Esses dados corroboram a hipótese de que existem subpopulações dentre os ratos da mesma espécie, explicando o consumo de salina hipertônica em ratos SD.

É bem conhecido que o consumo exacerbado de sódio na dieta está relacionado com o aumento da pressão arterial (Osborn, Fink et al. 2007), assim como foi demonstrado na correlação positiva entre o consumo de salina hipertônica 1,8% NaCl e o aumento de PA em ratos SD bebedores. Estudos utilizando o modelo HS12W demonstraram que a ingestão crônica de 0,9% de Na⁺ pós desmame induz quadro de hipertensão sódio-dependente (Gomes, Sa et al. 2017). Além disso, o mesmo estudo demonstrou que a ingestão elevada de sódio promove aumento do drive simpático vascular (Gomes, Sa et al. 2017) o que poderia explicar o aumento de PA. Outro modelo utilizado para avaliar hipertensão sódio-dependente é o uso de salina hipertônica 1,8% NaCl. Esse modelo conta com a elevação plasmática de sódio

ocasionada pela ingestão de salina, produzindo hiperosmolaridade, levando ao aumento de liberação de vasopressina e simpatoexcitação, sucedendo o quadro de hipertensão (Antunes, Yao et al. 2006, Ribeiro, Martins Sá et al. 2020).

Outro estímulo para avaliar o apetite ao sódio foi realizado por meio do protocolo de privação hídrica. Como já era de se esperar, os animais provenientes da ração SD apresentaram um aumento na ingestão de salina 1,8% NaCl. McKinley em 1983 já havia demonstrado que o aumento do consumo de sódio pode ser ocasionado pela desidratação (McKinley, Denton et al. 1983). Foi observado que uma das possíveis causas responsáveis por desencadear esse aumento do apetite ao sódio, era devido a perda de Na⁺ no volume urinário, além disso outra possível razão para desencadear a busca por sódio em modelos de privação hídrica seria o aumento da ingestão de água na reidratação (De Luca, Xu et al. 2002).

Curiosamente, não foi observado o aumento do apetite ao sódio em animais que consumiram uma dieta com sobrecarga de sódio. Entretanto, de acordo com dados encontrados na literatura, ratos Sprague-Dawley que tiveram acesso a salina 0,5 M durante o período 10 dias antes do protocolo de privação hídrica, apresentaram uma redução na excreção de Na⁺ quando comparados aos animais não suplementados com salina (Weisinger, Denton et al. 1985). Mesmo tendo reduzido a concentração de sódio excretado, esses animais desenvolveram a busca por Na⁺ (Weisinger, Denton et al. 1985). Dados obtidos por Weisinger podem vir a explicar o motivo pelo qual os ratos HS não realizaram a ingestão de salina pós privação. Ao realizar as dosagens de concentração de sódio na urina, Weisinger observou que, após a oferta de água, os animais reterão mais sódio (Weisinger, Denton et al. 1985), o que poderia explicar o fato de os animais HS não consumirem salina 1,8% NaCl.

O protocolo de privação hídrica está relacionado com o aumento da osmolaridade e da concentração de sódio presente no LCR. Este efeito sugere que após a privação ocorra a ativação do mecanismo da sede acionado para corrigir essas alterações na osmolaridade (Chodobski, Szmydynger-Chodobska et al. 1998, De Luca, Xu et al. 2002, De Luca, Pereira-Derderian et al. 2010). A possível ativação do mecanismo de sede ocasionado pela privação hídrica pode justificar a redução do consumo da dieta dos animais HS. A restauração da alimentação dos animais pela ração ou a busca de sódio provenientes das buretas de salina hipertônica após o

período de reidratação, pode estar relacionada com o aumento da renina, aldosterona e angiotensina plasmática (De Luca, Xu et al. 2002).

Como esperado, após o período de reidratação foi observado uma possível redução da expressão de c-Fos nos neurônios do PVN durante o protocolo de privação hídrica. As projeções eferentes derivadas dos neurônios magnocelulares do PVN, estão correlacionadas com o aumento da retenção hídrica ocasionada pela elevação da concentração de AVP plasmática em quadro de privação hídrica (Verney 1947, Dos-Santos, Monteiro et al. 2017).

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho, demonstram que dieta contendo 0,9% de Na^+ promovem aumento no volume de ingestão de água e conseqüentemente aumento no volume urinário. Além disso observamos uma não sensibilização a ingestão de sódio, quando foi realizado a substituição da ração HS para SD. Ou seja, a ingestão crônica de sódio durante 12 semanas neste modelo experimental não desencadeou apetite ao sódio nesses animais. Entretanto, a troca da ração HS para SD, permitiu definir duas populações distintas entre os grupos HS e SD, sendo classificados como bebedores e não bebedores de salina 1,8% NaCl.

Ademais os ratos HS não ingeriram salina hipertônica após o protocolo de privação hídrica, que pode estar correlacionado com uma possível redução na ativação de neurônios do PVN.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. M., C. J. Madden, A. F. Sved and S. D. Stocker (2007). "Increased dietary salt enhances sympathoexcitatory and sympathoinhibitory responses from the rostral ventrolateral medulla." Hypertension **50**(2): 354-359.
- Adams, J. M., J. J. McCarthy and S. D. Stocker (2008). "Excess dietary salt alters angiotensinergic regulation of neurons in the rostral ventrolateral medulla." Hypertension **52**(5): 932-937.
- Alderman, M. H. (2000). "Salt, Blood Pressure, and Human Health." Hypertension **36**(5): 890-893.
- Anesio, A., S. P. Barbosa, L. A. De Luca, Jr., P. M. de Paula, D. S. A. Colombari, E. Colombari, C. A. F. Andrade and J. V. Menani (2019). "Central muscarinic and LPBN mechanisms on sodium intake." Brain Res Bull **144**: 14-20.
- Antunes, V. R., S. T. Yao, A. E. Pickering, D. Murphy and J. F. Paton (2006). "A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation." J Physiol **576**(Pt 2): 569-583.
- Antunes, V. R., S. T. Yao, A. E. Pickering, D. Murphy and J. F. R. Paton (2006). "A spinal vasopressinergic mechanism mediates hyperosmolality-induced sympathoexcitation." The Journal of Physiology **576**(2): 569-583.
- Appel, L. J., C. M. Champagne, D. W. Harsha, L. S. Cooper, E. Obarzanek, P. J. Elmer, V. J. Stevens, W. M. Vollmer, P. H. Lin, L. P. Svetkey, S. W. Stedman and D. R. Young (2003). "Effects of comprehensive lifestyle modification on blood pressure control: main results of the PREMIER clinical trial." Jama **289**(16): 2083-2093.
- Augustine, V., S. Lee and Y. Oka (2020). "Neural Control and Modulation of Thirst, Sodium Appetite, and Hunger." Cell **180**(1): 25-32.
- Averina, V. A., H. G. Othmer, G. D. Fink and J. W. Osborn (2012). "A new conceptual paradigm for the haemodynamics of salt-sensitive hypertension: a mathematical modelling approach." J Physiol **590**(23): 5975-5992.
- Barney, C. C., R. M. Threatte and M. J. Fregly (1983). "Water deprivation-induced drinking in rats: role of angiotensin II." **244**(2): R244-R248.
- Batista, M. A. C., D. C. A. Braga, S. A. L. de Moura, G. H. B. de Souza, O. D. H. Dos Santos and L. M. Cardoso (2020). "Salt-dependent hypertension and inflammation:

targeting the gut-brain axis and the immune system with Brazilian green propolis." Inflammopharmacology **28**(5): 1163-1182.

Beltrán, A. R., A. Arce-Álvarez, R. Ramirez-Campillo, M. Vásquez-Muñoz, M. von Igel, M. A. Ramírez, R. Del Rio and D. C. Andrade (2020). "Baroreflex Modulation During Acute High-Altitude Exposure in Rats." Front Physiol **11**: 1049.

Bourque, C. W. (2008). "Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation." Nat Rev Neurosci **9**(7): 519-531.

Bourque, C. W. (2008). "Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation." Nature Reviews Neuroscience **9**(7): 519-531.

Bourque, C. W., S. Ciura, E. Trudel, T. J. E. Stachniak and R. Sharif-Naeini (2007). "Neurophysiological characterization of mammalian osmosensitive neurones." Experimental Physiology **92**(3): 499-505.

Bourque, C. W., S. H. Oliet and D. Richard (1994). "Osmoreceptors, osmoreception, and osmoregulation." Front Neuroendocrinol **15**(3): 231-274.

Braun, M. M. and M. Mahowald (2017). "Electrolytes: Sodium Disorders." FP Essent **459**: 11-20.

Cappuccio, F. P. (2013). "Cardiovascular and other effects of salt consumption." Kidney Int Suppl (2011) **3**(4): 312-315.

Carney, E. F. (2016). "Hypertension: Regulation of salt appetite and blood pressure." Nat Rev Nephrol **12**(5): 258.

Chodobski, A., J. Szmydynger-Chodobska and M. J. McKinley (1998). "Cerebrospinal fluid formation and absorption in dehydrated sheep." American Journal of Physiology-Renal Physiology **275**(2): F235-F238.

Crowley, S. D. and A. D. Jeffs (2016). "Targeting cytokine signaling in salt-sensitive hypertension." Am J Physiol Renal Physiol **311**(6): F1153-f1158.

Dahl, L. K. and M. Heine (1961). "Effects of chronic excess salt feeding. Enhanced hypertensogenic effect of sea salt over sodium chloride." J Exp Med **113**(6): 1067-1076.

Dahl, L. K., M. Heine and L. Tassinari (1962). "Effects of chronic excess salt ingestion. Evidence that genetic factors play an important role in susceptibility to experimental hypertension." J Exp Med **115**(6): 1173-1190.

- De Lorenzo, F., J. Hargreaves and V. V. Kakkar (1997). "Pathogenesis and management of delayed orthostatic hypotension in patients with chronic fatigue syndrome." Clin Auton Res **7**(4): 185-190.
- De Luca, L. A., Jr., D. T. Pereira-Derderian, R. C. Vendramini, R. B. David and J. V. Menani (2010). "Water deprivation-induced sodium appetite." Physiol Behav **100**(5): 535-544.
- De Luca, L. A., Jr., A. M. Sugawara and J. V. Menani (2000). "Brain versus peripheral angiotensin II receptors in hypovolaemia: behavioural and cardiovascular implications." Clin Exp Pharmacol Physiol **27**(5-6): 437-442.
- De Luca, L. A., Jr., Z. Xu, G. H. Schoorlemmer, R. L. Thunhorst, T. G. Beltz, J. V. Menani and A. K. Johnson (2002). "Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **282**(2): R552-559.
- DeLalio, L. J., A. F. Sved and S. D. Stocker (2020). "Sympathetic Nervous System Contributions to Hypertension: Updates and Therapeutic Relevance." The Canadian journal of cardiology **36**(5): 712-720.
- Dos-Santos, R. C., L. D. R. N. Monteiro, B. Paes-Leme, D. Lustrino, J. Antunes-Rodrigues, A. S. Mecawi and L. C. Reis (2017). "Central angiotensin-(1-7) increases osmotic thirst." Experimental Physiology **102**(11): 1397-1404.
- Elfont, R. M., A. N. Epstein and J. T. Fitzsimons (1984). "Involvement of the renin-angiotensin system in captopril-induced sodium appetite in the rat." J Physiol **354**(1): 11-27.
- Emmeluth, C., K. L. Goetz, C. Drummer, R. Gerzer, W. G. Forssmann and P. Bie (1996). "Natriuresis caused by increased carotid Na⁺ concentration after renal denervation." Am J Physiol **270**(3 Pt 2): F510-517.
- Evans, L. C., J. R. Ivy, C. Wyrwoll, J. A. McNairn, R. I. Menzies, T. H. Christensen, E. A. Al-Dujaili, C. J. Kenyon, J. J. Mullins, J. R. Seckl, M. C. Holmes and M. A. Bailey (2016). "Conditional Deletion of Hsd11b2 in the Brain Causes Salt Appetite and Hypertension." Circulation **133**(14): 1360-1370.
- Evans, L. C., J. R. Ivy, C. Wyrwoll, J. A. McNairn, R. I. Menzies, T. H. Christensen, E. A. S. Al-Dujaili, C. J. Kenyon, J. J. Mullins, J. R. Seckl, M. C. Holmes and M. A. Bailey (2016). "Conditional Deletion of Hsd11b2 in the Brain Causes Salt Appetite and Hypertension." Circulation **133**(14): 1360-1370.

Farag, E., D. I. Sessler, Z. Ebrahim, A. Kurz, J. Morgan, S. Ahuja, K. Maheshwari and D. John Doyle (2017). "The renin angiotensin system and the brain: New developments." J Clin Neurosci **46**: 1-8.

Ferguson, A. V. (2014). *Frontiers in Neuroscience*

Circumventricular Organs: Integrators of Circulating Signals Controlling Hydration, Energy Balance, and Immune Function. Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration. L. A. De Luca, Jr., J. V. Menani and A. K. Johnson. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis

© 2014 by Taylor & Francis Group, LLC.

Fitts, D. A. and D. B. Masson (1989). "Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril." Behav Neurosci **103**(4): 865-872.

Fitzsimons, J. T. and J. B. Wirth (1978). "The renin-angiotensin system and sodium appetite." The Journal of Physiology **274**(1): 63-80.

Fletcher, P. J., J. A. Angus, J. R. Oliver and P. I. Korner (1975). "Cardiac output changes during the development of experimental renal hypertension." Clin Exp Pharmacol Physiol Suppl **2**: 145-148.

Fortin, S. M. and M. F. Roitman (2018). "Challenges to Body Fluid Homeostasis Differentially Recruit Phasic Dopamine Signaling in a Taste-Selective Manner." J Neurosci **38**(31): 6841-6853.

Freeman, S. A., A. Desmazières, D. Fricker, C. Lubetzki and N. Sol-Foulon (2016). "Mechanisms of sodium channel clustering and its influence on axonal impulse conduction." Cell Mol Life Sci **73**(4): 723-735.

Fregly, M. J. and N. E. Rowland (1985). "Role of renin-angiotensin-aldosterone system in NaCl appetite of rats." Am J Physiol **248**(1 Pt 2): R1-11.

Friedman, S. M. (1991). "Salt sensitivity and cell permeability." J Hypertens **9**(9): 789-798.

Funder, J. W. (2017). "Aldosterone and Mineralocorticoid Receptors-Physiology and Pathophysiology." Int J Mol Sci **18**(5).

Gasparini, S., M. R. Melo, P. A. Nascimento, G. M. F. Andrade-Franzé, J. Antunes-Rodrigues, G. L. C. Yosten, J. V. Menani, W. K. Samson and E. Colombari (2019). "Interaction of central angiotensin II and aldosterone on sodium intake and blood pressure." Brain Res **1720**: 146299.

- Geerling, J. C. and A. D. Loewy (2008). "Central regulation of sodium appetite." Exp Physiol **93**(2): 177-209.
- Giles, T., B. Materson, J. Cohn and J. Kostis (2009). "Definition and Classification of Hypertension: An Update." Journal of clinical hypertension (Greenwich, Conn.) **11**: 611-614.
- Gomes, P. M., R. W. M. Sa, G. L. Aguiar, M. H. S. Paes, A. C. Alzamora, W. G. Lima, L. B. de Oliveira, S. D. Stocker, V. R. Antunes and L. M. Cardoso (2017). "Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats." Sci Rep **7**(1): 5655.
- Gomes, P. M., R. W. M. Sá, G. L. Aguiar, M. H. S. Paes, A. C. Alzamora, W. G. Lima, L. B. de Oliveira, S. D. Stocker, V. R. Antunes and L. M. Cardoso (2017). "Chronic high-sodium diet intake after weaning lead to neurogenic hypertension in adult Wistar rats." Sci Rep **7**(1): 5655.
- Grassi, G., A. Mark and M. Esler (2015). "The sympathetic nervous system alterations in human hypertension." Circ Res **116**(6): 976-990.
- Grippe, A. J., J. A. Moffitt, T. G. Beltz and A. K. Johnson (2006). "Reduced hedonic behavior and altered cardiovascular function induced by mild sodium depletion in rats." Behav Neurosci **120**(5): 1133-1143.
- Grondin, M. E., A. Gobeil-Simard, G. Drolet and D. Mougnot (2011). "Na⁺ appetite induced by depleting extracellular fluid volume activates the enkephalin/mu-opioid receptor system in the rat forebrain." Neuroscience **192**: 398-412.
- Guillaumin, J. and S. P. DiBartola (2017). "Disorders of Sodium and Water Homeostasis." Vet Clin North Am Small Anim Pract **47**(2): 293-312.
- Guyenet, P. G. (2017). "Putative Mechanism of Salt-Dependent Neurogenic Hypertension: Cell-Autonomous Activation of Organum Vasculosum Laminae Terminalis Neurons by Hypernatremia." Hypertension **69**(1): 20-22.
- Ha, S. K. (2014). "Dietary salt intake and hypertension." Electrolyte Blood Press **12**(1): 7-18.
- Haddy, F. J. (1991). "Roles of sodium, potassium, calcium, and natriuretic factors in hypertension." Hypertension **18**(5 Suppl): lli179-183.
- Harrington, M. G., R. M. Salomon, J. M. Pogoda, E. Oborina, N. Okey, B. Johnson, D. Schmidt, A. N. Fonteh and N. F. Dalleska (2010). "Cerebrospinal fluid sodium rhythms." Cerebrospinal Fluid Res **7**: 3.

He, F. J., S. Fan, G. A. Macgregor and M. M. Yaqoob (2013). "Plasma sodium and blood pressure in individuals on haemodialysis." Journal of Human Hypertension **27**(2): 85-89.

Hendel, M. D. and J. P. Collister (2005). "Sodium balance, arterial pressure, and the role of the subfornical organ during chronic changes in dietary salt." Am J Physiol Heart Circ Physiol **289**(1): H426-431.

Hosohata, K., D. Yoshioka, A. Tanaka, H. Ando and A. Fujimura (2016). "Early urinary biomarkers for renal tubular damage in spontaneously hypertensive rats on a high salt intake." Hypertens Res **39**(1): 19-26.

Huang, B. S., B. N. Van Vliet and F. H. Leenen (2004). "Increases in CSF [Na⁺] precede the increases in blood pressure in Dahl S rats and SHR on a high-salt diet." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(3): H1160-1166.

Hurley, S. W. and A. K. Johnson (2015). "The biopsychology of salt hunger and sodium deficiency." Pflugers Arch **467**(3): 445-456.

Jalowiec, J. E., J. E. Crapanzano and E. M. Stricker (1966). "Specificity of salt appetite elicited by hypovolemia." Psychonomic Science **6**(7): 331-332.

Jin, Y., T. Kuznetsova, M. Maillard, T. Richart, L. Thijs, M. Bochud, M. C. Herregods, M. Burnier, R. Fagard and J. A. Staessen (2009). "Independent relations of left ventricular structure with the 24-hour urinary excretion of sodium and aldosterone." Hypertension **54**(3): 489-495.

Johnson, A. K. and A. J. Grippo (2006). "Sadness and broken hearts: neurohumoral mechanisms and co-morbidity of ischemic heart disease and psychological depression." Journal of physiology and pharmacology : an official journal of the Polish Physiological Society **57 Suppl 11**: 5-29.

Kinsman, B. J., H. N. Nation and S. D. Stocker (2017). "Hypothalamic Signaling in Body Fluid Homeostasis and Hypertension." Curr Hypertens Rep **19**(6): 50.

Kjolby, M. J., E. Kompanowska-Jeziarska, S. Wamberg and P. Bie (2005). "Effects of sodium intake on plasma potassium and renin angiotensin aldosterone system in conscious dogs." Acta Physiologica Scandinavica **184**(3): 225-234.

Korner, P. I., J. R. Oliver, P. Sleight, J. S. Robinson and J. P. Chalmers (1975). "Assessment of cardiac autonomic excitability in renal hypertensive rabbits using clonidine-induced resetting of the baroreceptor-heart rate reflex." **33**(2): 353-362.

- Kupari, M., P. Koskinen and J. Virolainen (1994). "Correlates of left ventricular mass in a population sample aged 36 to 37 years. Focus on lifestyle and salt intake." Circulation **89**(3): 1041-1050.
- Leenen, F. H. H., H. W. Wang and J. M. Hamlyn (2020). "Sodium pumps, ouabain and aldosterone in the brain: A neuromodulatory pathway underlying salt-sensitive hypertension and heart failure." Cell Calcium **86**: 102151.
- Leshem, M. (2009). "Biobehavior of the human love of salt." Neurosci Biobehav Rev **33**(1): 1-17.
- Leshem, M. (2011). "Low dietary sodium is anxiogenic in rats." Physiology & Behavior **103**(5): 453-458.
- Leshem, M. (2011). "Low dietary sodium is anxiogenic in rats." Physiol Behav **103**(5): 453-458.
- Leshem, M. (2020). "Salt need needs investigation." Br J Nutr **123**(11): 1312-1320.
- Liu, Y., C. Yang, X. Feng, L. Qi, J. Guo, D. Zhu, P. N. Thai, Y. Zhang, P. Zhang, M. Sun, J. Lv, L. Zhang, Z. Xu and X. Lu (2020). "Prenatal High-Salt Diet-Induced Metabolic Disorders via Decreasing Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1 α in Adult Male Rat Offspring." Mol Nutr Food Res **64**(14): e2000196.
- Lucera, G. M., J. V. Menani, E. Colombari and D. S. A. Colombari (2021). "ANG II and Aldosterone Acting Centrally Participate in the Enhanced Sodium Intake in Water-Deprived Renovascular Hypertensive Rats." Front Pharmacol **12**: 679985.
- Luz, P. A., L. Andrade, N. Miranda, V. Pereira, J. Fregoneze and E. De Castro E Silva (2006). "Inhibition of water intake by the central administration of IL-1 β in rats: Role of the central opioid system." Neuropeptides **40**(2): 85-94.
- McEwen, B. S., L. T. Lambdin, T. C. Rainbow and A. F. De Nicola (1986). "Aldosterone Effects on Salt Appetite in Adrenalectomized Rats." Neuroendocrinology **43**(1): 38-43.
- McKinley, M. J. (2013). "Adaptive appetites for salted and unsalted food in rats: differential effects of sodium depletion, DOCA, and dehydration." American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology **304**(12): R1149-R1160.
- McKinley, M. J., A. L. Albiston, A. M. Allen, M. L. Mathai, C. N. May, R. M. McAllen, B. J. Oldfield, F. A. Mendelsohn and S. Y. Chai (2003). "The brain renin-angiotensin system: location and physiological roles." Int J Biochem Cell Biol **35**(6): 901-918.

McKinley, M. J., D. A. Denton, J. F. Nelson and R. S. Weisinger (1983). "Dehydration induces sodium depletion in rats, rabbits, and sheep." Am J Physiol **245**(2): R287-292.

McKinley, M. J., R. Gerstberger, M. L. Mathai, B. J. Oldfield and H. Schmid (1999). "The lamina terminalis and its role in fluid and electrolyte homeostasis." J Clin Neurosci **6**(4): 289-301.

McKinley, M. J., B. Lichardus, J. G. McDougall and R. S. Weisinger (1992). "Periventricular lesions block natriuresis to hypertonic but not isotonic NaCl loads." Am J Physiol **262**(1 Pt 2): F98-107.

McKinley, M. J., R. M. McAllen, P. Davern, M. E. Giles, J. Penschow, N. Sunn, A. Uschakov and B. J. Oldfield (2003). "The sensory circumventricular organs of the mammalian brain." Adv Anat Embryol Cell Biol **172**: III-XII, 1-122, back cover.

Mimee, A., P. M. Smith and A. V. Ferguson (2013). "Circumventricular organs: targets for integration of circulating fluid and energy balance signals?" Physiol Behav **121**: 96-102.

Morris, M. J., E. S. Na and A. K. Johnson (2008). "Salt craving: the psychobiology of pathogenic sodium intake." Physiol Behav **94**(5): 709-721.

Muhsin, S. A. and D. B. Mount (2016). "Diagnosis and treatment of hypernatremia." Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism **30**(2): 189-203.

Noda, M. and H. Sakuta (2013). "Central regulation of body-fluid homeostasis." Trends Neurosci **36**(11): 661-673.

Ogihara, C. A., G. H. Schoorlemmer, E. Colombari and M. A. Sato (2009). "Changes in sodium appetite evoked by lesions of the commissural nucleus of the tractus solitarius." Braz J Med Biol Res **42**(6): 561-566.

Okamoto, K. and K. Aoki (1963). "Development of a strain of spontaneously hypertensive rats." Jpn Circ J **27**: 282-293.

Osborn, J. W., G. D. Fink, A. F. Sved, G. M. Toney and M. K. Raizada (2007). "Circulating angiotensin II and dietary salt: converging signals for neurogenic hypertension." Curr Hypertens Rep **9**(3): 228-235.

Osborn, J. W. and B. J. Provo (1992). "Salt-dependent hypertension in the sinoaortic-denervated rat." Hypertension **19**(6 Pt 2): 658-662.

Patel, S., A. Rauf, H. Khan and T. Abu-Izneid (2017). "Renin-angiotensin-aldosterone (RAAS): The ubiquitous system for homeostasis and pathologies." Biomed Pharmacother **94**: 317-325.

Pereira, D. T., J. V. Menani and L. A. De Luca, Jr. (2010). "FURO/CAP: a protocol for sodium intake sensitization." Physiol Behav **99**(4): 472-481.

Ployngam, T., S. S. Katz and J. P. Collister (2012). "Role of the Median Preoptic Nucleus in Arterial Pressure Regulation and Sodium and Water Homeostasis during High Dietary Salt Intake." Neurophysiology **44**(5): 363-375.

Pollock, J. S., M. J. Ryan, W. K. Samson and D. P. Brooks (2014). "Water and electrolyte homeostasis brings balance to physiology." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol **307**(5): R481-483.

Porcari, C. Y., L. K. Debarba, J. L. Amigone, X. E. Caeiro, L. C. Reis, T. M. Cunha, A. S. Mecawi, L. L. Elias, J. Antunes-Rodrigues, L. Vivas and A. Godino (2020). "Brain osmo-sodium sensitive channels and the onset of sodium appetite." Horm Behav **118**: 104658.

Puri, S. and Y. Lee (2021). "Salt Sensation and Regulation." Metabolites **11**(3).

Rakova, N., K. Kitada, K. Lerchl, A. Dahlmann, A. Birukov, S. Daub, C. Kopp, T. Pedchenko, Y. Zhang, L. Beck, B. Johannes, A. Marton, D. N. Müller, M. Rauh, F. C. Luft and J. Titze (2017). "Increased salt consumption induces body water conservation and decreases fluid intake." J Clin Invest **127**(5): 1932-1943.

Rapoport, R. M. (1993). "Regulation of vascular smooth muscle contraction by extracellular Na⁺." Gen Pharmacol **24**(3): 531-537.

Rasouli, M. (2016). "Basic concepts and practical equations on osmolality: Biochemical approach." Clin Biochem **49**(12): 936-941.

Ribeiro, N., R. W. Martins Sá and V. R. Antunes (2020). "Depletion of C1 neurons attenuates the salt-induced hypertension in unanesthetized rats." Brain Res **1748**: 147107.

Rodrigues, S. L., P. R. Souza Júnior, E. B. Pimentel, M. P. Baldo, D. C. Malta, J. G. Mill and C. L. Szwarcwald (2015). "Relationship between salt consumption measured by 24-h urine collection and blood pressure in the adult population of Vitória (Brazil)." Brazilian Journal of Medical and Biological Research **48**(8): 728-735.

Sakai, R. R., S. P. Frankmann, W. B. Fine and A. N. Epstein (1989). "Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake of the rat." Behav Neurosci **103**(1): 186-192.

Santos, P., J. Krieger and A. Pereira (2012). "Renin Angiotensin System, Hypertension; and Chronic Kidney Disease: Pharmacogenetic Implications." Journal of pharmacological sciences **120**: 77-88.

Seay, N. W., R. W. Lehrich and A. Greenberg (2020). "Diagnosis and Management of Disorders of Body Tonicity-Hyponatremia and Hypernatremia: Core Curriculum 2020." Am J Kidney Dis **75**(2): 272-286.

Silveira, S. A., A. S. Haibara and C. C. Coimbra (2005). "Hyperglycemic response to hemorrhage is modulated by baroreceptors unloading but not by peripheral chemoreceptors activation." Auton Neurosci **123**(1-2): 36-43.

Smith, C. M. and A. J. Lawrence (2018). "Salt Appetite, and the Influence of Opioids." Neurochem Res **43**(1): 12-18.

Stanhewicz, A. E. and W. L. Kenney (2015). "Determinants of water and sodium intake and output." Nutr Rev **73 Suppl 2**: 73-82.

Stocker, S. D., K. D. Monahan and K. N. Browning (2013). "Neurogenic and sympathoexcitatory actions of NaCl in hypertension." Curr Hypertens Rep **15**(6): 538-546.

Stocker, S. D., J. L. Osborn and S. P. Carmichael (2008). "Forebrain osmotic regulation of the sympathetic nervous system." Clin Exp Pharmacol Physiol **35**(5-6): 695-700.

Stricker, E. M., K. S. Gannon and J. C. Smith (1992). "Thirst and salt appetite induced by hypovolemia in rats: Analysis of drinking behavior." Physiology & Behavior **51**(1): 27-37.

Stricker, E. M. and J. G. Verbalis (1996). "Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats." Regul Pept **66**(1-2): 83-85.

Thornton, S. N., S. T. Omouessi and C. Falconetti (2007). "Mineralocorticoid modulation of central angiotensin-induced neuronal activity, water intake and sodium appetite." Braz J Med Biol Res **40**(5): 699-705.

Thunhorst, R. L., S. J. Lewis and A. K. Johnson (1994). "Effects of sinoaortic baroreceptor denervation on depletion-induced salt appetite." Am J Physiol **267**(4 Pt 2): R1043-1049.

Toney, G. M. and S. D. Stocker (2010). "Hyperosmotic activation of CNS sympathetic drive: implications for cardiovascular disease." J Physiol **588**(Pt 18): 3375-3384.

Ueda, Y. and K. Hopper (2019). Sodium and Water Balance.

Verney, E. B. (1947). "The antidiuretic hormone and the factors which determine its release." Proc R Soc Lond B Biol Sci **135**(878): 25-106.

Vivas, L., A. Godino, C. Dalmaso, X. E. Caeiro, A. F. Macchione and M. J. Cambiasso (2014). *Frontiers in Neuroscience*

Neurochemical Circuits Subservicing Fluid Balance and Baroreflex: A Role for Serotonin, Oxytocin, and Gonadal Steroids. Neurobiology of Body Fluid Homeostasis: Transduction and Integration. L. A. De Luca, Jr., J. V. Menani and A. K. Johnson. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis

© 2014 by Taylor & Francis Group, LLC.

WARHOL, R. M., A. EICHENHOLZ and R. O. MULHAUSEN (1965). "Osmolality." Archives of Internal Medicine **116**(5): 743-749.

Weisinger, R. S., D. A. Denton, M. J. McKinley and J. F. Nelson (1985). "Dehydration-induced sodium appetite in rats." Physiology & Behavior **34**(1): 45-50.

Weismann, D., A. Schneider and C. Höybye (2016). "Clinical aspects of symptomatic hyponatremia." Endocrine Connections **5**(5): R35-R43.

Wolf, G. and E. M. Stricker (1967). "Sodium appetite elicited by hypovolemia in adrenalectomized rats: reevaluation of the "reservoir" hypothesis." J Comp Physiol Psychol **63**(2): 252-257.

Wright, J. W. and J. W. Harding (2013). "The brain renin-angiotensin system: a diversity of functions and implications for CNS diseases." Pflugers Arch **465**(1): 133-151.

Yeomans, M. R., J. E. Blundell and M. Leshem (2004). "Palatability: response to nutritional need or need-free stimulation of appetite?" British Journal of Nutrition **92**(S1): S3-S14.

ANEXOS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do apetite a sódio e sacarose e da sede induzida por privação hídrica em ratos sob dieta com sobrecarga de sódio a partir do desmame. ", protocolada sob o CEUA nº 3994070520 (ID 000414), sob a responsabilidade de **Leonardo Máximo Cardoso e equipe; Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas ; Marcos Adriano Carlos Batista; Daiane Cristina de Assis Braga** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (CEUA/UFOP) na reunião de 13/07/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of sodium and sucrose appetite and thirst induced by water deprivation in rats fed high sodium diet from weaning.", utilizing 269 Heterogenics rats (269 males), protocol number CEUA 3994070520 (ID 000414), under the responsibility of **Leonardo Máximo Cardoso and team; Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas ; Marcos Adriano Carlos Batista; Daiane Cristina de Assis Braga** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Ouro Preto Federal University (CEUA/UFOP) in the meeting of 07/13/2020.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **06/2020 a 03/2021** Área: **Ciências Biológicas**

Origem: **Centro de Ciência Animal**

Espécie: **Ratos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **21 a 21 dias**

N: **269**

Linhagem: **Wistar**

Peso: **45 a 55 g**

Local do experimento: **Laboratório de Fisiologia Endócrina e Cardiovascular ICEB II, sala 46.**

Ouro Preto, 13 de julho de 2020



Prof. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



Prof. Dr. Leonardo Máximo Cardoso
Vice-Coodenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Ouro Preto



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Pró-reitoria de Graduação
Pró-reitoria de Extensão

Certificamos que **FLAVIO EDUARDO DIAS ARAÚJO FREITAS** participou do ENCONTRO DE SABERES da UFOP, a se realizar de 05 a 07 de novembro, na qualidade de REVISOR DE TRABALHOS submetidos ao evento.

Ouro Preto, 28 de agosto de 2019


Autenticidade



Código: 15670052135d669a1dd3dfb


Prof. Marcos Eduardo Carneiro G. Kinupp
Pró-Reitor de Extensão


Prof. Dra. Tânia Rossi Garbin
Pró-Reitora de Graduação


Renata Guerra de Sá Cota
Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa e Pós-Graduação

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Pró-Reitoria de Graduação
Pró-Reitoria de Extensão
Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários e Estudantis
Coordenadoria de Assuntos Internacionais

Certificamos que **FLAVIO EDUARDO DIAS ARAÚJO FREITAS** participou do ENCONTRO DE SABERES da UFOP na qualidade de REVISOR DE TRABALHOS submetidos ao evento.

Ouro Preto, 19 de setembro de 2020

Prof.^a Renata Guerra de Sá Cota
Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof.^a Tânia Rossi Garbin
Pró-Reitora de Graduação

Prof. Marcos Eduardo Knupp
Pró-Reitor de Extensão
Código: 16005406015f0695061e9858

Autenticidade



Prof.^a Natália de Souza Libório
Pró-Reitora de Assuntos Comunitários e Estudantis

Jaqueline Pinheiro Schultz
Coordenadora de Assuntos Internacionais

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Pró-Reitoria de Graduação
Pró-Reitoria de Extensão
Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários e Estudantis
Coordenadoria de Assuntos Internacionais

Certificamos que o trabalho **AValiação Comparativa dos Componentes Fitoquímicos em Extratos Secos de Psidium Guajava Lin. obtidos por secagem em banho-maria ou por aspersão (spray drying)**, de autoria de **MARINA GONCALVES CAETANO DE ANDRADE, LEONARDO MAXIMO CARDOSO, DAIANE CRISTINA DE ASSIS BRAGA, MARCOS ADRIANO CARLOS BATISTA, FLAVIO EDUARDO DIAS ARAUJO FREITAS, JAQUELINE APARECIDA DE SOUZA, GUSTAVO HENRIQUE BLANCO DE SOUZA, ANDREIA CARVALHO ALZAMORA e LISANDRA BRANDINO DE OLIVEIRA**, foi apresentado no XXVIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, realizado de 30 de Novembro a 04 de Dezembro de 2020.

Ouro Preto, 04 de Dezembro de 2020.

Prof.^a Renata Guerra de Sá Cota
Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Prof.^a Tânia Rossi Garbin
Pró-Reitora de Graduação

Prof. Marcos Eduardo Carvalho G. Knupp
Pró-Reitor de Extensão

Autenticidade



Código: 16083149565f04cd8406

Prof.^a Natália de Souza Libório
Pró-Reitora de Assuntos Comunitários e Estudantis

Jaqueline Pinheiro Schultz
Coordenadora de Assuntos Internacionais

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Pró-Reitoria de Graduação
Pró-Reitoria de Extensão
Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários e Estudantis
Coordenadoria de Assuntos Internacionais

Certificamos que o trabalho **AVALIAÇÃO DO APETITE AO SÓDIO E DA SEDE INDUZIDA POR PRIVAÇÃO HÍDRICA EM RATOS WISTAR SOB DIETA COM SOBRECARGA DE SÓDIO A PARTIR DO DESMAME.**, de autoria de **FLAVIO EDUARDO DIAS ARAÚJO FREITAS, MARCOS ADRIANO CARLOS BATISTA, DAIANE CRISTINA DE ASSIS BRAGA, LISANDRA BRANDINO DE OLIVEIRA, ANDRÉIA CARVALHO ALZAMORA e LEONARDO MÁXIMO CARDOSO**, foi apresentado no **V MOSTRA DA PÓS-GRADUAÇÃO do ENCONTRO DE SABERES – UFOP**, realizado de **30 de Novembro a 04 de Dezembro de 2020**.

Ouro Preto, 04 de Dezembro de 2020.

Autenticidade



Código: 16083149675f4cf057dbf58

Ronaldo Guerra de Sá Costa
Prof. Ronaldo Guerra de Sá Costa
Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Tânia Rossi Garbin
Prof.ª Tânia Rossi Garbin
Pró-Reitora de Graduação

Marcos Knapp
Prof. Marcos Eduardo Carvalho G. Knapp
Pró-Reitor de Extensão

Natália de Souza Lisboa
Prof.ª Natália de Souza Lisboa
Pró-Reitora de Assuntos Comunitários e Estudantis

Jaqueline Pinheiro Schultz
Jaqueline Pinheiro Schultz
Coordenadora de Assuntos Internacionais

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados



República Federativa do Brasil
Ministério da Educação
Universidade Federal de Ouro Preto
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Pró-Reitoria de Graduação
Pró-Reitoria de Extensão
Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários e Estudantis
Coordenadoria de Assuntos Internacionais

Certificamos que o trabalho **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-HIPERTENSIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO DE UMA FORMULAÇÃO A BASE DE EXTRATO DE BACCHARIS DRACUNCULIFOLIA EM RATOS WISTAR COM SOBRECARGA DE SÓDIO**, de autoria de **MARCOS ADRIANO CARLOS BATISTA, LISANDRA BRANDINO DE OLIVEIRA-COLABORADORA, ANDRÉIA CARVALHO ALZAMORA, GUSTAVO HENRIQUE BIANCO DE SOUZA, ORLANDO DAVID HENRIQUE DOS SANTOS, SANDRA APARECIDA LIMA DE MOURA, FLAVIO EDUARDO DIAS ARAUJO FREITAS, MARINA GONÇALVES CAETANO DE ANDRADE, DAIANE.CRISTINA19@HOTMAIL.COM e LEONARDO MÁXIMO CARDOSO**, foi apresentado no **V MOSTRA DA PÓS-GRADUAÇÃO do ENCONTRO DE SABERES – UFOP**, realizado de **30 de Novembro a 04 de Dezembro de 2020**.

Ouro Preto, 04 de Dezembro de 2020.

Autenticidade



Código: 16083149705f4cf05af3f7c

Ronaldo Guerra de Sá Costa
Prof. Ronaldo Guerra de Sá Costa
Pró-Reitor Adjunto de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Tânia Rossi Garbin
Prof.ª Tânia Rossi Garbin
Pró-Reitora de Graduação

Marcos Knapp
Prof. Marcos Eduardo Carvalho G. Knapp
Pró-Reitor de Extensão

Natália de Souza Lisboa
Prof.ª Natália de Souza Lisboa
Pró-Reitora de Assuntos Comunitários e Estudantis

Jaqueline Pinheiro Schultz
Jaqueline Pinheiro Schultz
Coordenadora de Assuntos Internacionais

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados



República Federativa do Brasil
 Ministério da Educação
 Universidade Federal de Ouro Preto
 Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
 Pró-Reitoria de Graduação
 Pró-Reitoria de Extensão
 Pró-Reitoria de Assuntos Comunitários e Estudantis
 Coordenadoria de Assuntos Internacionais

Certificamos que o trabalho EFEITOS DO TRATAMENTO COM SUSPENSÃO A BASE DE FOLHAS DE PSIDIUM GUAJAVA L. (GOIABEIRA) POR 4 SEMANAS NA ABSORÇÃO DE SÓDIO INTESTINAL DE RATOS HS12W, de autoria de DAIANE CRISTINA DE ASSIS BRAGA, MARINA GONÇALVES CAETANO DE ANDRADE, JAQUELINE APARECIDA DE SOUZA, MARCOS ADRIANO CARLOS BATISTA, FLÁVIO EDUARDO DIAS ARAÚJO FREITAS, GUSTAVO HENRIQUE BIANCO DE SOUZA, ANDREIA CARVALHO ALZAMORA, LISANDRA BRANDINO DE OLIVEIRA e LEONARDO MÁXIMO CARDOSO, foi apresentado no V MOSTRA DA PÓS-GRADUAÇÃO do ENCONTRO DE SABERES – UFOP, realizado de 30 de Novembro a 04 de Dezembro de 2020.

Ouro Preto, 04 de Dezembro de 2020.

Autenticidade



Código: 16083149715fdcf05b6c976

Renata Guerra de Sá Cota
 Prof.ª Renata Guerra de Sá Cota
 Pró-Reitora Adjunta de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação

Tânia Rosal Garbin
 Prof.ª Tânia Rosal Garbin
 Pró-Reitora de Graduação

Marcos Knupp
 Prof. Marcos Eduardo Carvalho G. Knupp
 Pró-Reitor de Extensão

Natália de Souza Lisboa
 Prof.ª Natália de Souza Lisboa
 Pró-Reitora de Assuntos Comunitários e Estudantis

Jaqueline Pinheiro Schultz
 Jaqueline Pinheiro Schultz
 Coordenadora de Assuntos Internacionais

Este certificado foi gerado eletronicamente e sua autenticidade poderá ser atestada informando o código em www.encontrodesaberes.ufop.br/certificados



XXIV

SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLOGIA CARDIOVASCULAR

CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO

Certificamos que o trabalho intitulado **Efeito do treinamento físico (natação) sobre parâmetros hidroeletrólíticos em ratos Wistar sob dieta com sobrecarga de sódio por 22 semanas a partir do desmame**, de autoria de **Flávio E. D. A. Freitas, Jaqueline A. Souza, Paula M. Gomes, Daiane C. A. Braga, Marcos A. C. Batista, Lisandra B. Oliveira, Andreia C. Alzamora, Vagner R. Antunes, Lenice K. Becker e Leonardo M. Cardoso**, foi apresentado na forma de **Pôster**, no **XXIV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular**, realizado em **Goiânia – Goiás**, de 29 a 31 de janeiro de 2020.


 Prof. Dr. Daniel Alves Rosa
 Vice-Coordenador do Evento


 Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custodio
 Coordenador do Evento


 Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrina
 Diretor do Instituto de Ciências Biológicas


 ICB
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS


 PROEC
 PRÓ-REITORIA DE EXTENSÃO E CULTURA

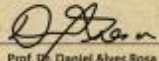

 UFOP
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS



XXIV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISIOLÓGIA CARDIOVASCULAR

CERTIFICADO DE PARTICIPAÇÃO

Certificamos que **Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas** participou do **XXIV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular**, realizado de 29 a 31 de janeiro de 2020 em Goiânia, e promovido pelo **Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás**, com carga horária total de 20 horas.



Prof. Dr. Daniel Alves Rosa
Vice-Coordenador do Evento



Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custódio
Coordenador do Evento



Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrinho
Diretor do Instituto de Ciências Biológicas

ICB
INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROEC
PROFESSORIA DE
EXTENSÃO E CULTURA



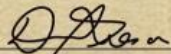
UFG
UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS



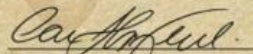
XXIV SIMPÓSIO BRASILEIRO DE FISILOGIA CARDIOVASCULAR

CERTIFICADO DE APRESENTAÇÃO

Certificamos que o trabalho intitulado **Efeito do treinamento físico (natação) sobre a pressão arterial, sódio no líquido cérebro-espinhal e volume circulante de ratos Wistar sob dieta com sobrecarga de sódio por 22 semanas a partir do desmame**, de autoria de **Jaqueline A. Souza, Paula M. Gomes, Daiane C. A. Braga, Marcos A. C. Batista, Flávio E. D. A. Freitas, Lisandra B. Oliveira, Andreia C. Alzamora, Vagner R. Antunes, Lenice K. Becker e Leonardo M. Cardoso**, foi apresentado na forma de **Apresentação Oral**, no **XXIV Simpósio Brasileiro de Fisiologia Cardiovascular**, realizado em Goiânia – Goiás, de 29 a 31 de janeiro de 2020.



Prof. Dr. Daniel Alves Rosa
Vice-Coordenador do Evento



Prof. Dr. Carlos Henrique Xavier Custodio
Coordenador do Evento



Prof. Dr. Gustavo Rodrigues Pedrinho
Diretor do Instituto de Ciências Biológicas

ICB
INSTITUTO DE
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROEC
PRO-REITORIA DE
EXTENSÃO E CULTURA



UFG
UNIVERSIDADE
FEDERAL DE GOIÁS





**República Federativa do Brasil
Universidade de São Paulo
Instituto de Ciências Biomédicas**

O Diretor do Instituto de Ciências Biomédicas, nos termos do artigo 74, parágrafo único, inciso 5, alínea "b", do Estatuto da Universidade de São Paulo, certifica que

Flávio Eduardo Dias Araújo Freitas



de nacionalidade brasileira,
portador da cédula de identidade RG nº MG13944836 MG,
nascido a 5 de novembro de 1992 e natural do Estado de Minas Gerais,
concluiu o



**Curso de Extensão Universitária na modalidade de Difusão:
Capacitação no Uso e Manejo de Animais de Laboratório**

E, para que possa gozar de todos os direitos e prerrogativas legais, outorga-lhe o presente
Certificado.

São Paulo, 30 de agosto de 2019

**Presidente da Comissão de Cultura e
Extensão Universitária**

Alda Maria Backx Noronha Madeira

Diretor

Luis Carlos de Souza Ferreira

Código de controle: WLPQ-U2NZ-8P6A-4ZK2