

**SILMARA FORMENTI**

**Aldosterona e apetite ao sódio: uma nova  
evidência para um antigo efeito**

Dissertação apresentada à Universidade  
Federal de São Paulo – Escola Paulista de  
Medicina para a obtenção do título de Mestre  
em Ciências.

**São Paulo**

**2009**

**SILMARA FORMENTI**

**Aldosterona e apetite ao sódio: uma nova  
evidência para um antigo efeito**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para a obtenção do título de Mestre em Ciências pelo programa de pós-graduação em Farmacologia – Área de concentração Fisiofarmacologia – Departamento de Fisiologia, Disciplina de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória.

**Orientador**

Prof. Dr. Eduardo Colombari

**Co-Orientador**

Dr. Guus Hermanus Maria Schoorlemmer

Formenti, Silmara

**Aldosterona e apetite ao sódio: uma nova evidência para um antigo efeito.** / Silmara Formenti. -- São Paulo, 2009.  
xx, 133f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de São Paulo.  
Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em  
Farmacologia.

Título em inglês: Aldosterone and sodium appetite: a new  
evidence for an old effect.

1. Aldosterona. 2. Apetite ao sódio. 3. Antagonista de receptor  
mineralocorticóide. 4. Quarto ventrículo. 5. Ventrículo lateral.

# **SILMARA FORMENTI**

## **Aldosterona e apetite ao sódio: uma nova evidência para um antigo efeito**

### **BANCA EXAMINADORA**

#### **Prof. Dr. José Antunes Rodrigues**

Professor Titular do Departamento de Fisiologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo (USP).

#### **Prof. Dr. José Vanderlei Menani**

Professor Titular do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

#### **Prof. Dr. Paulo José Ferreira Tucci**

Professor Titular do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM).

### **Suplente**

#### **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mirian Aparecida Boim**

Professora Associada do Departamento de Medicina, Disciplina de Nefrologia, Universidade Federal de São Paulo - Escola Paulista de Medicina (UNIFESP-EPM).

A os animais.

“J amais creia que os animais sofrem menos do que os humanos. A dor é a mesma para eles e para nós. Talvez pior, pois eles não podem ajudar a si mesmos.”

Dr. Louis J . Camuti

## AGRADECIMENTOS

- ❖ À Deus pela vida, saúde e proteção.
  
- ❖ Ao meu orientador Prof. Dr. Eduardo Colombari pela oportunidade, dedicação, paciência e principalmente por compartilhar comigo os prazeres e as dores de realizar um estudo científico.
  
- ❖ Ao Dr. Guus Schoorlemmer pela dedicação, paciência e por compartilhar o seu conhecimento.
  
- ❖ Às colegas de laboratório Liana, Cristiana e Ana Carolina pela amizade e pelo apoio.
  
- ❖ Aos colegas, professores e funcionários do Departamento de Fisiologia Cardiovascular e Respiratória da Universidade Federal de São Paulo pelo constante apoio profissional e principalmente pela amizade.
  
- ❖ Aos meus pais, Diorides e Geraldo, pelo amor, educação e por todo o esforço que sempre fizeram para que eu vencesse cada etapa da minha vida.
  
- ❖ Ao meu amor, minha vida por todo apoio, carinho, compreensão em todos os momentos e principalmente por estar ao meu lado e fazer cada dia da minha vida mais feliz.
  
- ❖ À Nina, Nino e Giggio por me ensinarem todos dias o significado do amor incondicional.
  
- ❖ À Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina pela valiosa oportunidade.

❖ À CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro.

**Este trabalho foi realizado com apoio financeiro da CAPES, FAPESP e CNPq.**

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	x
LISTA DE TABELAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	xvii
RESUMO.....	xix
INTRODUÇÃO.....	1
Apetite ao sódio estimulado por aldosterona.....	3
OBJETIVOS.....	16
MATERIAIS E MÉTODOS.....	17
1. Animais.....	17
2. Dieta.....	17
3. Implante de cânula guia em direção ao 4V.....	18
4. Implante de cânula guia em direção ao VL.....	19
5. Infusão intracerebroventricular de aldosterona.....	20
6. Injeções periféricas.....	20
7. Microinjeção intracerebroventricular.....	21
8. Teste de ingestão de 2 horas.....	21
9. Drogas utilizadas.....	21
10. Protocolos experimentais.....	22
10.1. Infusão crônica de aldosterona no 4V.....	22
10.2. Infusão crônica de aldosterona no VL.....	23
10.3. Depleção de sódio com furosemida e microinjeção intracerebroventricular de RU 28318 .....	23
10.4. Tratamento crônica com DOCA e microinjeção de RU 28318 no 4V .....	25
10.5. Privação de sódio crônica e microinjeção de RU 29318 no 4V.....	26
11. Perfusão e histologia.....	26
12. Análise estatística.....	27
RESULTADOS.....	30

1. Efeitos de infusão crônica de aldosterona no 4V sobre o apetite ao sódio de ratos.....	30
2. Efeitos de infusão crônica de aldosterona no VL sobre o apetite ao sódio de ratos.....	36
3. Efeitos da microinjeção intracerebroventricular de RU 28318 sobre o apetite ao sódio induzido por furosemida.....	41
3.1 Efeitos da microinjeção de RU 28318 no 4V sobre o apetite ao sódio induzido por furosemida.....	41
3.2 Efeitos da microinjeção de RU 28318 no VL sobre o apetite ao sódio induzido por furosemida .....	42
4. Efeitos da microinjeção intracerebroventricular de RU 28318 sobre o apetite ao sódio induzido por DOCA.....	47
5. Efeitos da microinjeção intracerebroventricular de RU 28318 sobre o apetite ao sódio induzido por privação de sódio.....	50
DISCUSSÃO.....	53
ABSTRACT.....	66
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	68
APÊNDICE.....	77
1. Tabelas de valores individuais .....	77
2. Publicações .....	122

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Mecanismo de ação da enzima 11 $\beta$ – hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (HSD2) .....	9
<b>Figura 2.</b> Localização dos neurônios imunorreativos para a enzima HSD2 no bulbo dorsomedial .....	15
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática do protocolo de infusão crônica de aldosterona no 4V ou no VL .....	23
<b>Figura 4.</b> Representação esquemática do protocolo de depleção de sódio com furosemida e microinjeção i.c.v. de RU 28318 .....	25
<b>Figura 5.</b> Representação esquemática do protocolo de tratamento crônico com DOCA e microinjeção de RU 28318 no 4V.....	26
<b>Figura 6.</b> Representação esquemática do protocolo de privação de sódio crônica e microinjeção de RU 28318 no 4V .....	26
<b>Figura 7.</b> Fotomicrografia de uma secção transversal do cerebelo e do bulbo mostrando o sítio de infusão no 4V .....	28
<b>Figura 8.</b> Fotomicrografia de uma secção transversal do prosencéfalo mostrando o sítio de infusão no VL .....	29
<b>Figura 9.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M antes (basal), durante (infusão i.c.v.) e após (recuperação) a infusão de aldosterona (1, 10 e 100 ng/h; n= 5/dose) ou veículo (1% etanol-salina; n= 5) no 4V.....	33
<b>Figura 10.</b> Ingestão de água antes (basal), durante (infusão i.c.v.) e após (recuperação) a infusão de aldosterona (1, 10 e 100 ng/h; n= 5/dose) ou veículo (1% etanol-salina; n= 5) no 4V .....	34
<b>Figura 11.</b> Ingestão de comida antes (basal), durante (infusão i.c.v.) e após (recuperação) a infusão de aldosterona (1, 10 e 100 ng/h; n= 5/dose) ou veículo (1% etanol-salina; n= 5) no 4V .....	35
<b>Figura 12.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M antes (basal), durante (infusão i.c.v.) e após (recuperação) a infusão de aldosterona (10 e 100 ng/h; n= 4/dose) no VL .....	38
<b>Figura 13.</b> Comparação entre os valores de ingestão de água (gráfico superior) e comida (gráfico inferior) antes (basal) e durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	39
<b>Figura 14.</b> Comparação entre os valores de ingestão de água (gráfico superior) e comida (gráfico inferior) antes (basal) e durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL .....	40

- Figura 15.** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M induzida por furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 6) ou veículo (1% etanol-salina; n= 6) no 4V .....43
- Figura 16.** Ingestão acumulativa de água após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 6) ou veículo (1% etanol-salina; n= 6) no 4V .....44
- Figura 17:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M induzida por furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 6) ou veículo (1% etanol-salina; n= 6) no VL .....45
- Figura 18:** Ingestão acumulativa de água após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 6) ou veículo (1% etanol-salina; n= 6) no VL .....46
- Figura 19:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M induzida por DOCA após 2 horas da microinjeção de 500 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 7) ou veículo (1% etanol-salina; n= 4) no 4V .....48
- Figura 20:** Ingestão acumulativa de água nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de 500 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 7) ou veículo (1% etanol-salina; n= 4) no 4V .....49
- Figura 21:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M induzida por privação de sódio após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 5) ou veículo (1% etanol-salina; n= 4) no 4V .....51
- Figura 22:** Ingestão acumulativa de água destilada (dH<sub>2</sub>O) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 5) ou veículo (1% etanol-salina; n= 4) no 4V .....52
- Figura 23:** Representação esquemática sugerindo prováveis vias envolvidas na ativação do apetite ao sódio promovido pela infusão de aldosterona no quarto ventrículo (4V) .....65

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Comparação entre os pesos corporais antes e após a infusão i.c.v. de aldosterona .....	37
<b>Tabela 2.</b> Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....	77
<b>Tabela 3.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) durante a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....	77
<b>Tabela 4.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....	78
<b>Tabela 5.</b> Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V .....	79
<b>Tabela 6.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) promovida pela infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V .....	79
<b>Tabela 7.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V .....	80
<b>Tabela 8.</b> Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.....	81
<b>Tabela 9.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) promovida pela infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V .....	81
<b>Tabela 10.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V .....	82
<b>Tabela 11.</b> Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V .....	83
<b>Tabela 12.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) promovida pela infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V .....	83
<b>Tabela 13.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V .....	84
<b>Tabela 14.</b> Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....	85
<b>Tabela 15.</b> Ingestão de água (mL) durante a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....	85

<b>Tabela 16.</b> Ingestão de água (mL) após a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.....	86
<b>Tabela 17.</b> Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V .....	87
<b>Tabela 18.</b> Ingestão de água (mL) durante a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V .....	87
<b>Tabela 19.</b> Ingestão de água (mL) após a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V.....	88
<b>Tabela 20.</b> Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V .....	89
<b>Tabela 21.</b> Ingestão de água (mL) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V .....	90
<b>Tabela 22.</b> Ingestão de água (mL) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V .....	90
<b>Tabela 23.</b> Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V .....	91
<b>Tabela 24.</b> Ingestão de água (mL) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V .....	91
<b>Tabela 25.</b> Ingestão de água (mL) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V .....	92
<b>Tabela 26.</b> Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....	93
<b>Tabela 27.</b> Ingestão de comida (g) durante a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....	93
<b>Tabela 28.</b> Ingestão de comida (g) após a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.....	94
<b>Tabela 29.</b> Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V .....	95
<b>Tabela 30.</b> Ingestão de comida (g) durante a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V .....	95
<b>Tabela 31.</b> Ingestão de comida (g) após a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V .....	96

<b>Tabela 32.</b> Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V .....	97
<b>Tabela 33.</b> Ingestão de comida (g) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V .....	97
<b>Tabela 34.</b> Ingestão de comida (g) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V .....	98
<b>Tabela 35.</b> Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V .....	99
<b>Tabela 36.</b> Ingestão de comida (g) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V .....	99
<b>Tabela 37.</b> Ingestão de comida (g) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V .....	100
<b>Tabela 38.</b> Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	101
<b>Tabela 39.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	101
<b>Tabela 40.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	102
<b>Tabela 41.</b> Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL .....	103
<b>Tabela 42.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL .....	103
<b>Tabela 43.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL .....	104
<b>Tabela 44.</b> Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	105
<b>Tabela 45.</b> Ingestão de água (mL) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	105
<b>Tabela 46.</b> Ingestão de água (mL) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	106
<b>Tabela 47.</b> Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL .....	107
<b>Tabela 48.</b> Ingestão de água (mL) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL .....	107

<b>Tabela 49.</b> Ingestão de água (mL) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.....	108
<b>Tabela 50.</b> Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	109
<b>Tabela 51.</b> Ingestão de comida (g) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	109
<b>Tabela 52.</b> Ingestão de comida (g) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL .....	110
<b>Tabela 53.</b> Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL .....	111
<b>Tabela 54.</b> Ingestão de comida (g) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL .....	111
<b>Tabela 55.</b> Ingestão de comida (g) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.....	112
<b>Tabela 56.</b> Ingestão de água (mL) após a microinjeção de 10 ng/2 µL de All no VL durante o teste de ingestão de 15 minutos nos ratos que posteriormente receberam a infusão i.c.v. de 10 ou 100 ng/h de aldosterona .....	112
<b>Tabela 57:</b> Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....	113
<b>Tabela 58.</b> Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no 4V .....	114
<b>Tabela 59.</b> Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após 24 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no 4V dos ratos depletados com furosemida .....	114
<b>Tabela 60.</b> Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....	115
<b>Tabela 61.</b> Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no 4V .....	115
<b>Tabela 62.</b> Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no VL .....	116
<b>Tabela 63.</b> Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no VL.....	116
<b>Tabela 64.</b> Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no VL .....	117

- Tabela 65.** Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 no 4V .....117
- Tabela 66.** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....118
- Tabela 67.** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de 500 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 no 4V .....118
- Tabela 68.** Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....119
- Tabela 69.** Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de 500 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 no 4V .....119
- Tabela 70.** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....120
- Tabela 71.** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 no 4V .....120
- Tabela 72.** Ingestão acumulativa de água destilada (mL) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V .....121
- Tabela 73.** Ingestão acumulativa de água destilada (mL) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 no 4V .....121

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

**All:** angiotensina II  
**ADX:** adrenalectomizado  
**Aldo:** aldosterona  
**ANOVA:** análise de variância  
**ANP:** peptídeo atrial natriurético  
**AP:** área postrema  
**BHE:** barreira hemato-encefálica  
**BST:** núcleo leito da estria terminal  
**BSTvl:** região ventrolateral do núcleo leito da estria terminal  
**CeA:** núcleo central da amígdala  
**cols.:** colaboradores  
**dH<sub>2</sub>O:** água destilada  
**DOCA:** acetato de desoxicorticosterona  
**EPM:** erro padrão da média  
**GR:** receptor glicocorticóide  
**HSD2:** 11  $\beta$  – hidroxisteróide desidrogenase tipo 2  
**i.c.v.:** intracerebroventricular  
**i.p.:** intraperitoneal  
**LEC:** líquido extracelular  
**LPBN:** núcleo parabraquial lateral  
**MR:** receptor mineralocorticóide  
**NAc:** núcleo accumbens  
**NTS:** núcleos do trato solitário  
**PBN:** núcleo parabraquial  
**PBNel:** núcleo parabraquial externo-lateral  
**pre- LC:** pré- locus ceruleus  
**PVN:** núcleo paraventricular  
**RU 29318:** antagonista seletivo de receptor mineralocorticóide  
**s.c.:** subcutâneo  
**SNC:** sistema nervoso central  
**UI:** unidade internacional  
**VL:** ventrículo lateral  
**vs.:** *versus*  
**3V:** terceiro ventrículo  
**4V:** quarto ventrículo  
**cm:** centímetro (s)  
**dL:** decilitro (s)  
**g:** grama (s)  
**h:** hora (s)  
**kg:** quilograma (s)  
**M:** molar (es)  
**min:** minuto (s)  
**mg:** miligrama (s)  
**mL:** mililitro (s)  
**mM:** milimolar (es)  
**mm:** milímetro (s)

**n**: tamanho da amostra

**NaCl**: cloreto de sódio

**Na<sup>+</sup>**: sódio

**ng**: nanograma (s)

**nL**: nanolitro (s)

**µg**: micrograma (s)

**µL**: microlitro (s)

**µm**: micrometro (s)

**°C**: grau Celsius

**=**: igual

**±**: mais ou menos

**>**: maior

**<**: menor

**/**: por

**%**: porcentagem

## RESUMO

A aldosterona é um hormônio mineralocorticóide que atua no sistema nervoso central (SNC) para estimular o apetite ao sódio, no entanto, pouco se sabe sobre o mecanismo central envolvido nesta resposta. Recentemente, estudos neuroanatômicos identificaram um grupo de neurônios sensíveis a aldosterona, localizados exclusivamente nos núcleos do trato solitário (NTS) próximos ao quarto ventrículo cerebral (4V), que são ativados em associação com o apetite ao sódio. No presente estudo procuramos investigar se (1) a infusão crônica de aldosterona no 4V ou no ventrículo lateral (VL) é capaz de estimular o apetite ao sódio, e (2) se a microinjeção do antagonista seletivo de receptor mineralocorticóide (MR) RU 28318, no 4V ou no VL é capaz de bloquear ou reduzir a ingestão de sódio estimulada por diferentes protocolos. Ratos Wistar Hannover com implante de cânula guia em direção ao 4V receberam a infusão de veículo (1% etanol-salina; n= 5) ou aldosterona (1, 10 ou 100 ng/h; n= 5/dose) e os animais com implante de cânula guia em direção ao VL receberam a infusão de aldosterona (10 ou 100 ng/h; n= 4/dose), por 6 dias consecutivos. A infusão de 1, 10 ou 100 ng/h de aldosterona no 4V aumentou significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M em relação aos valores basais. As doses de 10 ou 100 ng/h induziram robusta ingestão de NaCl 0,3 M de maneira dependente de dose (chegando até  $45,8 \pm 14,9$  e  $129,8 \pm 5,5$  mL/24 h, respectivamente), que praticamente retornou aos valores basais com o término da infusão. No entanto, a infusão de 10 ou 100 ng/h de aldosterona no VL não alterou a ingestão basal de NaCl 0,3 M. A ingestão de água foi significativamente reduzida durante a infusão das doses de 10 ou 100 ng/h de aldosterona no 4V quando comparadas ao veículo e a dose de 1 ng/h, mas a ingestão de comida permaneceu

inalterada. No experimento seguinte, ratos implantados com cânula guia em direção ao 4V ou ao VL foram tratados de acordo com os seguintes protocolos: depleção com furosemida (20 mg/kg, s.c.; n= 6) 24 h antes do experimento ou privação de sódio por 9 dias (n= 4-5) ou tratamento com DOCA (2 mg/dia, s.c.; n= 4-7) por 7 dias. Ao final do período de tratamento os ratos receberam uma microinjeção de RU 28318 (100 ou 500 ng/2  $\mu$ L) ou veículo (1% etanol-salina, 2  $\mu$ L) e após 2 h iniciou-se o teste de ingestão. A microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 no 4V reduziu significativamente a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento prévio com furosemida ( $5,6 \pm 0,8$  vs. veículo  $12,2 \pm 1,7$  mL/2 h,  $p < 0,05$ ) ou pelo protocolo de privação de sódio ( $1,2 \pm 0,6$  vs. veículo  $9,5 \pm 2,6$  mL/2 h,  $p < 0,001$ ). Porém, a microinjeção da mesma dose de RU 28318 no VL não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M estimulada por furosemida ( $14,8 \pm 2,8$  vs. veículo  $15,1 \pm 3$  mL/2 h,  $p > 0,05$ ). Inesperadamente, a microinjeção de 500 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 no 4V não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M estimulada pelo tratamento crônico com DOCA ( $13,6 \pm 2,7$  vs. veículo  $11,1 \pm 2,3$  mL/2 h,  $p > 0,05$ ). Nossos resultados são as primeiras evidências funcionais a mostrarem que a infusão crônica de aldosterona no 4V, mas não no VL, é capaz de estimular robusto apetite ao sódio de maneira dependente de dose. Esses resultados são reforçados pelos nossos estudos com antagonista de MR, nos quais a microinjeção de RU 28318 no 4V reduziu significativamente a ingestão de sódio estimulada por furosemida e pela privação de sódio. Estes resultados confirmam a ação central da aldosterona no controle do apetite ao sódio e junto com estudos neuroanatômicos prévios sugerem que áreas bulbares próximas ao 4V são o local preferencial de ação da aldosterona para estimular o apetite ao sódio.

## INTRODUÇÃO

O apetite ao sódio é comportamento motivado, inato e está presente em diversas espécies animais (Richter, 1936; Blair-West e cols., 1968; Epstein e Massi, 1987; Shade e cols., 2002), inclusive em humanos (Wilkins e Richter, 1940; Kochli e cols., 2005). Como o próprio nome indica este comportamento estimula os animais a buscarem e ingerirem alimentos ou soluções que contenham sódio, e normalmente ocorre em resposta a deficiência de sódio no organismo.

Os estudos pioneiros de Curt Richter foram o marco inicial para os estudos envolvendo o apetite ao sódio. Richter observou que ratos adrenalectomizados (ADX) morriam rapidamente quando mantidos em dieta hipossódica, e que quando permitido livre acesso a salina hipertônica esses animais apresentavam robusta ingestão de sódio e isso os mantinha vivos (Richter, 1936). Curt Richter concluiu então que o apetite ao sódio apresentado pelos animais ADX era fruto da deficiência do íon sódio no organismo (Richter, 1936).

Descobertas adicionais vieram com estudos subsequentes nos quais se observou que o apetite ao sódio desenvolvido por ratos ADX era específico para soluções contendo sódio, e que este comportamento era abolido depois que estes animais recebiam implantes de tecido adrenal ou depois da administração exógena de acetato de desoxicorticosterona (DOCA) (Richter e Eckert, 1938). Rice e Richter (1943) observaram que ao contrário do que ocorria em animais ADX, animais intactos desenvolviam apetite ao sódio quando tratados com DOCA. Todos esses resultados levaram a conclusão de que as glândulas adrenais e os hormônios por elas produzidos estavam diretamente relacionados ao controle da ingestão de sódio. E, a partir de então, iniciaram-se inúmeras pesquisas que buscaram investigar os

mecanismos envolvidos no apetite ao sódio induzido por mineralocorticóides e outros fatores que também poderiam contribuir para este comportamento.

O sódio é o principal íon do líquido extracelular (LEC) e tem função fundamental na manutenção da osmolaridade e do volume sanguíneo, e conseqüentemente na pressão arterial. Perturbações na homeostase do sódio podem ter conseqüências graves, podendo inclusive levar a morte. Além do estudo em ratos ADX (Richter, 1936), outros estudos demonstraram a importância do sódio. No trabalho de Orent-Keiles e colaboradores (1937) ratos criados com dieta hipossódica apresentaram rápida perda de peso, graves problemas oculares, atraso na maturidade sexual em fêmeas e 100% dos animais morreram entre 18 e 21 semanas após o início do protocolo de privação de sódio.

Em humanos, o apetite ao sódio é assunto bem menos estudado do que em animais, talvez pela dieta ser normalmente rica em sódio ou por ser sensação difícil de ser reconhecida (Daniels e Fluharty, 2004). Porém, há relatos na literatura que comprovam a presença de apetite ao sódio em humanos e mostram os distúrbios que ocorrem devido à deficiência orgânica deste íon. O relato mais conhecido na literatura foi descrito em 1940 por Wilkins e Richter, no qual uma criança portadora de insuficiência das glândulas adrenais e que apresentava preferência por alimentos salgados, morreu após ser mantida em dieta hipossódica.

Outro relato muito interessante sobre apetite ao sódio em humanos foi feito por McCance (1936). Neste estudo o próprio pesquisador e dois de seus alunos se submeteram a uma dieta com restrição de sódio e descreveram os principais sinais e sintomas por eles apresentados, dentre eles estavam: perda de peso, pesadelos, diurese noturna, náusea durante as refeições, exaustão e aumento na viscosidade

do sangue. A sensação da deficiência de sódio foi relatada por um dos participantes como sede insaciável (McCance, 1936).

Todos esses estudos claramente mostram as graves consequências decorrentes de severa deficiência de sódio em humanos e animais, salientando a importância desse íon na manutenção da homeostase do organismo. Portanto, sendo o íon sódio essencial à vida é de extrema importância a existência de mecanismos que mantenham sua concentração no LEC próximo ao valor fisiológico (aproximadamente 145 mM). Dentre os diversos mecanismos neurais e hormonais envolvidos na homeostase do sódio este trabalho destaca o envolvimento do hormônio aldosterona no controle do apetite ao sódio.

### **Apetite ao sódio estimulado por aldosterona**

Rice e Richter (1943) observaram que ratos intactos apresentavam importante aumento na ingestão de sódio quando tratados com DOCA. Esse resultado foi intrigante, uma vez que animais ADX (sem produção de mineralocorticóides) apresentavam também importante aumento na ingestão de sódio (Richter, 1936) e quando tratados com DOCA essa ingestão era reduzida a valores basais (Richter e Eckert, 1938). A partir de então diversos estudos se iniciaram a fim de investigar qual o mecanismo que estaria envolvido no apetite ao sódio induzido pelo tratamento com mineralocorticóides e quais seriam os outros fatores que contribuem para este mecanismo quando os mineralocorticóides estão ausentes (adrenalectomia).

Passadas algumas décadas após os achados iniciais de Richter e alguns anos após o hormônio adrenal responsável pela conservação do sódio ser identificado e nomeado como aldosterona (Tait S e Tait J, 1998; Tait e cols., 2004),

novas pesquisas se iniciavam para elucidar a função da aldosterona na estimulação do apetite ao sódio. Wolf (1965) confirmou os achados de Richter, nos quais a administração de DOCA em ratos intactos estimulava a ingestão de sódio e em ratos ADX abolia esse comportamento. No entanto, ele observou que a supressão do apetite ao sódio de ratos ADX ocorria com doses baixas de DOCA (11 mg/kg), porém quando esses animais recebiam maiores doses de DOCA (> 100 mg/kg) eles novamente apresentavam aumento na ingestão de sódio (Wolf, 1965); sugerindo que animais ADX ainda se mantinham responsivos ao efeito natreorigênico da DOCA, no entanto, necessitavam de maiores doses do que os animais intactos.

Em experimentos subsequentes, Wolf e Handal (1966) investigaram se o efeito da aldosterona sobre o apetite ao sódio de ratos seria o mesmo que o visto com o tratamento com DOCA. Os autores utilizaram doses menores de aldosterona (30, 60 e 120 µg/semana), uma vez que as doses de DOCA (2,5 mg/dia) (Wolf, 1965; Rice e Richter, 1943) utilizadas para estimular a ingestão de sódio eram muito altas e estavam muito acima da dose necessária para gerar retenção de sódio pelos rins e essa ingestão de sódio poderia não ser função fisiológica dos mineralocorticóides (Wolf e Handal, 1966). Os ratos receberam apenas uma injeção das doses supracitadas durante quatro semanas, totalizando quatro injeções. O resultado obtido foi que o tratamento com aldosterona estimulou aumento na ingestão de sódio que mostrou ser dependente de dose (Wolf e Handal, 1966). No entanto, os autores deixaram muitas dúvidas em relação a este resultado. Com o objetivo de evitar a inibição do apetite ao sódio pela retenção de sódio, os ratos foram mantidos em dieta hipossódica durante todo o tratamento com aldosterona. Isso pode ter mascarado o real efeito do tratamento crônico com baixas doses de aldosterona, uma vez que a dieta hipossódica é sabidamente potente estímulo para

o apetite ao sódio (Blair-West e cols., 1968). A concentração da solução salina utilizada para o teste do apetite ao sódio é outra questão duvidosa, os autores utilizaram uma solução isotônica (NaCl 0,15 M), que é preferencialmente consumida pelos ratos nos testes de preferência-aversão (Rowland e cols., 1994), e os autores ainda relatam que em estudos preliminares o tratamento com aldosterona não foi capaz de estimular a ingestão de salina mais concentrada (Wolf e Handal, 1966). Portanto, este estudo não mostrou claramente se a aldosterona em baixas doses é capaz de estimular o apetite ao sódio assim como faz o tratamento com doses suprafisiológicas de DOCA.

Weisinger e Woods (1971) mostraram que a injeção subcutânea (s.c.) de aldosterona (15, 150 ou 1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) foi capaz de aumentar a ingestão de sódio (NaCl 0,33 M) em ratos, mas que esta resposta foi independente da dose administrada. Porém, o valor da ingestão durante o teste de 20 minutos foi muito baixo, por exemplo, os ratos controle beberam em média  $0,8 \pm 0,37$  contra  $2,5 \pm 0,36$  mL dos ratos que receberam a maior dose de aldosterona (1500  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) (Weisinger e Woods, 1971). Os autores ainda sugerem que o apetite ao sódio estimulado por aldosterona possa ser comportamento condicionado, uma vez que ratos com livre acesso a salina hipertônica não apresentaram apetite ao sódio após receberem a injeção de aldosterona, já os animais sem acesso a salina desenvolveram apetite ao sódio após a injeção de aldosterona (Weisinger e Woods, 1971). Neste caso, o que talvez tenha acontecido foi que os animais com livre acesso a salina já estavam adaptados e a injeção de aldosterona não teve efeito sobre a ingestão de sódio, e os ratos que não tinham acesso a salina a consumiram por ser solução nova para seu paladar e não por influencia da aldosterona. Todos esses estudos deixaram muitas questões a serem esclarecidas e não conseguiram reproduzir com baixas doses de

aldosterona o apetite ao sódio que é estimulado pelo tratamento crônico com doses supra-fisiológicas de DOCA. E o mecanismo pelo qual a aldosterona atua no controle do apetite ao sódio não pode ser esclarecido.

Em 1982, Epstein propôs a teoria do sinergismo na qual sugeria que o apetite ao sódio é o resultado da elevação simultânea da concentração plasmática de aldosterona e de outro hormônio envolvido na regulação do apetite ao sódio, a angiotensina II (All), porém esta de origem central. Esta elevação simultânea de ambos os hormônios ocorre naturalmente, por exemplo, quando o animal é mantido em dieta hipossódica (Fregly e Rowland, 1985). Como demonstrado inicialmente por Fluharty e Epstein (1983), a infusão intracerebroventricular (i.c.v.) de baixas doses de All associada ao pré-tratamento periférico com mineralocorticoide (DOCA) estimula robusto apetite ao sódio que é superior a soma das ingestões produzidas por maiores doses de cada hormônio administrado individualmente. Corroborando com esta teoria, o apetite ao sódio induzido por furosemida só pode ser abolido pelo tratamento combinado de um antagonista de receptor mineralocorticoide (MR) (i.c.v.) com a administração periférica do inibidor da enzima conversora de angiotensina (captopril) (Sakai e cols., 1986).

Enquanto que as manipulações farmacológicas utilizando DOCA e aldosterona (Rice e Richter, 1943; Wolf, 1965; Wolf e Handal, 1966; Weisinger e Woods, 1971) mostravam que os mineralocorticóides tinham função na estimulação do apetite ao sódio, estudos de lesão em determinadas áreas do sistema nervoso central (SNC) mostravam que os mineralocorticóides atuam centralmente para estimular o apetite ao sódio. Lesões envolvendo a amígdala e o núcleo leito da estria terminal (BST) reduziam a ingestão de sódio estimulada pelo tratamento com mineralocorticóides (Nitabach e cols., 1989; Zhang e cols., 1993; Zardetto-Smith e

cols., 1994; Reilly e cols., 1994). A ação central dos mineralocorticóides na regulação do apetite ao sódio também foi evidenciada pelo estudo de McEwen e colaboradores (1986), que mostraram que a mesma dose do antagonista de MR, RU 28318, que bloqueia a ação da aldosterona sobre o apetite ao sódio de ratos ADX é a mesma que inibe a captação de  $^3\text{H}$ -aldosterona em áreas prosencefálicas de ratos.

Mais estudos utilizando manipulações farmacológicas investigaram as possíveis regiões encefálicas que poderiam ser alvos da aldosterona na regulação do apetite ao sódio. Sakai e colaboradores (1986) observaram que o bloqueio central, mas não periférico dos MRs reduzia a ingestão de sódio estimulada pela depleção de sódio em ratos, sugerindo que os MRs prosencefálicos poderiam ser os possíveis alvos para ação central da aldosterona (Sakai e cols., 1986). A amígdala é outro local sugerido para atuação da aldosterona na regulação do apetite ao sódio, sendo inclusive proposto um mecanismo não-genômico (Sakai e cols., 1996; Sakai e cols., 2000).

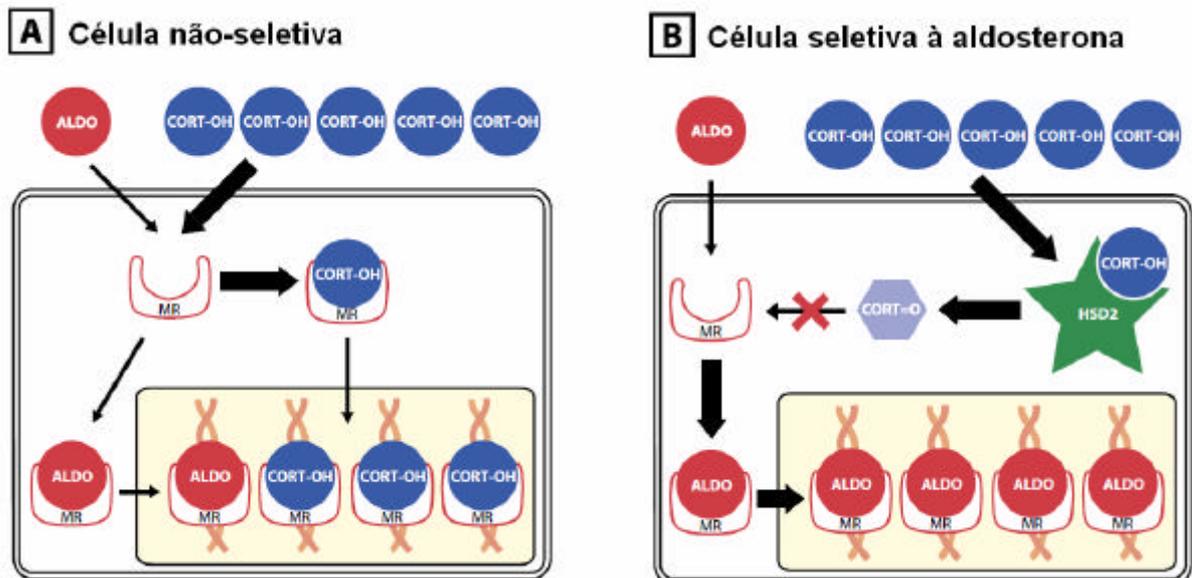
Contudo, um fator que muitas vezes é ignorado ao se investigar possíveis alvos centrais para ação da aldosterona é a sua baixa taxa de penetração através da barreira hemato-encefálica (BHE) (Pardridge e Mietus, 1979; revisado por Geerling e Loewy, 2009). Apesar de ser um hormônio esteróide lipofílico, a baixa permeabilidade da aldosterona na BHE (cerca de  $3,5 \pm 0,8\%$ ), se deve a sua maior tendência de formar pontes de hidrogênio em soluções aquosas (Pardridge e Mietus, 1979). Além disso, a proteína transportadora chamada de MRD-1 ou glicoproteína P situada na BHE (Geerling e Loewy, 2009) é outro fator limitante ao acesso da aldosterona no SNC. A função dessa proteína é transportar ativamente substâncias contra o seu gradiente de concentração, ou seja, ela bombeia substâncias que atravessaram a BHE de volta para a circulação (Uhr e cols., 2002; Geerling e Loewy,

2009). Evidências apontam a MRD-1 como importante regulador da penetração da aldosterona através da BHE, pois camundongos *knockout* para MRD-1 apresentam aumento da captação e do acúmulo de aldosterona, corticosterona e cortisol no encéfalo em relação aos animais selvagens (Uhr e cols., 2002). Portanto, a proteína transportadora MRD-1 atua como uma barreira endógena a penetração dos corticosteróides na BHE, cujo maior objetivo seria proteger o SNC da ação desses hormônios.

A baixa taxa de penetração da aldosterona na BHE faz com que a maioria das células do SNC sejam expostas apenas a pequenas frações da baixa concentração de aldosterona circulante (cerca de  $14,1 \pm 2$  ng/dL; Douglas e Catt, 1976). O que torna áreas desprovidas de BHE locais de fácil acesso a aldosterona circulante e pode sugerir que estes sejam os principais locais de ação da aldosterona no SNC.

Outro fator importante é que apenas a expressão do MR não é suficiente para que uma célula seja sensível à aldosterona. Isso porque os MRs são geneticamente muito semelhantes aos receptores glicocorticóides (GR) (Arriza e cols., 1987). Sendo assim, os glicocorticóides apresentam afinidade semelhante a da aldosterona pelo MR (Shepard e Funder, 1987). Além disso, a concentração plasmática dos glicocorticóides é cerca de 100 a 1000 vezes maior do que a concentração plasmática de aldosterona (Náray-Fejes-Tóth e Fejes-Tóth, 1996; Odermatt e cols., 2001). Devido a essas características, podemos inferir que os MRs são preferencialmente ocupados pelos glicocorticóides. Por isso, a presença da enzima 11  $\beta$  – hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (HSD2) nos órgãos-alvo de ação da aldosterona é de extrema importância, pois ela inativa os glicocorticóides endógenos, cortisol (em humanos) e corticosterona (em roedores) em seus análogos biologicamente inativos 11-ceto (cortisona e 11-desidrocorticosterona,

respectivamente), evitando que estes se liguem ao MR, permitindo livre acesso apenas à aldosterona (figura 1) (Náray-Fejes-Tóth e Fejes-Tóth, 1996; Odermatt e cols., 1999; 2001).



**Figura 1:** Mecanismo de ação da enzima 11  $\beta$  – hidroxisteróide desidrogenase tipo 2 (HSD2). **A.** Devido à ausência de HSD2, os glicocorticóides que se encontram em maior concentração plasmática do que a aldosterona, preferencialmente se ligam no MR. **B.** A enzima HSD2 inativa os glicocorticóides e permite livre acesso à aldosterona no MR. **Abreviações:** ALDO: aldosterona; CORT-OH: corticosterona; CORT=O: metabólitos 11-ceto; MR: receptor mineralocorticóide. Extraído e adaptado de Geerling e colaboradores (2006b).

Então, vários estudos sugerem uma ação central da aldosterona tanto na regulação da ingestão de sódio (Sakai e cols., 1986; 1996; 2000), quanto na sua ação hipertensiva (Gomez-Sanchez, 1986). No entanto, como descrito acima, há diversas limitações para a ação da aldosterona no SNC, pensando nisso Geerling e Loewy iniciaram uma pesquisa para localizar no SNC neurônios que fossem sensíveis à aldosterona. Cientes de que para a aldosterona ser capaz de se ligar ao MR livremente, sem a competição com os glicocorticóides, é necessária a expressão da enzima HSD2, Geerling e Loewy realizaram um estudo de imunohistoquímica para confirmar as regiões do SNC que expressavam MR e HSD2. Utilizando anticorpo específico contra MR de rato, Geerling e colaboradores (2006b) observaram expressão difusa de MR por todo o encéfalo, corroborando com estudos prévios (Ahima e cols., 1991; Roland e cols., 1995). No entanto, um pequeno grupo de neurônios localizados no subnúcleo medial dos núcleos do trato solitário (NTS), chamou atenção devido à intensa imunorreatividade para MR (Geerling e cols., 2006b; Geerling e Loewy, 2009). Porém, como já descrito anteriormente, apenas a presença de MR não é suficiente para que o tecido seja seletivo à aldosterona. Então, uma vez confirmada a expressão difusa de MR no SNC, Geerling e colaboradores (2006b) avaliaram se estes neurônios também expressavam a enzima HSD2. Com os tratamentos anatômicos específicos descobriu-se intensa imunorreatividade para HSD2 no NTS medial, com a mesma distribuição restrita apresentada pelos MRs. E ao realizarem a dupla marcação observaram que a enzima HSD2 estava co-localizada com os MRs apenas no NTS, e em nenhum outro local do SNC encontraram essa dupla marcação (Geerling e cols., 2006b). Sendo assim, esses neurônios foram denominados de “neurônios HSD2”, por serem os

únicos neurônios que co-expressam a enzima HSD2 e o MR (Geerling e cols., 2006b)

Os neurônios HSD2 estão localizados desde porções rostrais à área postrema (AP), se estendendo até a porção caudal do NTS ao nível da transição bulbo-espinal. As concentrações mais densas de neurônios HSD2 localizam-se no NTS medial que está na borda do 4V, próximo ao nível que se forma o canal central, abaixo da AP (Geerling e cols., 2006a; 2006b) (figura 2). Portanto, além de expressarem MR e HSD2, o que os torna sensíveis e seletivos à aldosterona, os neurônios HSD2 estão próximos a uma região desprovida de BHE (a AP), de fácil acesso a aldosterona circulante.

Após identificarem os neurônios HSD2, Geerling e colaboradores (2006a) investigaram se estes neurônios apresentariam alguma resposta funcional para a aldosterona circulante. Pronunciada translocação nuclear do MR foi observada em ratos ADX tratados com aldosterona, mas não com corticosterona ou veículo, o que confirmou que estes neurônios são seletivamente sensíveis à aldosterona *in vivo*. No mesmo estudo, os autores mostraram que os neurônios HSD2 são ativados por diversas situações que estimulam o apetite ao sódio, tais como a dieta com privação de sódio, diurese por furosemida, tratamento crônico com altas doses de DOCA e adrenalectomia. A maior ativação foi observada no protocolo de 8 dias de privação de sódio (Geerling e cols., 2006a). Essa ativação se relacionou a importante e rápida ingestão de sódio apresentada pelos grupos privados de sódio e tratados com DOCA, o que sugere que os neurônios HSD2 apresentam padrão de ativação intimamente relacionado ao apetite ao sódio. Outro resultado interessante foi a rápida inativação dos neurônios HSD2 após cerca de 2 horas do acesso a salina hipertônica (Geerling e cols., 2006a). A ingestão de salina hipertônica inibe os

neurônios HSD2 mesmo na presença constante de estímulo que os ativam, como no caso do tratamento crônico com DOCA (Geerling e Loewy, 2006c). Esses resultados sugerem que os neurônios HSD2 são inibidos por sinais diretamente relacionados à ingestão de sódio e não pelo simples alívio da deficiência de sódio, que não ocorre durante a administração crônica de mineralocorticóides (Geerling e cols., 2006a; Geerling e Loewy, 2006c). Essa rápida inibição após o consumo de salina hipertônica pode ocorrer por mecanismos inibitórios locais, uma vez que, concomitantemente a inibição dos neurônios HSD2, ocorre ativação de neurônios vizinhos a eles no NTS medial (incluindo os neurônios noradrenérgicos A2) e na AP (Sequeira e cols., 2006). Além disso, a ingestão de salina hipertônica também ativa neurônios localizados no núcleo parabraquial (PBN), que são responsáveis por retransmitir as informações gustatórias e viscerossensoriais do NTS para áreas prosencefálicas (Geerling e Loewy, 2007b). E também, a inibição dos neurônios HSD2 pode ocorrer devido aos sinais pós-ingestivos do trato gastrointestinal que chegam ao NTS por meio do nervo vago, uma vez que os neurônios HSD2 também recebem inervação vagal (Shin e cols., 2009).

Importante ressaltar que ratos ADX, ou seja, sem produção de aldosterona, também apresentaram ativação dos neurônios HSD2 quando privados de sódio e inibição quando foi permitido o acesso à salina hipertônica (Geerling e cols., 2006a), o que significa que estes neurônios são ativados por algum outro mecanismo (neural/humoral) independente da aldosterona, que ainda permanece desconhecido.

Os neurônios HSD2 parecem não se relacionar com a sede, uma vez que estímulos como a hiperosmolaridade e a hipovolemia na fase precoce não os ativam. Somente a hipovolemia prolongada foi capaz de ativar os neurônios HSD2 ao mesmo tempo em que este tratamento estimulou a ingestão de sódio (Geerling e

Loewy, 2007a). Esses resultados confirmaram que a função dos neurônios HSD2 é estritamente relacionada ao apetite ao sódio.

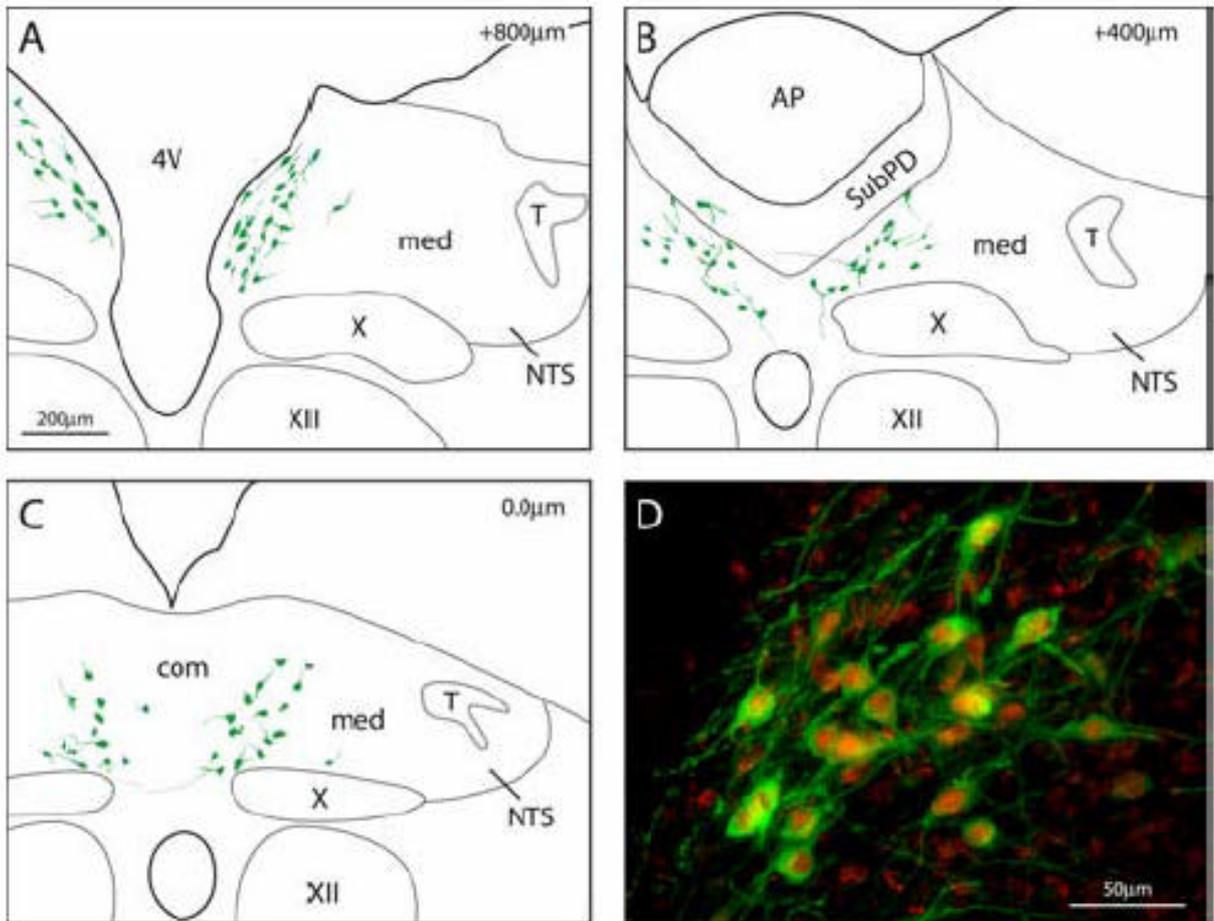
Aparentemente, os neurônios HSD2 também não estão diretamente envolvidos no controle das funções cardiovasculares, pois eles não se conectam com áreas envolvidas no controle autonômico (Geerling e Loewy, 2006b) e nem são ativados pela queda na pressão arterial produzida por hidralazina (Geerling e Loewy, 2009).

Estudos com traçadores neuronais evidenciaram que os neurônios HSD2 se conectam por meio de projeções diretas ou indiretas com diferentes áreas envolvidas na regulação do apetite ao sódio (revisado por Formenti e cols., 2008). Eles enviam importantes projeções eferentes para a porção ventrolateral do núcleo leito da estria terminal (BSTvl), pré-locus ceruleus (pre-LC) e para divisão interna do núcleo parabraquial externo-lateral (PBNeI). Sendo que o BSTvl recebe projeções eferentes dos neurônios HSD2 tanto direta, quanto indiretamente por meio do pre-LC e do PBNeI (Geerling e Loewy, 2006b). Outro estudo demonstrou que os neurônios HSD2 apresentam conexões bidirecionais com o núcleo central da amígdala (CeA) (Geerling e Loewy, 2006a). Além disso, também se projetam para o núcleo accumbens (NAc), por meio de uma via multissináptica envolvendo núcleos pontinos e hipotalâmicos (Shekhtman e cols., 2007). O NAc está envolvido nos mecanismos de recompensa, motivação e aprendizado, e é ativado durante vários comportamentos ingestivos, incluindo a ingestão de sódio (Voorhies e Bernstein, 2006). Assim como a maioria dos neurônios do NTS, os neurônios HSD2 também são inervados pelo núcleo paraventricular (PVN) (Geerling e Loewy, 2008). E localmente, são inervados por um grupo de neurônios do NTS dorsomedial que

expressam neurotensina e, também, recebem impulsos de neurônios da AP (Sequeira e cols., 2006).

Possivelmente, o neurotransmissor liberado pelos axônios dos neurônios HSD2 seja excitatório, provavelmente o glutamato, pois estes neurônios expressam o fator de transcrição Phox2b que é marcador de neurônios glutamatérgicos no NTS (Geerling e cols., 2008). Outra evidência para a transmissão sináptica excitatória desses neurônios, é a concomitantemente ativação dos neurônios que recebem suas projeções eferentes (pre-LC e PBNel) durante o protocolo de privação de sódio (Geerling e Loewy, 2007b).

Em resumo, os neurônios HSD2 são as únicas células do SNC sensíveis e seletivos à aldosterona, ativados em associação com o apetite ao sódio, inibidos pela ingestão de sódio, que se conectam por meio de projeções diretas ou indiretas com áreas envolvidas na regulação do apetite ao sódio e estão em região de fácil acesso a aldosterona circulante. Todas essas características tornam os neurônios HSD2 do NTS fortes candidatos ao local preferencial de ação da aldosterona no SNC para a regulação do apetite ao sódio e os caracterizam como parte integrante do circuito neuro-humoral relacionado ao controle deste comportamento.



**Figura 2:** Localização dos neurônios imunorreativos para a enzima HSD2 no bulbo dorsomedial **(A-C)**. Esses neurônios (verde) estão no NTS rostral a AP **(A)** e se estendem ~ 1 mm caudal **(C)**. As distâncias rostrocaudais (no topo a direita, em micrometros) são relativas ao nível do calamus scriptorium **(C)**. **D.** imunorreatividade para MR (vermelho) no citoplasma nuclear e perinuclear de neurônios imunorreativos a HSD2 (verde) no NTS de um animal com alta concentração plasmática de aldosterona. **Abreviações:** AP: área postrema; 4V: quarto ventrículo; med: subnúcleo medial do NTS; com: subnúcleo comissural do NTS; SubPD: zona subpostremal dorsal; T: trato solitário; X: núcleo dorsal do vago; XII: núcleo hipoglosso. Extraído de Geerling e colaboradores (2006a).

## OBJETIVOS

Diante do que foi apresentado na introdução, sabemos que os mineralocorticóides estimulam o apetite ao sódio e que este efeito provavelmente seja resultado da ação central destes hormônios. Porém, ainda pouco se sabe sobre qual região do SNC os mineralocorticóides atuam para desencadear este comportamento. Os neurônios HSD2 do NTS estão estritamente relacionados ao apetite ao sódio e são os únicos neurônios identificados até o momento que são sensíveis e seletivos à aldosterona, as concentrações mais densas desses neurônios se localizam no NTS medial na borda do 4V.

Dessa forma, os objetivos principais desse estudo foram investigar:

- Se a infusão crônica de aldosterona no 4V é capaz de induzir o apetite ao sódio.
- Se a infusão crônica de aldosterona no VL é capaz de induzir o apetite ao sódio.
- Se a injeção de antagonista específico de MR (RU 28318) no 4V é capaz de reduzir ou bloquear a resposta de ingestão de sódio desencadeada pela diurese induzida por furosemida ou tratamento crônico com agonista mineralocorticóide ou privação de sódio.
- Se a injeção de antagonista específico de MR (RU 28318) no VL é capaz de reduzir ou bloquear a resposta de ingestão de sódio desencadeada pela diurese induzida por furosemida.

## MATERIAIS E MÉTODOS

### 1. Animais

Os estudos foram realizados em ratos Wistar Hannover com peso entre 280 – 350 g, obtidos do biotério central da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP-EPM). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), umidade (40 a 60%) e com ciclo claro/escuro de 12 horas. Todos os experimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo (processo 1805/07). Todo o esforço foi feito para evitar qualquer sofrimento aos animais e para minimizar o número de animais utilizados. Somente animais que apresentaram comportamento **semelhante** aos dos animais que não sofreram intervenções cirúrgicas foram utilizados neste trabalho, do contrário foram prontamente sacrificados.

### 2. Dieta

Antes do período experimental os animais foram mantidos constantemente com ração padrão (Nuvilab CR-1; Colombo, PR, Brasil) e água *ad libitum*. Animais que receberam infusão i.c.v. ou injeções periféricas de furosemida foram mantidos na dieta descrita acima e tiveram acesso também a NaCl (cloreto de sódio) 0,3 M *ad libitum* antes, durante e após os experimentos (exceto os animais que foram tratados com furosemida, no qual a comida e o NaCl 0,3 M foram removidos desde o momento das injeções até o momento do experimento no dia seguinte). Nos animais que receberam tratamento crônico com DOCA, o acesso a NaCl 0,3 M foi restrito a 2 horas por dia. O NaCl 0,3 M foi oferecido aos animais antes dos experimentos com o objetivo de adaptá-los e medir sua ingestão basal diária. Para o protocolo de

privação de sódio a dieta supracitada foi substituída por água destilada (dH<sub>2</sub>O) e ração hipossódica (0,005% de Na<sup>+</sup>; Prag Soluções Biociências, Jaú, SP, Brasil).

### **3. Implante de cânula guia em direção ao 4V**

Depois de anestesiados (quetamina 100 mg/kg, i.p.; Dopalen, Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil e xilazina 2% 10 mg/kg, i.p.; Sedafarm, Farmabase Saúde animal, Jaguariúna, SP, Brasil), os animais foram colocados em um aparelho estereotático para pequenos animais modelo 960 (David Kopf Instruments, Tujunga, CA, EUA). Após fixação da cabeça do animal por meio de duas barras auriculares, foi feita uma injeção subcutânea de 0,2 mL do anestésico local lidocaína contendo adrenalina (vasoconstritor) (Xylestesin 2%, Cristália, Itapira, SP, Brasil), a fim de reduzir o sangramento no campo cirúrgico. Após a assepsia da pele com solução PVPI (polivinilpirrolidona-iodo), a calota craniana foi exposta por meio de uma incisão longitudinal na pele e no tecido subcutâneo da cabeça. Em seguida, os pontos bregma e lambda foram localizados e tomados como referência para horizontalização da cabeça do animal no estereotático e dos parâmetros de implante. Três parafusos de aço inoxidável foram fixados na calota craniana. Então, uma cânula guia (20 mm ou 12 mm) de aço inoxidável foi introduzida no cerebelo através de um pequeno orifício aberto no crânio por trepanação (com fresa esférica acoplada a micromotor de baixa rotação) e dirigida ao 4V segundo as coordenadas: -12,8 mm no sentido anteroposterior, 0 mm lateral-lateral e -6,1 mm no sentido dorsoventral, todas em relação ao bregma (Paxinos e Watson, 1986). As cânulas foram fixadas ao crânio dos animais com resina acrílica autopolimerizante utilizando-se os parafusos previamente implantados como pontos de fixação. Após a completa fixação da cânula guia, a mesma foi fechada com um mandril (oclusor) de aço

inoxidável de 20 mm ou 12 mm até o momento da realização do experimento. Como medida profilática após a cirurgia todos os animais receberam uma dose de 0,2 mL (i.m.) de pentabiótico veterinário (1.200.000 UI; Fort- Dodge, Campinas, SP, Brasil) na pata posterior. Ao final da cirurgia, os animais foram engaiolados individualmente e foram mantidos por 8 a 10 dias em recuperação para início do protocolo. Durante o período de recuperação foram registrados diariamente os valores basais de ingestão de comida, água e NaCl 0,3 M.

#### **4. Implante de cânula guia em direção ao VL**

O mesmo procedimento acima descrito foi seguido para implantar a cânula guia em direção ao ventrículo lateral (VL) cerebral esquerdo. Foi implantada uma cânula guia de aço inoxidável de 17 mm, utilizando-se as seguintes coordenadas esterotáticas: - 0,3 mm no sentido anteroposterior, - 1,5 mm lateral a linha média, - 3,1 mm no sentido dorsoventral, todas em relação ao bregma e com a cabeça do animal horizontalizada (Paxinos e Watson, 1986). E a cânula guia foi mantida ocluída por um oclisor de aço inoxidável de 17 mm até o momento da realização do experimento. Ao final da cirurgia, os animais foram engaiolados individualmente e foram mantidos por 8 a 10 dias em recuperação para início do protocolo. Durante o período de recuperação foram registrados diariamente os valores basais de ingestão de comida, água e NaCl 0,3 M. Um dia antes do início do protocolo de infusão i.c.v., o posicionamento correto da cânula guia em direção ao VL foi avaliado pela medida de ingestão de água do animal estimulada por uma injeção i.c.v. de 10 ng de All no volume de 1 µL. A ingestão mínima de água esperada após a injeção i.c.v. de All foi estabelecida em 5 mL em até 15 minutos (Omouessi e cols., 2007). Animais que exibissem ingestão inferior a este limite seriam excluídos do experimento.

## **5. Infusão intracerebroventricular de aldosterona**

Após o período de recuperação os animais foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico (30 cm x 22 cm x 23 cm; Insight Equipamentos, Ribeirão Preto, SP, Brasil) para realização da infusão i.c.v. de aldosterona. As infusões foram realizadas por meio de um sistema de tubos de Teflon (0, 254 mm x 0, 508 mm; Scientific Commodities, Inc., Lake Havasu City, AZ, EUA) para infusão contínua que permite livre movimentação ao rato, como descrito anteriormente (Sakai e cols., 1986). Uma mola de aço inoxidável foi utilizada para proteger o tubo de Teflon de possíveis danos. Este sistema continha em uma de suas extremidades uma injetora de 22 mm (para infusões no 4V) ou 18,5 mm (para infusões no VL) que foi conectada a cânula guia previamente implantada no animal. A outra extremidade do sistema foi conectada a uma seringa de 100 µL (Hamilton, Reno, Nevada, EUA) que estava conectada a bomba de infusão (modelo YA-12; Braintree Scientific, Inc., Braintree, MA). A cada bomba de infusão foram conectadas duas seringas, o que permitiu a infusão de dois animais por bomba simultaneamente. Os animais foram mantidos na infusão por 6 dias consecutivos, nos quais diariamente mediu-se sua ingestão de comida, água e NaCl 0,3 M. O estado geral dos animais também foi avaliado diariamente e somente animais que se encontravam em perfeito estado geral foram mantidos na infusão, do contrário foram prontamente excluídos. E ao final do período de infusão os animais retornaram para gaiolas convencionais e sua ingestão continuou sendo registrada por mais 3 dias antes de serem sacrificados.

## **6. Injeções periféricas**

As injeções periféricas foram administradas por via subcutânea (s.c.) na região lateral do dorso do animal utilizando-se de agulha hipodérmica de 23 gauge

acoplada a seringa de 1 mL. O volume injetado variou de acordo com a droga utilizada e está descrito nos protocolos específicos.

## **7. Microinjeção intracerebroventricular**

As microinjeções i.c.v. foram realizadas com agulha injetora (30 gauge) conectada a um tubo PE-10 (Becton Dickinson and Company, 7 Loveton Circle Sparks, MD, EUA) de aproximadamente 15 cm e este a uma seringa Hamilton de 10  $\mu$ L, ambos preenchidos com água destilada. A agulha injetora foi construída de forma a ser facilmente inserida dentro da cânula guia e transpassá-la exatamente 2 mm (para 4V) ou 1,5 mm (para VL) para atingir o sítio de microinjeção. O volume de cada microinjeção i.c.v. foi de 2  $\mu$ L.

## **8. Teste de ingestão de 2 horas**

Para a realização do teste de ingestão de 2 horas os animais foram mantidos em gaiolas individuais, tiveram sua ração e água removidas e foram acopladas a gaiola duas buretas graduadas contendo água ou água destilada e NaCl 0,3 M de acordo com protocolos específicos descritos abaixo. O início do teste foi considerado a partir do momento em que o animal localizou as buretas. E durante 2 horas após o início do teste a ingestão dos animais foi registrada nos seguintes intervalos de tempos: 15, 30, 60, 90 e 120 minutos.

## **9. Drogas utilizadas**

- Acetato de desoxicorticosterona – DOCA (Sigma, St. Louis, MO, EUA): agonista de receptor mineralocorticóide; 2 mg/dia, injetado por via subcutânea (volume de 0,4 mL). Veículo: óleo vegetal.

- Aldosterona (Sigma, St. Louis, MO, EUA): hormônio esteróide; 1, 10 ou 100 ng/h infundida no 4V ou no VL, em uma taxa de infusão de 2  $\mu$ L/h. Veículo: 1% etanol-salina.
- Angiotensina II (Sigma, St. Louis, MO, EUA): hormônio peptídico; 10 ng injetado no VL (volume de 1  $\mu$ L). Veículo: solução salina (NaCl 0,9%).
- Furosemida (Hipolabor, Sabará. MG, Brasil): diurético; 10 mg/kg (volume de 0,1 mL/100 g), injetado por via subcutânea.
- RU 28318 (Tocris Bioscience, Ellisville, MO, EUA): antagonista seletivo de receptor mineralocorticóide; 100 ng ou 500 ng, injetado no 4V ou no VL (volume de 2  $\mu$ L). Veículo: 1% etanol-salina.

## **10. Protocolos experimentais**

### **10.1. Infusão crônica de aldosterona no 4V**

Após o período de recuperação da cirurgia cerebral (cerca de 8 dias), os animais com cânula guia implantada em direção ao 4V foram colocados individualmente em gaiolas de acrílico e submetidos à infusão i.c.v. de aldosterona ou veículo, como descrito acima. Para a construção da curva dose-resposta, os animais receberam a infusão de aldosterona nas doses de 1 ng/h, 10 ng/h ou 100 ng/h (n= 5/dose), e os animais controle receberam a infusão do veículo (1% etanol-salina; n= 5), por 6 dias consecutivos. A taxa de infusão foi de 2  $\mu$ L/h. Durante o período de infusão a ingestão diária de comida, água e NaCl 0,3 M dos animais foram registradas. E ao final do sexto dia de infusão os animais foram desconectados do sistema de infusão, pesados e retornaram as gaiolas

convencionais, e por mais 3 dias sua ingestão diária continuou sendo registrada a fim de avaliar o comportamento ingestivo com o término da infusão (figura 3).

As doses de aldosterona utilizadas neste protocolo foram baseadas no estudo prévio de Gomez-Sanchez (1986). Além disso, essas doses encontram-se próximas da escala dos valores de concentrações plasmáticas de aldosterona estimulados pela dieta com privação de sódio ( $297 \pm 104$  ng/dL) em ratos (Douglas e Catt, 1976).

### 10.2. Infusão crônica de aldosterona no VL

O protocolo de infusão i.c.v. nos animais com cânula guia implantada em direção ao VL foi realizado da mesma maneira como descrito no protocolo 10.1. As doses de aldosterona infundidas no VL foram 10 ng/h ou 100 ng/h ( $n= 4/$  dose) em uma taxa de infusão de 2  $\mu$ L/h por 6 dias consecutivos (figura 3).



**Figura 3:** Representação esquemática do protocolo de infusão crônica de aldosterona no 4V ou no VL.

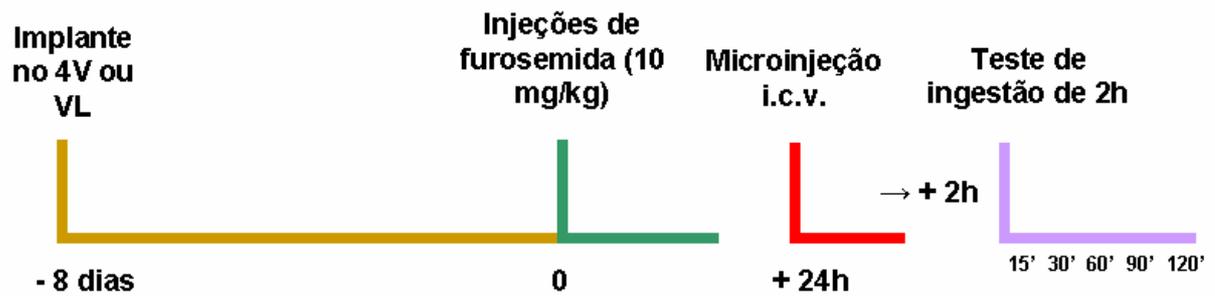
### 10.3. Depleção de sódio com furosemida e microinjeção intracerebroventricular de RU 28318

Os animais implantados previamente com cânula guia em direção ao 4V ( $n= 6$ ) ou ao VL ( $n= 6$ ) receberam duas injeções s.c. de furosemida, separadas por 30 minutos, na dose de 10 mg/kg no volume de 0,1 mL/100 gramas, aproximadamente

24 horas antes do protocolo específico. Após as injeções os animais foram mantidos em gaiolas individuais limpas, com água e privados de comida até o início do experimento. Na manhã seguinte após a depleção de sódio por furosemida, os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos, um grupo que recebeu uma microinjeção i.c.v. do antagonista de MR, RU 28318 (n= 6), e outro que recebeu veículo (1% etanol-salina; volume de 2  $\mu$ L) (n= 6). A dose de RU 28318 utilizada foi de 100 ng no volume de 2  $\mu$ L. Após 2 horas da realização da microinjeção i.c.v. os animais foram submetidos ao teste de ingestão de 2 horas (figura 4).

Os animais foram depletados de sódio por mais de uma vez, com intervalo de uma semana entre as depleções, sendo que a primeira depleção/experimento não foi considerada a fim de evitar possíveis erros de interpretação dos resultados, pois como já evidenciado na literatura, há aumento significativo no valor da ingestão de sódio conforme ocorrem depleções repetidas com furosemida, e a maior diferença ocorre entre a primeira e a segunda depleção (Sakai e cols., 1987; 1989). Todos os animais utilizados receberam tanto injeção de veículo como de antagonista em ordem aleatória, intercalando-as a cada semana, para compararmos as diferentes respostas obtidas em cada tratamento no mesmo animal.

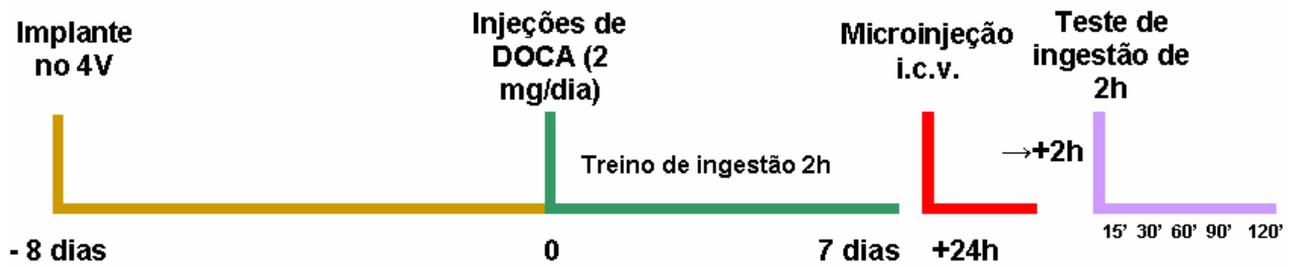
As doses de RU 28318 utilizadas neste protocolo e nos protocolos subsequentes foram baseadas no estudo prévio de Rahmouni e colaboradores (2002b).



**Figura 4:** Representação esquemática do protocolo de depleção de sódio com furosemida e microinjeção i.c.v. de RU 28318.

#### 10.4. Tratamento crônico com DOCA e microinjeção de RU 28318 no 4V

Os animais implantados previamente com cânula guia em direção ao 4V receberam diariamente uma injeção s.c. de DOCA na dose de 2 mg (volume de 0,4 mL) durante 7 dias consecutivos. Durante este período os animais foram mantidos com ração padrão, água e diariamente tinham acesso a uma bureta graduada contendo NaCl 0,3 M por um período de 2 horas, sempre no mesmo horário, em torno de 13:00 h. O objetivo foi condicionar os animais à presença dessa solução na gaiola por apenas este período de tempo e também para avaliarmos o desenvolvimento do apetite ao sódio ao longo dos dias. No dia seguinte após o término do período de 7 dias de tratamento com DOCA os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos, um grupo que recebeu uma microinjeção i.c.v. de RU 28318 (n= 7) e outro que recebeu veículo (1% etanol-salina) (n= 4). A dose de RU 28318 utilizada foi de 500 ng no volume de 2  $\mu$ L. Após 2 horas da realização da microinjeção i.c.v. os animais foram submetidos ao teste de ingestão de 2 horas, próximo ao horário em que se realizou o condicionamento (figura 5).



**Figura 5:** Representação esquemática do protocolo de tratamento crônico com DOCA e microinjeção de RU 28318 no 4V.

### 10.5. Privação de sódio crônica e microinjeção de RU 28318 no 4V

Os animais implantados previamente com cânula guia em direção ao 4V foram mantidos durante 9 dias no protocolo de privação de sódio, recebendo ração hipossódica (0,005% de  $\text{Na}^+$ ) e água destilada. Na manhã seguinte após o término de 9 dias de privação de sódio os animais foram aleatoriamente divididos em dois grupos, um grupo que recebeu uma microinjeção i.c.v. de RU 28318 ( $n=5$ ) e outro que recebeu veículo (1% etanol-salina) ( $n=4$ ). A dose de RU 28318 utilizada foi de 100 ng no volume de 2  $\mu\text{L}$ . Após 2 horas da realização da microinjeção i.c.v. os animais foram submetidos ao teste de ingestão de 2 horas (figura 6).



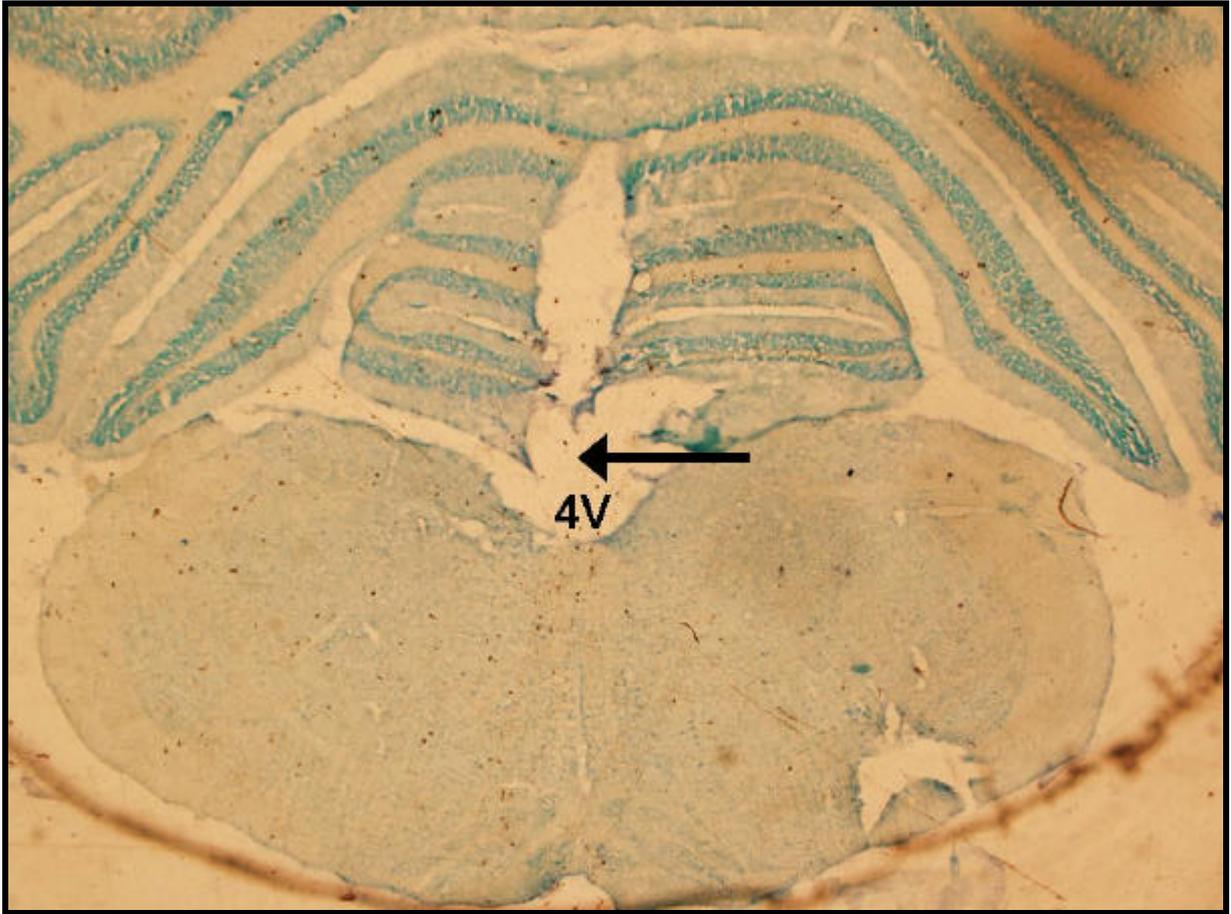
**Figura 6:** Representação esquemática do protocolo de privação de sódio crônica e microinjeção de RU 28318 no 4V.

## 11. Perfusão e histologia

Ao final de cada experimento, os animais foram profundamente anestesiados com dose letal de uretana (400 mg/mL, i.p.; Sigma, St. Louis, MO, EUA) e receberam uma nanoinjeção de azul de Evans (2%; volume de 100 nL) no 4V ou no VL e, então, foram submetidos a abertura da caixa torácica para exposição do coração e na sequência foi inserida uma agulha (18 gauge) para realização da perfusão transcardíaca, sendo infundida uma de solução de formalina 10%. Ao final da perfusão o encéfalo foi removido e posteriormente seccionado em micrótomo de congelamento. Os cortes histológicos (50  $\mu$ m) foram corados com coloração de Giemsa e a seguir analisados em microscopia óptica de campo claro. Somente os animais com confirmação histológica dos sítios de infusão ou microinjeção foram considerados neste estudo (figuras 7 e 8).

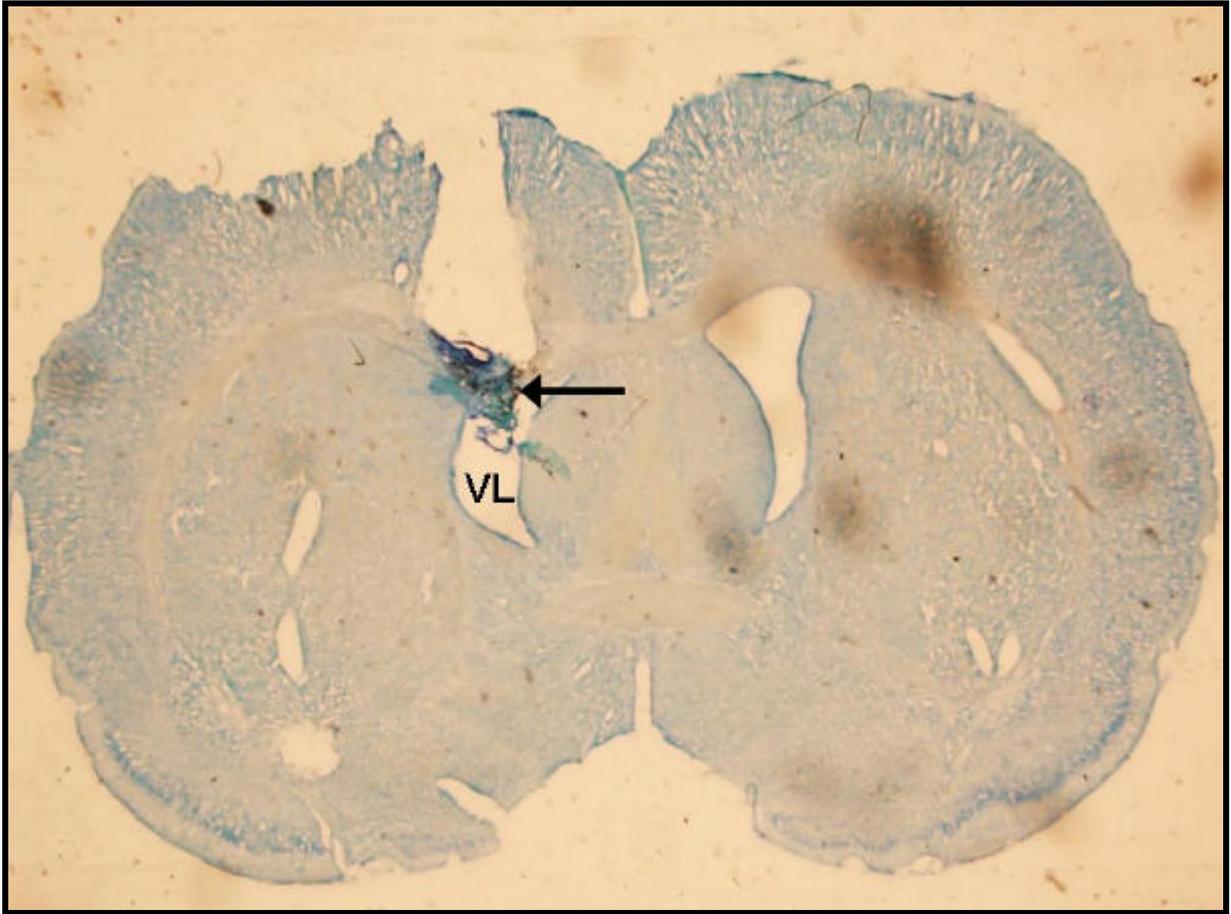
## 12. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SigmaStat 2.0 (Jandel Corporation, Point Richmond, CA, EUA). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e submetidos à análise de variância (ANOVA) de duas vias para medidas repetidas, quando se tratou de comparar dois tratamentos diferentes em um mesmo animal ou ANOVA de duas vias sem repetição, quando se tratou de comparar dois tratamentos diferentes em animais diferentes, ambas foram seguidas pelo pós-teste de Tukey. Dados provenientes de ensaios pareados foram comparados entre si pelo teste *t* pareado. As diferenças estatísticas foram aceitas como sendo significantes para  $p < 0,05$ .



**Figura 7:** Fotomicrografia de uma secção transversal do cerebelo e do bulbo mostrando o sítio de infusão ou microinjeção no 4V. A seta indica o local da infusão.

**Abreviação:** 4V: quarto ventrículo.



**Figura 8:** Fotomicrografia de uma secção transversal do prosencéfalo mostrando o sítio de infusão ou microrinjeção no VL. A seta indica o local da infusão. **Abreviação:** VL: ventrículo lateral.

## RESULTADOS

### 1. Efeitos da infusão crônica de aldosterona no 4V sobre o apetite ao sódio de ratos

Os ratos implantados com cânula guia em direção ao 4V foram mantidos durante 6 dias em infusão contínua de aldosterona (1, 10 ou 100 ng/h) ou de seu veículo (1% etanol-salina; controle) (n= 5 /grupo) e diariamente tiveram sua ingestão de comida, água e NaCl 0,3 M medidas a fim de avaliar possível efeito mediado pela aldosterona sobre o comportamento ingestivo desses animais. A figura 9 mostra o efeito da infusão de diferentes doses de aldosterona ou de seu veículo no 4V sobre a ingestão de sódio. A infusão crônica de veículo não alterou a ingestão de sódio dos ratos quando comparada ao seu valor basal (veículo vs. basal, [F(1,4)= 3,771;  $p > 0,05$ ]). No entanto, a infusão de aldosterona 1, 10 ou 100 ng/h alterou significamente a ingestão basal de sódio (1 ng/h vs. basal, [F(1,4)= 7,762;  $p < 0,05$ ]; 10 ng/h vs. basal, [F(1,4)= 8,969;  $p < 0,05$ ]; 100 ng/h vs. basal, [F(1,4)= 158,36;  $p < 0,001$ ]). A infusão crônica de 10 ou 100 ng/h de aldosterona promoveu substancial aumento na ingestão de sódio (chegando até  $45,8 \pm 14,9$  e  $129,8 \pm 5,5$  mL/24 h, respectivamente) (figura 9), que foi estatisticamente significante quando comparado ao veículo [F(3,96)= 126,731; 10 ng/h vs. veículo,  $p < 0,001$ ; 100 ng/h vs. veículo,  $p < 0,001$ ] e a dose de 1 ng/h [F(3,96)= 126,731; 10 ng/h vs. 1 ng/h,  $p < 0,001$ ; 100 ng/h vs. 1 ng/h,  $p < 0,001$ ]. Essa robusta ingestão de sódio desenvolvida em animais que receberam a infusão de 10 ou 100 ng/h, mostrou ser dependente de dose, pois a ingestão de sódio apresentada pelo grupo de animais que recebeu a infusão de 100 ng/h foi estatisticamente superior a ingestão do grupo que recebeu a dose de 10 ng/h [F(3,96)= 126,731;  $p < 0,001$ ]. Essa diferença na ingestão de sódio entre os

dois grupos (10 ou 100 ng/h) se tornou estatisticamente significativa a partir do terceiro dia de infusão e se manteve assim até o término (sexto dia). Além disso, a latência para o aparecimento dessa resposta também foi menor conforme o aumento da dose (figura 9), ou seja, ratos que receberam a infusão de 100 ng/h apresentaram aumento precoce na ingestão de sódio em relação ao grupo que recebeu a infusão da dose de 10 ng/h. Ambas as doses mostraram tendência em elevar a ingestão de sódio após as primeiras 24 horas do início da infusão (figura 9). Porém, no grupo que recebeu a dose de 100 ng/h esse aumento se tornou estatisticamente significativo em relação ao grupo controle [ $F(15,96)= 10,905$ ;  $p < 0,001$ ] e ao grupo infundido com a dose de 1 ng/h [ $F(15,96)= 10,905$ ;  $p < 0,001$ ] a partir de terceiro dia de infusão, mantendo-se assim até o término (sexto dia). E o grupo infundido com a dose de 10 ng/h a ingestão de sódio se tornou estatisticamente significativa em relação ao grupo controle [ $F(15,96)= 10,905$ ;  $p < 0,001$ ] e ao grupo que recebeu a dose de 1 ng/h [ $F(15,96)= 10,905$ ;  $p = 0,001$ ] a partir do quarto dia de infusão e também se manteve assim até o término. A ingestão de sódio promovida pela dose de 100 ng/h apresentou padrão de aumento progressivo do volume ingerido ao longo do tempo a partir do segundo dia de infusão, e esse aumento foi estatisticamente significativo até o quinto dia de infusão [ $F(5,96)= 24,827$ ; dia 6 vs. dia 2,  $p < 0,001$ ; dia 6 vs. dia 3,  $p < 0,001$ ; dia 6 vs. dia 4,  $p < 0,05$ ; dia 6 vs. dia 5,  $p > 0,05$ ] (figura 9). A dose de 10 ng/h não provocou aumento progressivo ao longo do tempo no volume ingerido, ao contrário, após o aumento significativo na ingestão de sódio a partir do quarto dia de infusão, a quantidade ingerida diariamente se manteve estável até o término da infusão [ $F(5,96)= 24,827$ ; dia 6 vs. dia 4,  $p > 0,05$ ; dia 6 vs. dia 5,  $p > 0,05$ ; dia 5 vs. dia 4,  $p > 0,05$ ] (figura 9). Outro achado muito interessante apareceu após o término da infusão, pois o aumento dependente de

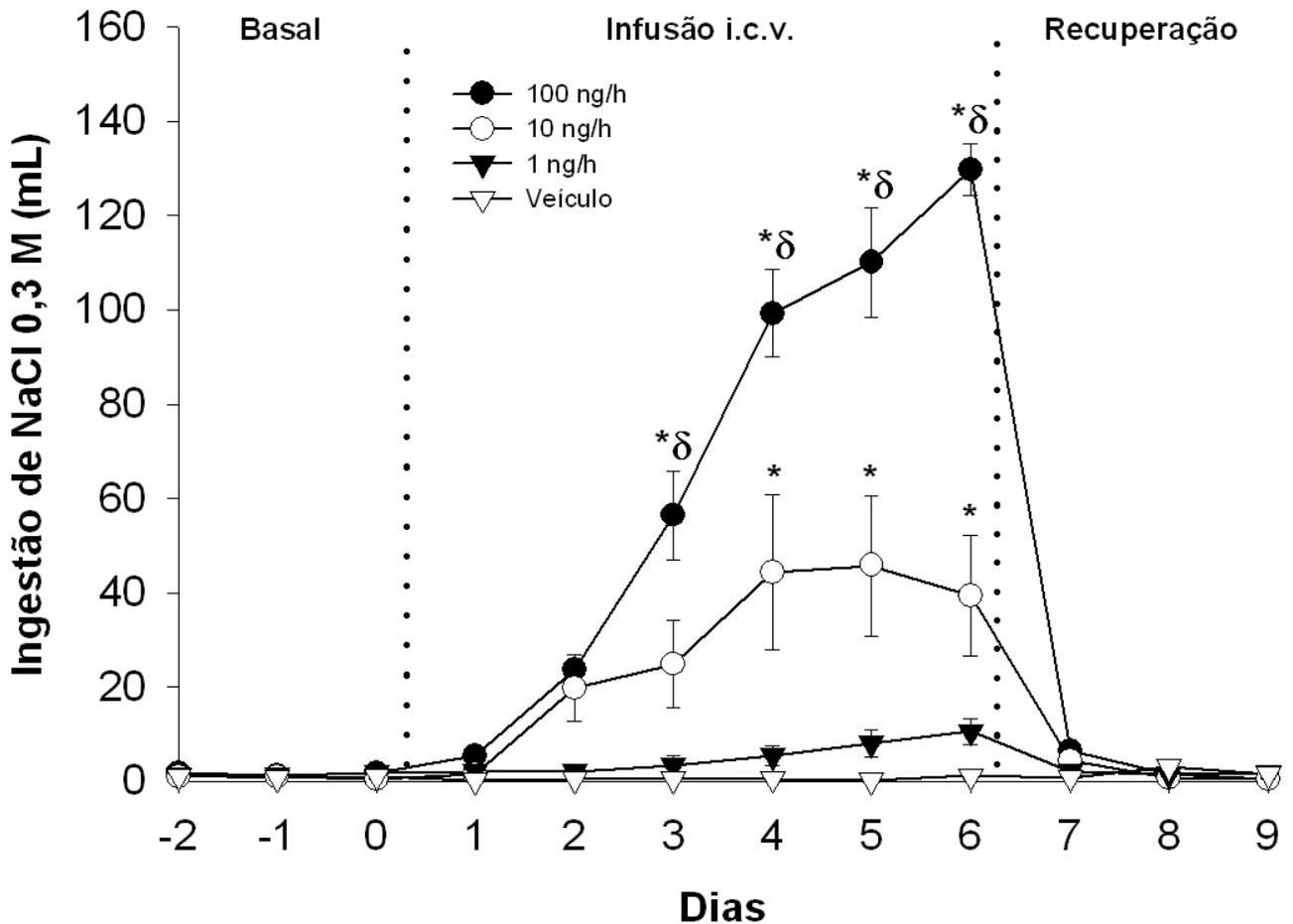
dose na ingestão de sódio estimulado pela infusão de aldosterona no 4V foi bruscamente reduzido para próximo dos valores basais logo após o término da infusão (dias 7, 8 e 9, figura 9). Com relação à dose de 1 ng/h, esta não se mostrou estatisticamente diferente do veículo [ $F(3,96)= 126,731$ ;  $p > 0,05$ ] quando comparou-se simultaneamente os quatro grupos (veículo, 1 ng/h, 10 ng/h e 100 ng/h) (figura 9).

Com relação à ingestão de água, houve redução nos grupos de animais que receberam as doses mais altas de aldosterona (figura 10). Os animais dos grupos que receberam a infusão de 10 ou 100 ng/h apresentaram redução na ingestão de água que foi estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle [ $F(3,96)= 12,254$ ; 10 ng/h vs. veículo,  $p < 0,001$ ; 100 ng/h vs. veículo,  $p < 0,05$ ] e ao grupo que recebeu a dose de 1 ng/h [ $F(3,96)= 12,254$ ; 10 ng/h vs. 1 ng/h,  $p < 0,001$ , 100 ng/h vs. 1 ng/h,  $p = 0,001$ ]. Porém, esta resposta não mostrou ser dependente de dose, pois não houve diferença significativa na ingestão de água entre os grupos que receberam as doses de 10 ou 100 ng/h [ $F(3,96)= 12,254$ ;  $p > 0,05$ ]. No entanto, como pode ser observado na figura 10, o pós-teste de Tukey não foi capaz de indicar precisamente em qual (is) dia (s) de infusão a dose de 100 ng/h reduziu significativamente a ingestão de água em relação ao grupo infundido com 1 ng/h e veículo.

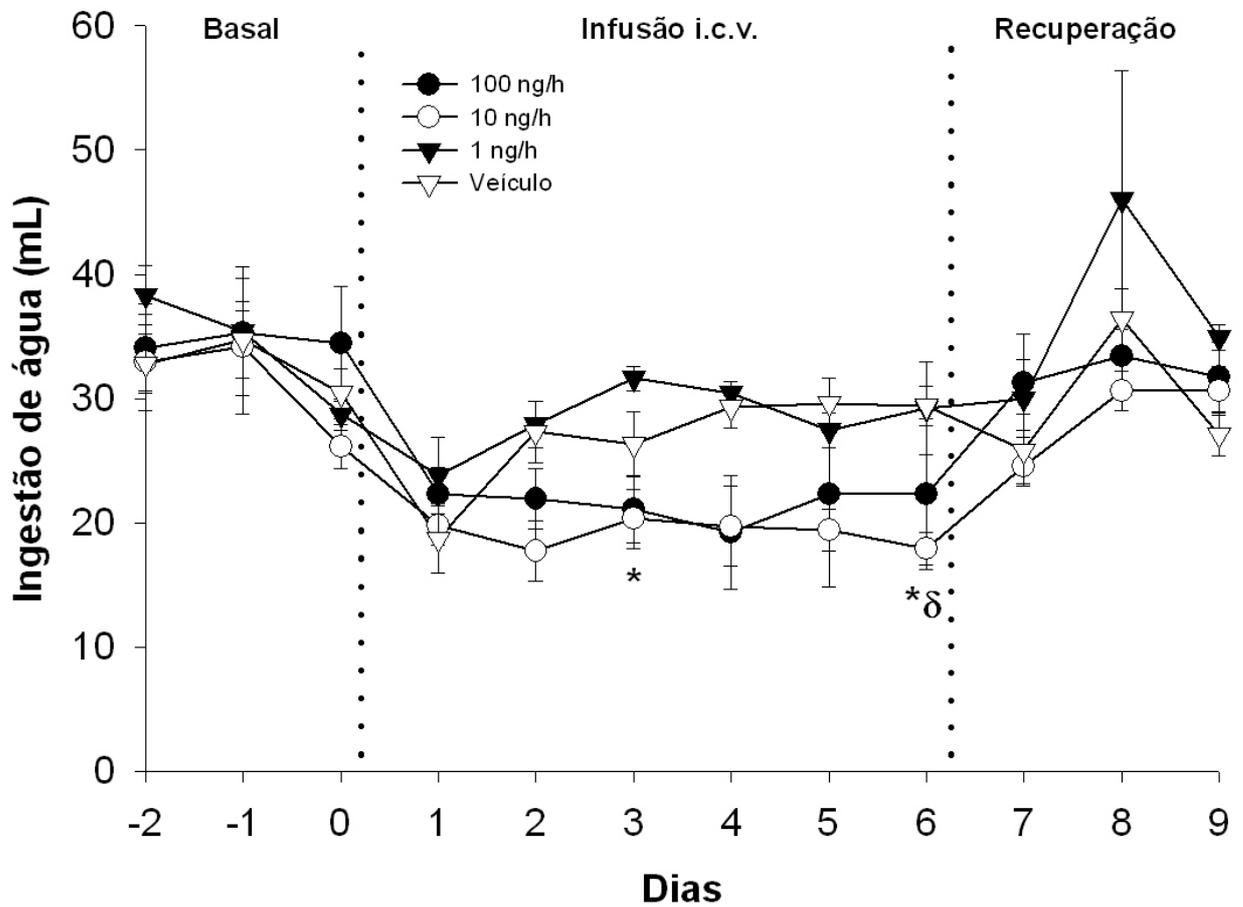
A ingestão de comida não foi alterada pela infusão de aldosterona (1, 10 ou 100 ng/h) no 4V em relação ao grupo controle [ $F(3,96)= 0,139$ ;  $p > 0,05$ ] (figura 11).

A tabela 1 mostra as diferenças entre os valores médios do peso corporal dos animais no dia do início da infusão de aldosterona ou veículo no 4V e imediatamente após o término da infusão. O teste *t* pareado não mostrou diferença estatisticamente significativa entre os pesos antes (basal) e após as infusões, tanto para as três

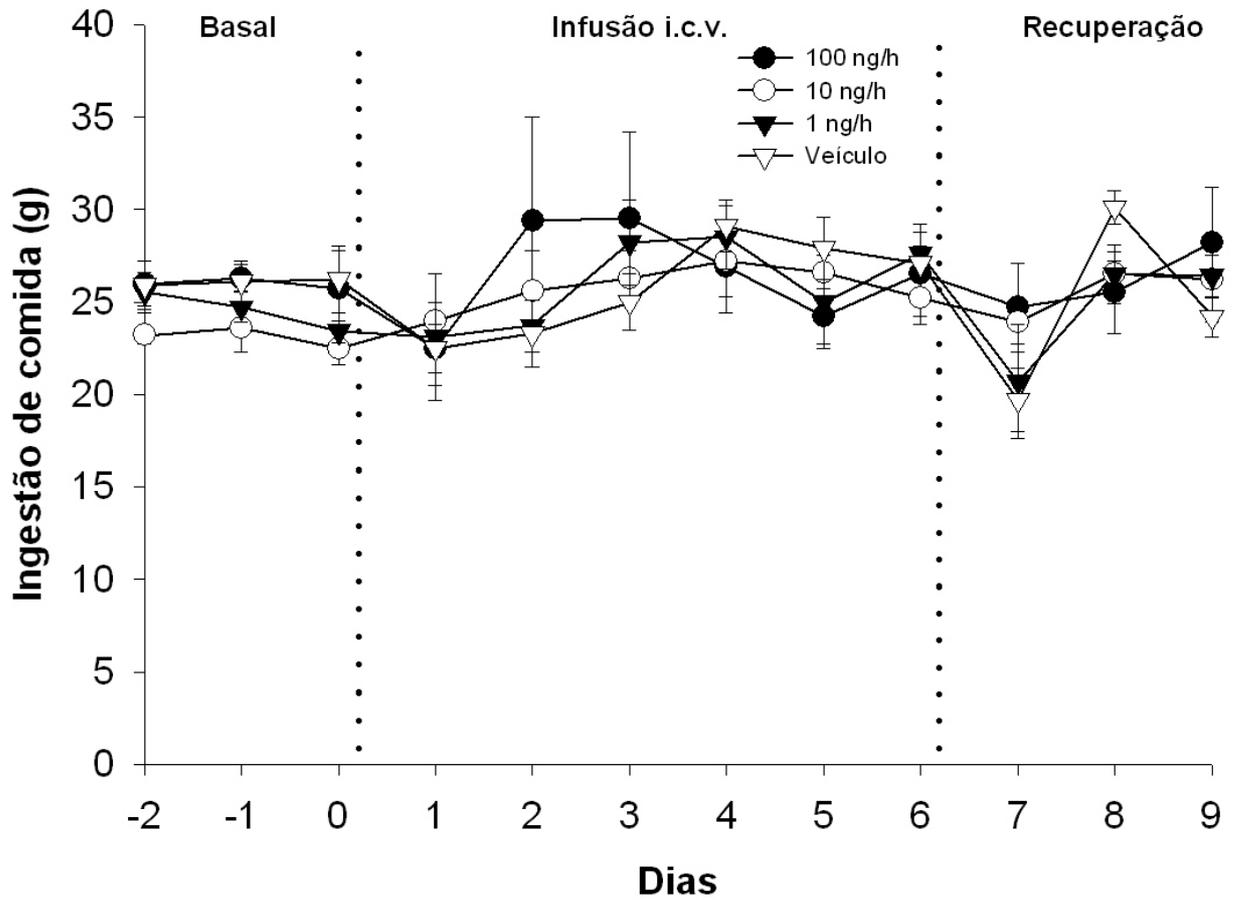
doses de aldosterona (1 ng/h vs. basal,  $p > 0,05$ ; 10 ng/h vs. basal,  $p > 0,05$ ; 100 ng/h vs. basal,  $p > 0,05$ ) quanto para o veículo (vs. basal,  $p > 0,05$ ).



**Figura 9:** Ingestão de NaCl 0,3 M antes (basal), durante (infusão i.c.v.) e após (recuperação) a infusão de aldosterona (1, 10 ou 100 ng/h;  $n = 5$ /dose) ou veículo (1% etanol-salina;  $n = 5$ ) no 4V. \* Diferente de veículo e de 1 ng/h ( $p < 0,001$ ).  $\delta$  Diferente de 10 ng/h ( $p < 0,001$ ); ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



**Figura 10:** Ingestão de água antes (basal), durante (infusão i.c.v.) e após (recuperação) a infusão de aldosterona (1, 10 ou 100 ng/h; n= 5/dose) ou veículo (1% etanol-salina; n= 5) no 4V. \* Diferente de 1 ng/h ( $p < 0,001$ ).  $\delta$  Diferente de veículo ( $p < 0,001$ ); ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



**Figura 11:** Ingestão de comida antes (basal), durante (infusão i.c.v.) e após (recuperação) a infusão de aldosterona (1, 10 ou 100 ng/h; n= 5/dose) ou veículo (1% etanol-salina; n= 5) no 4V. ANOVA de duas vias não encontrou diferenças significantes ( $p > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

## 2. Efeitos da infusão crônica de aldosterona no VL sobre o apetite ao sódio de ratos

Ratos implantados previamente com cânula guia em direção ao VL receberam a infusão por 6 dias das doses de aldosterona que foram capazes de estimular a ingestão de sódio quando infundidas no 4V, ou seja, 10 ng/h (n= 4) ou 100 ng/h (n= 4). Surpreendentemente, a infusão crônica de aldosterona (10 ou 100 ng/h) no VL não foi capaz de modificar a ingestão basal de NaCl 0,3 M dos ratos (10 ng/h vs. basal, [F(1,3)= 0,371; p> 0,05]; 100 ng/h vs. basal, [F(1,3)= 0,519; p> 0,05]) (figura 12). Ademais, não houve diferença significativa no valor da ingestão de sódio entre as duas doses infundidas no VL (10 ng/h vs. 100 ng/h, [F(1,36)= 0,546; p> 0,05]) (figura 12).

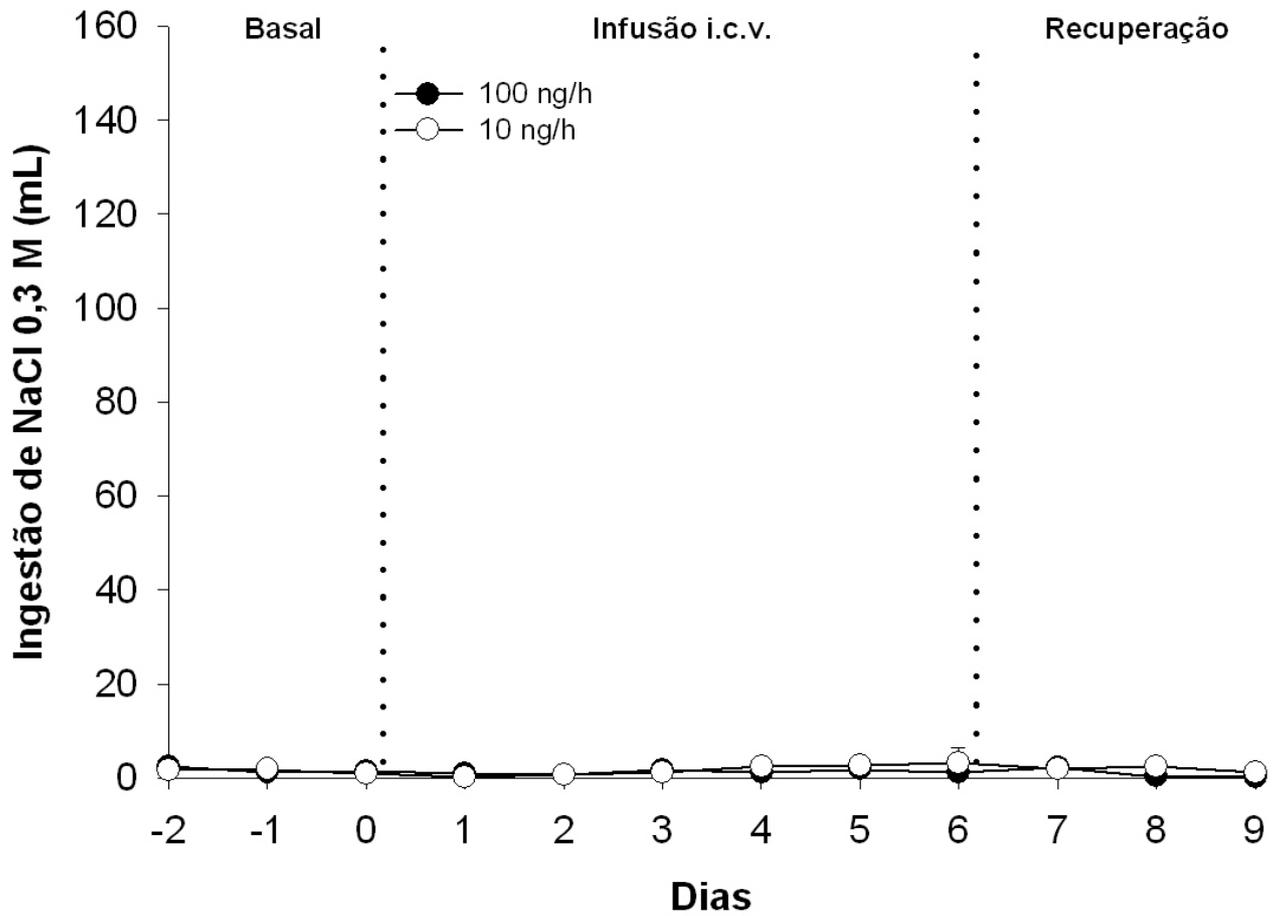
A infusão de aldosterona no VL também não foi capaz de modificar as ingestões basais de água (10 ng/h vs. basal, [F(1,3)=2,72; p> 0,05]; 100 ng/h vs. basal, [F(1,3)= 2,172; p> 0,05]) ou comida (10 ng/h vs. basal, [F(1,3)= 2,249; p> 0,05]; 100 ng/h vs. basal, [F(1,3)= 5,678; p> 0,05]) (figuras 13 e 14).

A tabela 1 mostra as diferenças entre os valores médios do peso corporal dos animais no dia do início da infusão de aldosterona no VL e imediatamente após o término da infusão. O teste *t* pareado não mostrou diferença significativa entre os pesos antes (basal) e após as infusões de aldosterona (10 ng/h vs. basal, p> 0,05; 100 ng/h vs. basal, p> 0,05).

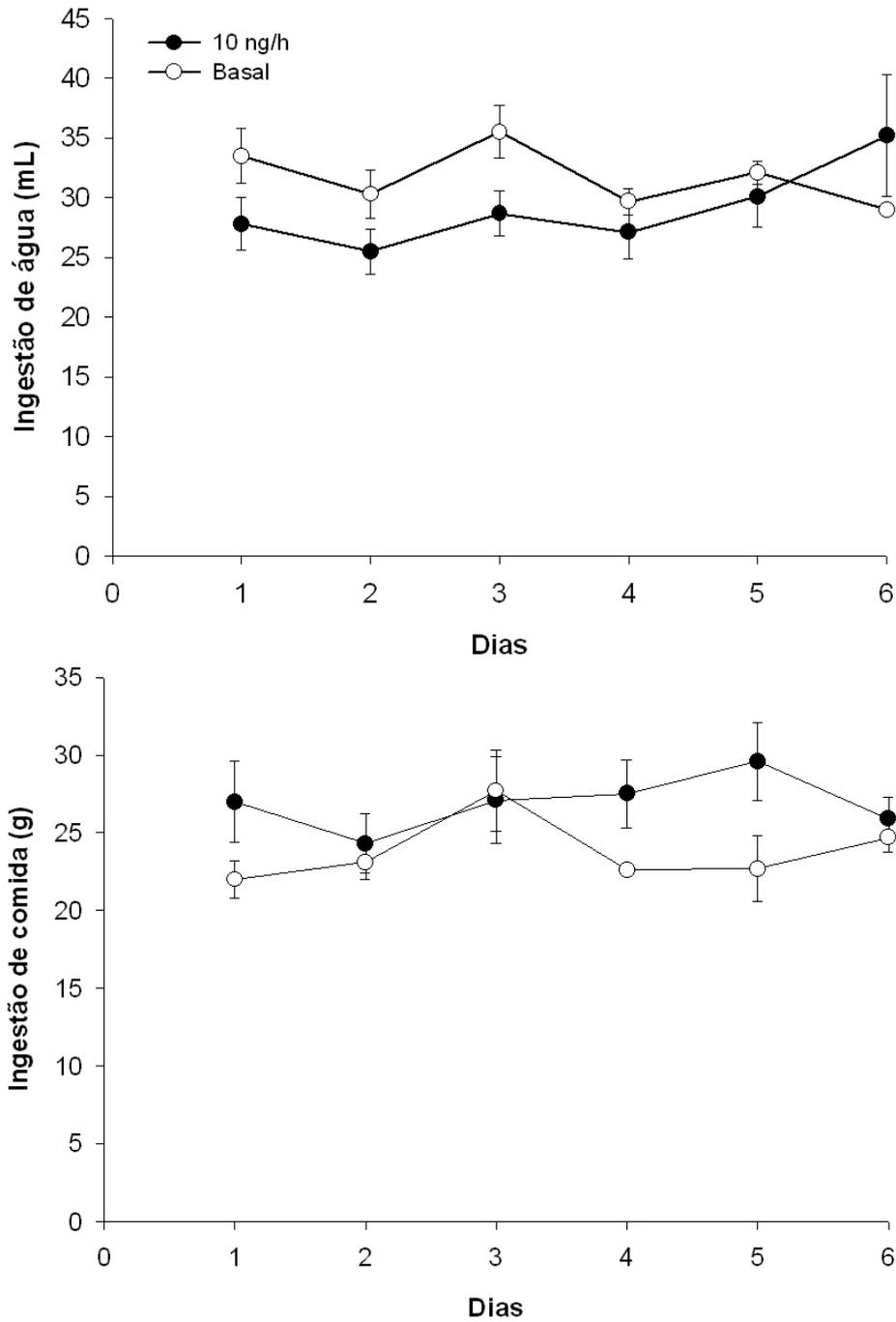
**Tabela 1.** Comparação entre os pesos corporais antes e após a infusão i.c.v. de aldosterona

<b>4V</b>	<b>Peso inicial (g)</b>	<b>Peso final (g)</b>	<b>p*</b>
Veículo (5)	347 ± 11	346 ± 10	> 0,05
Aldo 1 ng/h (5)	343 ± 11	356 ± 9	> 0,05
Aldo 10 ng/h (5)	330 ± 15	325 ± 16	> 0,05
Aldo 100 ng/h (5)	320 ± 9	313 ± 12	> 0,05
<b>VL</b>			
Aldo 10 ng/h (4)	296 ± 6	310 ± 6	> 0,05
Aldo 100 ng/h (4)	290 ± 4	298 ± 8	> 0,05

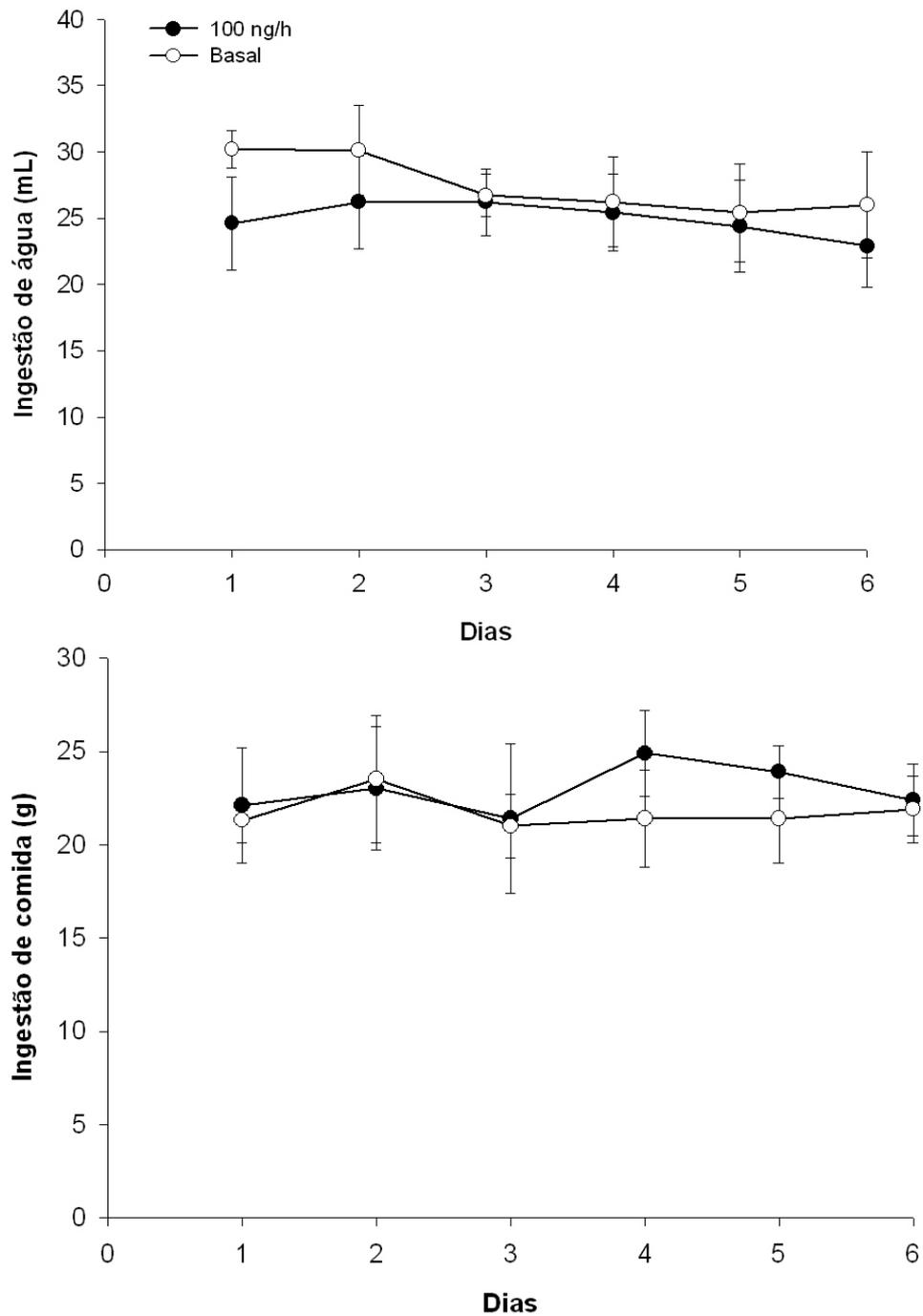
Os resultados estão expressos como média ± EPM. Os valores entre parênteses representam o número de animais em cada grupo. Aldo: aldosterona. Peso inicial: indica o peso do animal no dia de início da infusão i.c.v. Peso final: indica o peso do animal no dia do término da infusão i.c.v. \* Teste *t* pareado.



**Figura 12:** Ingestão de NaCl 0,3 M antes (basal), durante (infusão i.c.v.) e após (recuperação) a infusão de aldosterona (10 ou 100 ng/h; n= 4/dose) no VL. ANOVA de duas vias não encontrou diferenças significantes ( $p > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



**Figura 13:** Comparação entre os valores de ingestão de água (gráfico superior) e comida (gráfico inferior) antes (basal) e durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL. ANOVA de duas vias para medidas repetidas não encontrou diferenças significantes ( $p > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



**Figura 14:** Comparação entre os valores de ingestão de água (gráfico superior) e comida (gráfico inferior) antes (basal) e durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL. ANOVA de duas vias para medidas repetidas não encontrou diferenças significantes ( $p > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

### **3. Efeitos da microinjeção intracerebroventricular de RU 28318 sobre o apetite ao sódio induzido por furosemida**

Os animais foram depletados de sódio com o uso do diurético furosemida de acordo com o método descrito anteriormente e após cerca de 24 horas receberam uma microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L do antagonista de MR RU 28318 ou de seu veículo (1% etanol-salina). Após o período de 2 horas da administração da droga a ingestão de sódio foi avaliada por meio do teste de ingestão de 2 horas. Os mesmos animais foram testados em ambos os grupos (controle e antagonista) de maneira aleatória, com intervalo de uma semana entre os testes.

Ao início do teste de ingestão todos os animais estavam alertas e responsivos a estímulos.

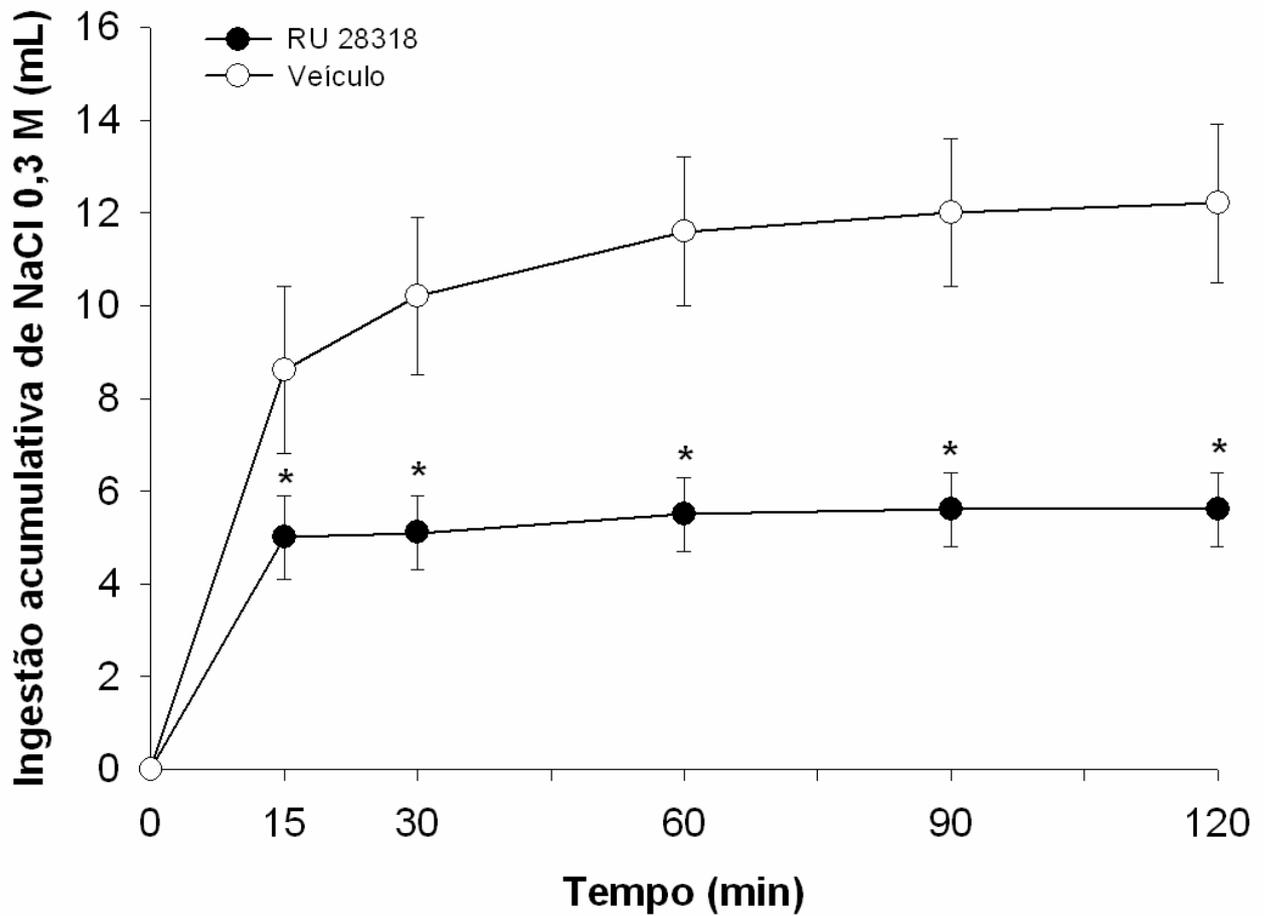
#### **3.1. Efeitos da microinjeção de RU 28318 no 4V sobre o apetite ao sódio induzido por furosemida**

A microinjeção do antagonista de MR no 4V (n= 6) foi capaz de reduzir significativamente a ingestão total de NaCl 0,3 M em relação aos animais que receberam a injeção de veículo (n= 6) ( $5,6 \pm 0,8$  vs.  $12,2 \pm 1,7$  mL/2 h, respectivamente; [F(1,5)=22,539;  $p < 0,05$ ]) (figura 15). Ao dividirmos o teste de ingestão em cinco tempos (15, 30, 60, 90 e 120 minutos), observamos que a ingestão acumulativa dos animais do grupo controle foi estatisticamente superior ao grupo que recebeu o antagonista de MR em todos os tempos (figura 15). A ingestão de água não foi diferente entre os dois grupos (antagonista:  $0,2 \pm 0,1$  vs. veículo:  $1,9 \pm 1,3$  mL/2 h; [F(1,5)= 1,715;  $p > 0,05$ ]) (figura16).

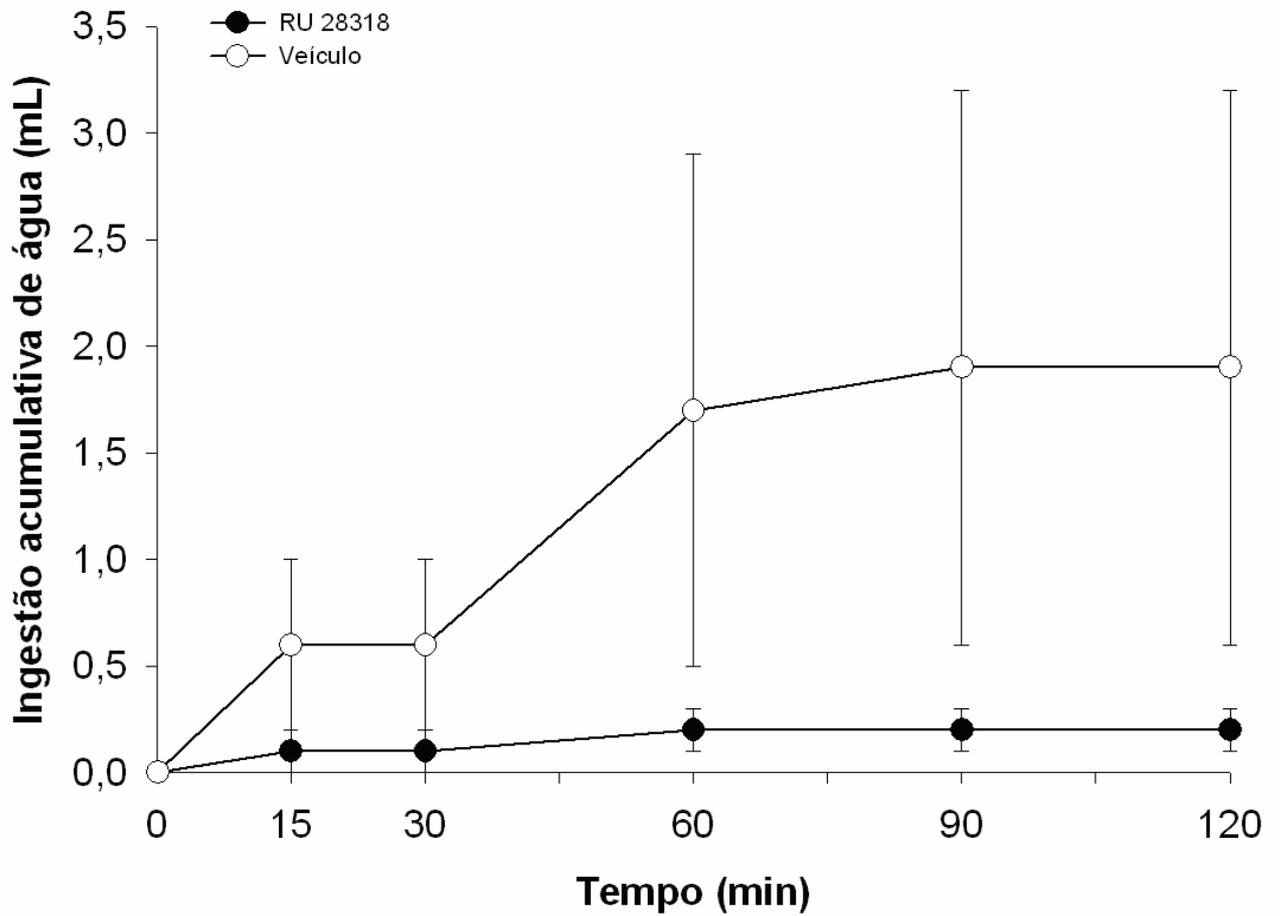
A ingestão de sódio foi medida após 24 horas da realização do teste de ingestão e 4 dos 6 animais tratados com RU 28318 apresentaram apetite ao sódio (ver tabela 59 no apêndice).

### **3.2. Efeitos da microinjeção de RU 28318 no VL sobre o apetite ao sódio induzido por furosemida**

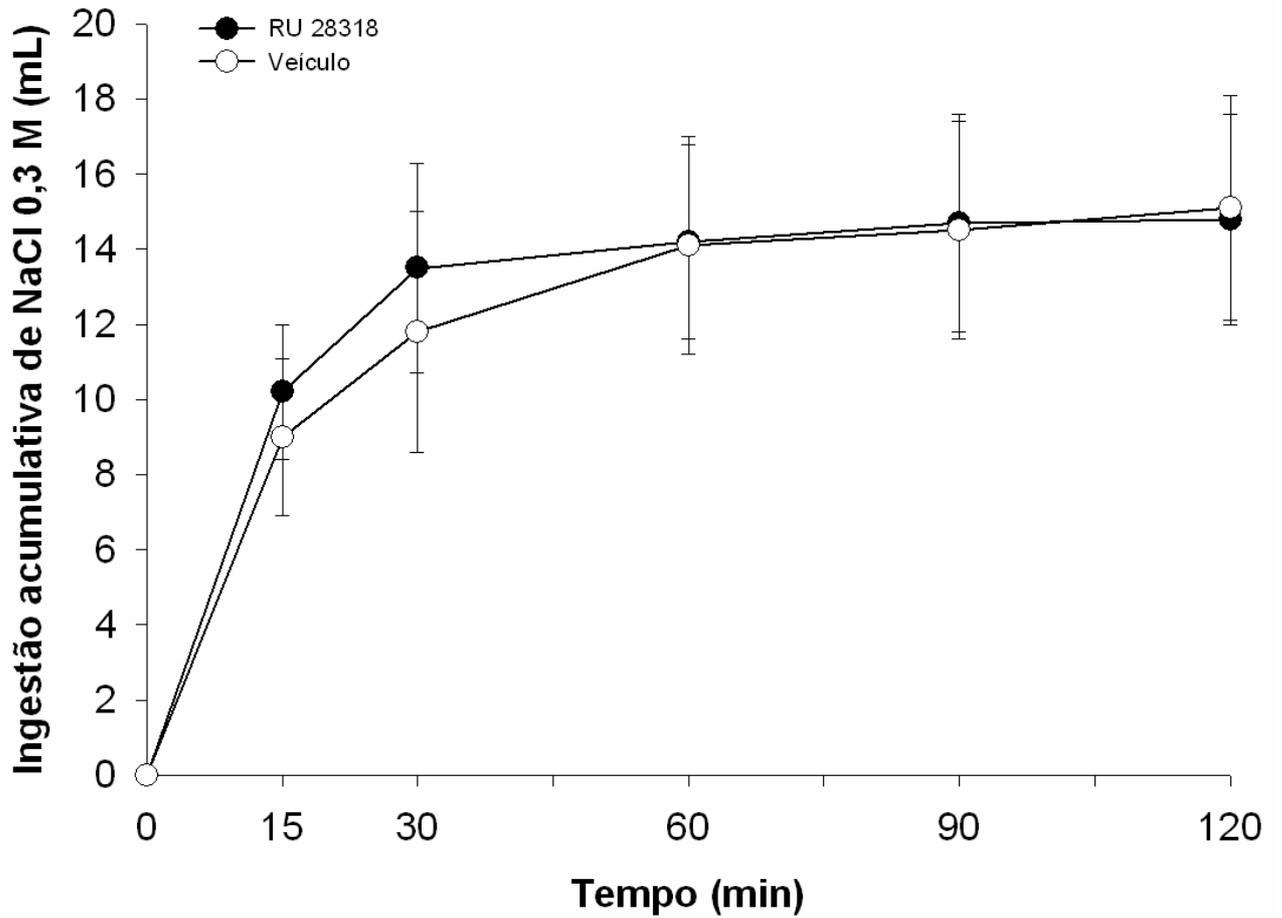
A microinjeção do antagonista de MR ou de seu veículo no VL de ratos (n= 6 /grupo) não foi capaz de modificar a ingestão de NaCl 0,3 M promovida pela depleção de sódio com furosemida (antagonista:  $14,8 \pm 2,8$  vs. veículo:  $15,1 \pm 3$  mL/2 h; [F(1,5)= 0,186;  $p > 0,05$ ]) (figura 17). A ingestão de água também não foi diferente entre os dois grupos (antagonista:  $2,8 \pm 1,6$  vs. veículo:  $1,4 \pm 0,6$  mL/2 h; [F(1,5)= 0,562;  $p > 0,05$ ]) (figura 18).



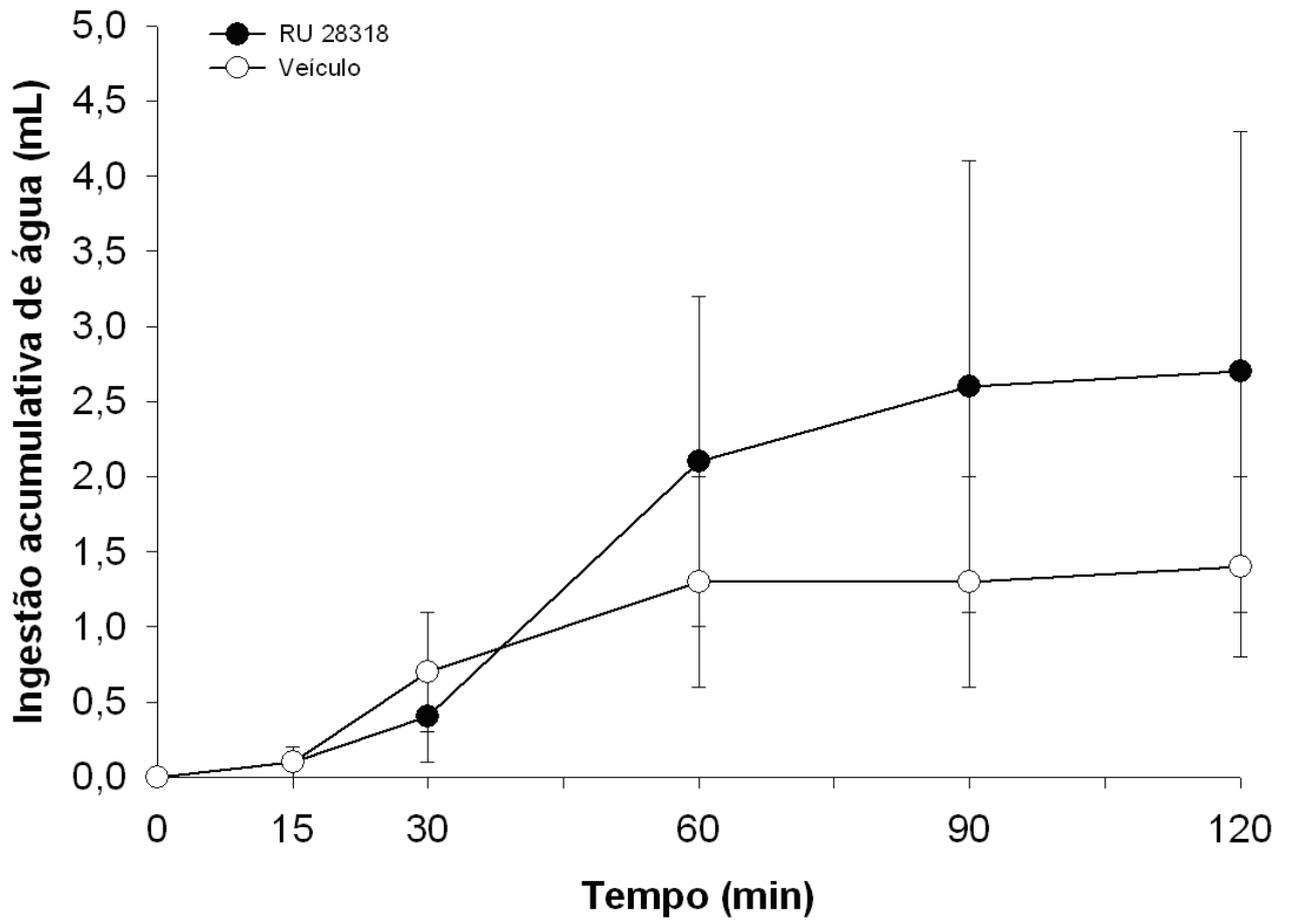
**Figura 15:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M induzida por furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 6) ou veículo (1% etanol-salina; n= 6) no 4V. \* Diferente de veículo ( $p < 0,05$ ); ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



**Figura 16:** Ingestão acumulativa de água após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 6) ou veículo (1% etanol-salina; n= 6) no 4V. ANOVA de duas vias para medidas repetidas não mostrou diferenças significantes ( $p > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



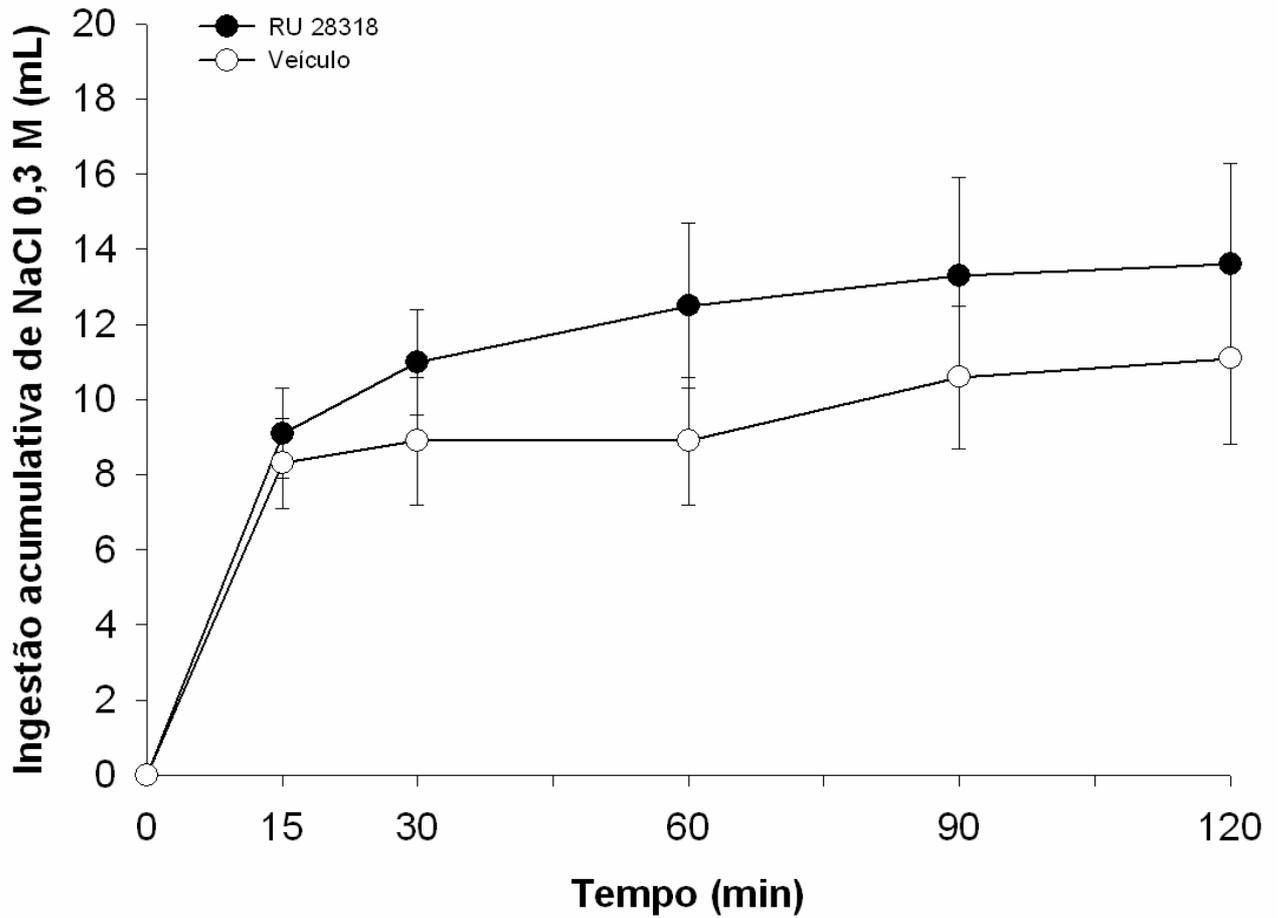
**Figura 17:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M induzida por furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 6) ou veículo (1% etanol-salina; n= 6) no VL. ANOVA de duas vias para medidas repetidas não mostrou diferenças significantes ( $p > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



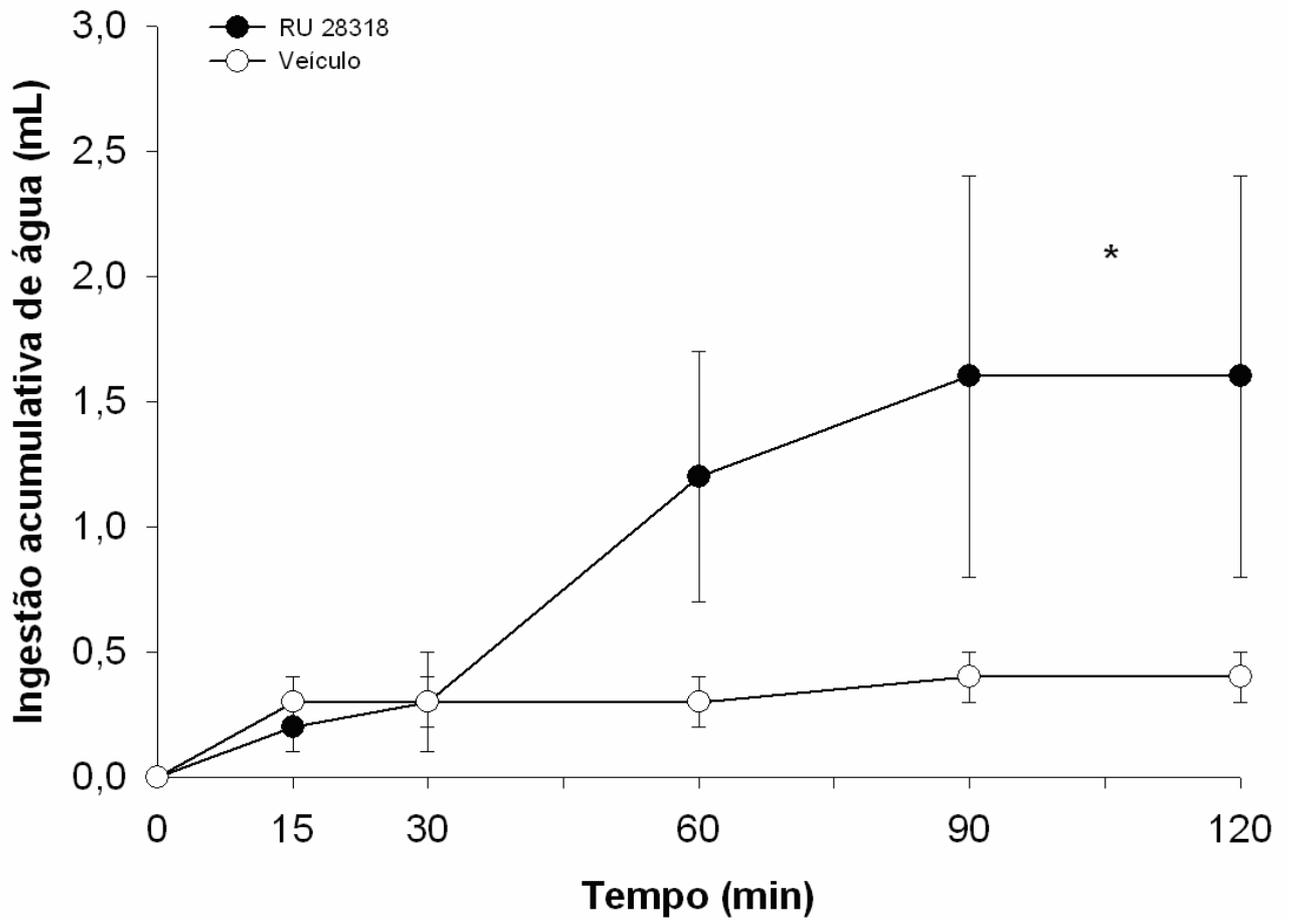
**Figura 18:** Ingestão acumulativa de água após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 6) ou veículo (1% etanol-salina; n= 6) no VL. ANOVA de duas vias para medidas repetidas não mostrou diferenças significantes ( $p > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

#### **4. Efeitos da microinjeção intracerebroventricular de RU 28318 sobre o apetite ao sódio induzido por DOCA**

Ratos implantados com cânula guia em direção ao 4V foram tratados por 7 dias consecutivos com injeções s.c. de 2 mg/dia de DOCA, na manhã do oitavo dia receberam uma microinjeção i.c.v. de 500 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 7) ou veículo (n= 4). Após o período de 2 horas da microinjeção i.c.v. a ingestão de sódio foi avaliada por meio do teste de ingestão de 2 horas. Surpreendentemente, a microinjeção de antagonista de MR no 4V de ratos tratados com DOCA não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M nesses animais (antagonista:  $13,6 \pm 2,7$  vs. veículo:  $11,1 \pm 2,3$  mL/2 h; [F(1,45)= 2,866;  $p > 0,05$ ]) (figura 19). A ingestão de água foi estatisticamente superior no grupo tratado com o antagonista (antagonista:  $1,6 \pm 0,8$  vs. veículo:  $0,4 \pm 0,1$  mL/2 h; [F(1,45)= 4,245;  $p < 0,05$ ]) (figura 20).



**Figura 19:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M induzida por DOCA após 2 horas da microinjeção de 500 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 7) ou veículo (1% etanol-salina; n= 4) no 4V. ANOVA de duas vias não mostrou diferenças significantes ( $p > 0,05$ ). Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

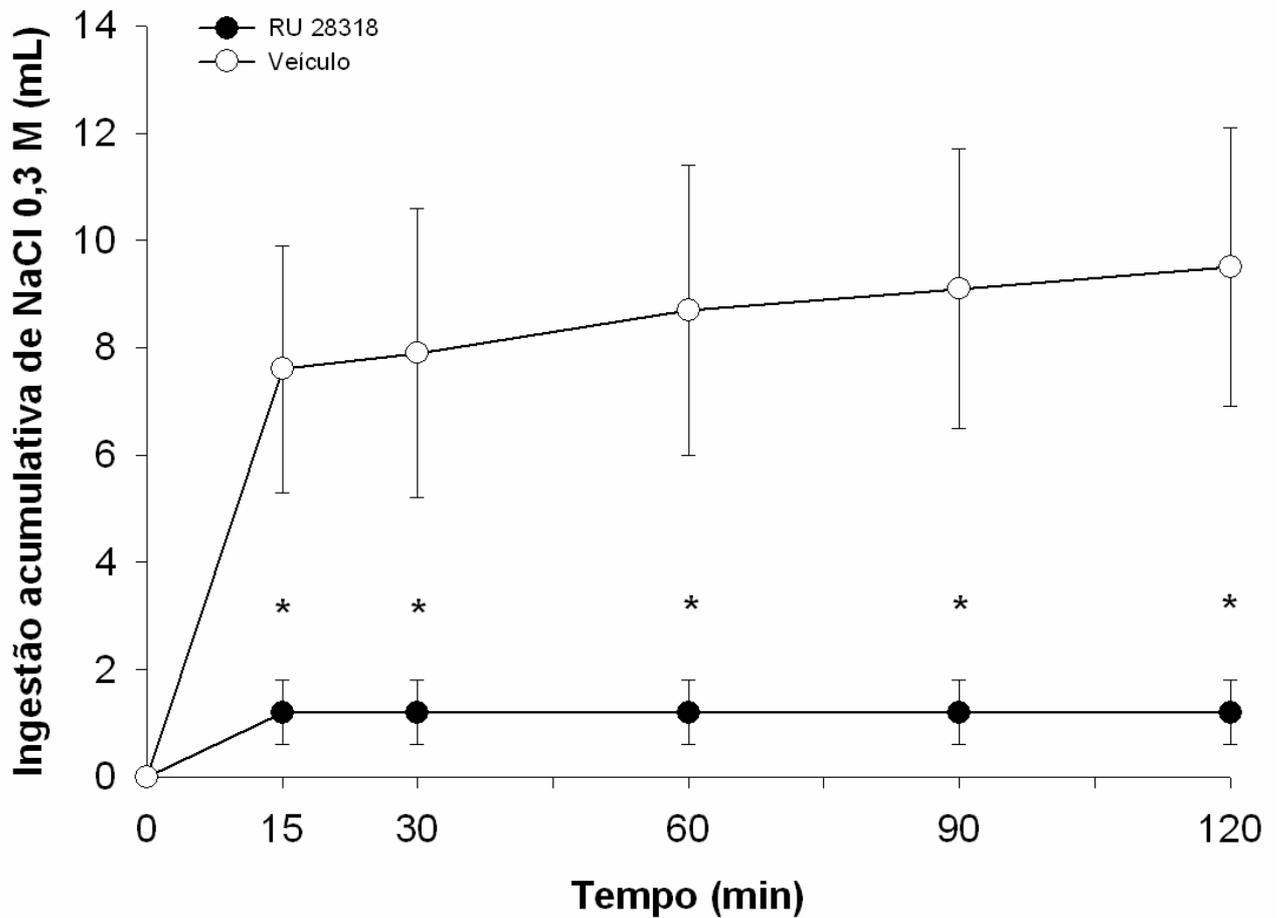


**Figura 20:** Ingestão acumulativa de água nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de 500 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 7) ou veículo (1% etanol-salina; n= 4) no 4V. \* Diferente de veículo ( $p < 0,05$ ); ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

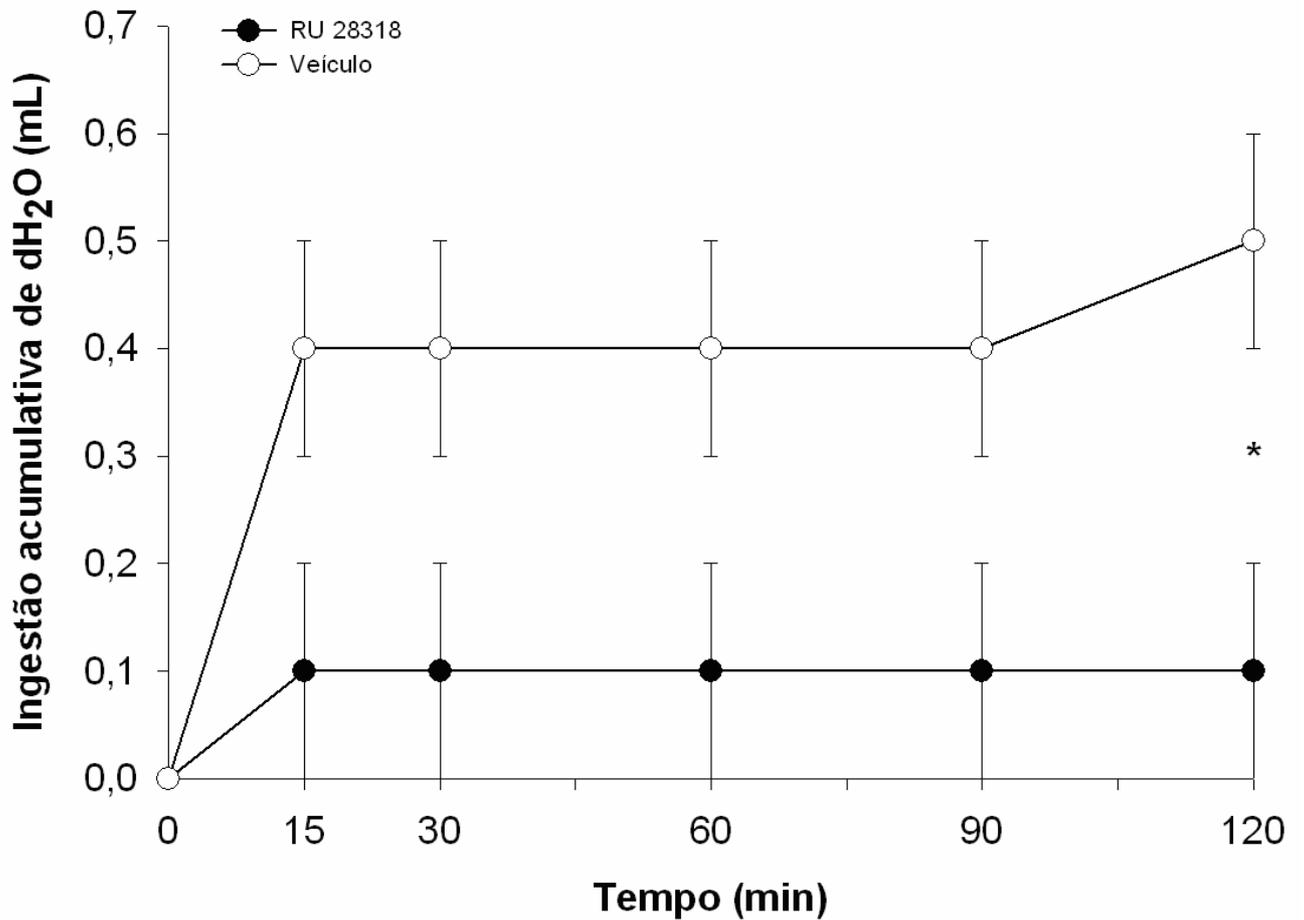
## **5. Efeitos da microinjeção intracerebroventricular de RU 28318 sobre o apetite ao sódio induzido por privação de sódio**

Após 9 dias de dieta hipossódica, animais implantados com cânula guia em direção ao 4V receberam uma microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 5) ou de seu veículo (n= 4). Após o período de 2 horas da microinjeção i.c.v. a ingestão de sódio foi avaliada por meio do teste de ingestão de 2 horas. Os animais privados de sódio que receberam a microinjeção de RU 28318 apresentaram redução estatisticamente significativa na ingestão total de NaCl 0,3 M em relação ao controle ( $1,2 \pm 0,6$  vs.  $9,5 \pm 2,6$  mL/2 h, respectivamente; [F(1,35)= 47,689; p< 0,001]) (figura 21). Ao dividirmos o teste de ingestão em cinco tempos (15, 30, 60, 90 e 120 minutos), observamos que a ingestão acumulativa dos animais do grupo controle foi estatisticamente superior ao grupo que recebeu o antagonista de MR em todos os tempos (figura 21). A ingestão total de dH<sub>2</sub>O foi ligeiramente superior no grupo controle (antagonista:  $0,1 \pm 0,1$  vs. veículo:  $0,5 \pm 0,1$  mL/2 h; [F(1,35)= 20,861; p< 0,001]) (figura 22).

Ao início do teste de ingestão todos os animais estavam alertas e responsivos a estímulos.



**Figura 21:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M induzida por privação de sódio após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 5) ou veículo (1% etanol-salina; n= 4) no 4V. \* Diferente de veículo (p< 0,001); ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.



**Figura 22:** Ingestão acumulativa de água destilada (dH<sub>2</sub>O) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 (n= 5) ou veículo (1% etanol-salina; n= 4) no 4V. \* Diferente de veículo (p< 0,001); ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey. Os dados são apresentados como média  $\pm$  EPM.

## DISCUSSÃO

Nossos resultados são os primeiros a mostrar que a infusão crônica de aldosterona no SNC e especificamente no 4V de ratos é capaz de estimular robusta ingestão de NaCl 0,3 M de maneira dependente de dose. A latência para o início da ingestão de sódio também se relacionou com a dose utilizada. Essa resposta mostrou ser totalmente dependente da presença do hormônio, pois ao término da infusão a ingestão de sódio prontamente retornou a valores próximos do basal e não mais se modificou. A ingestão de água também foi influenciada pela infusão de aldosterona, ou, mais provavelmente, pela alta ingestão de sódio por ela desencadeada. Surpreendentemente, a infusão crônica de aldosterona no VL em doses que foram capazes de estimular robusto apetite ao sódio quando infundidas no 4V, não foi capaz de alterar os valores basais de ingestão de NaCl 0,3 M. Destacando, portanto, que os efeitos observados pela infusão de aldosterona no 4V foram dependentes da ação em áreas próximas ao local de infusão, e não devido ao espalhamento para áreas suprabulbares. Em concordância com estes resultados, a microinjeção do antagonista de MR (RU 28318) no 4V, mas não no VL, foi capaz de reduzir significativamente a ingestão de sódio estimulada pelo tratamento prévio com o diurético furosemida. A importância dos MRs localizados em áreas bulbares próximas ao 4V também pode ser comprovada pela redução significativa na ingestão de sódio estimulada pela privação de sódio após a microinjeção de RU 28318 no 4V. Porém, a microinjeção de RU 28318 no 4V não foi capaz de alterar a resposta de ingestão de sódio desencadeada pelo tratamento crônico com agonista mineralocorticoide (DOCA).

Há muitas décadas a aldosterona vem sendo considerada importante hormônio envolvido na regulação do apetite ao sódio (Rice e Richter, 1943; Wolf, 1965; Wolf e Handal, 1966; Weisinger e Woods, 1971). Porém, para que os mineralocorticóides consigam estimular o apetite ao sódio, são necessárias administrações repetidas em doses suprafisiológicas por diversos dias (Rice e Richter, 1943; Wolf e Handal, 1966; Geerling e cols., 2006a, Geerling e Loewy, 2006c; Stricker e cols., 2007). No entanto, todos esses estudos administraram aldosterona ou seu análogo sintético DOCA por via periférica, mantendo desconhecido o (os) local (is) do SNC onde a aldosterona atua para estimular o apetite ao sódio. Há muitas especulações a cerca dessa questão, mas o mecanismo e o local por meio dos quais os mineralocorticóides atuam no SNC ainda não foram claramente elucidados. Alguns estudos demonstraram que a infusão de antagonista específico de MR em áreas prosencefálicas foi capaz de reduzir a ingestão de sódio em situações nas quais havia aumento da aldosterona plasmática (Sakai e cols., 1986; Francis e cols., 2001; Sullivan e cols., 2004). Sakai e colaboradores (2000) mostraram que os mineralocorticóides por meio de seus MRs localizados na amígdala podem estimular modesta ingestão de salina hipertônica por meio de mecanismos genômicos e não-genômicos. Nossos resultados veem acrescentar novas informações a respeito dos possíveis locais de ação da aldosterona no SNC. Sendo que, nossos dados indicam que a aldosterona infundida cronicamente em baixas doses no 4V é capaz de estimular robusto apetite ao sódio em curto intervalo de tempo (após as primeiras 24 h) por meio de seus MRs provavelmente localizados ao redor do 4V. Além disso, a microinjeção do antagonista de MR no 4V foi capaz de reduzir significativamente a ingestão de sódio estimulada pelo tratamento com furosemida ou pelo protocolo de privação de sódio.

Importante ressaltar que a aldosterona apesar de ser hormônio esteróide apresenta maior dificuldade em atravessar a BHE em comparação aos outros esteróides, como a corticosterona (Pardridge e Mietus, 1979; Funder e Myles, 1996; Uhr e cols., 2002; revisado por Geerling e Loewy, 2009). Essa característica da aldosterona faz com que as estruturas próximas a área postrema (AP), como as áreas bulbares, se tornem local fácil acesso aos mineralocorticóides circulantes, uma vez que a AP é um órgão circumventricular desprovido de BHE e altamente vascularizado (Gross e cols., 1990). Além disso, torna áreas como a amígdala local de difícil acesso à aldosterona circulante, sugerindo que este talvez não seja o principal local de ação deste hormônio.

Como discutido na introdução, segundo a teoria do sinergismo a aldosterona atua conjuntamente com outro hormônio envolvido no controle do apetite ao sódio, a All (Epstein, 1982). Essa ação conjunta produz importante apetite ao sódio, que não pode ser reproduzido quando ambos os hormônios são administrados individualmente (Fluharty e Epstein, 1983; Shade e cols., 2002). No entanto, os trabalhos que mostram essa interação sinérgica, administraram aldosterona por via periférica e All diretamente no SNC (i.c.v.). Nossos resultados mostraram que somente a aldosterona administrada no 4V foi capaz de estimular apetite ao sódio de grande magnitude e baixa latência, comparável ao apetite ao sódio promovido pelo duplo tratamento com All (i.c.v.) e aldosterona (periférica). No entanto, corroboramos com a teoria do sinergismo uma vez que a microinjeção de antagonista de MR RU 28318 no 4V reduziu, mas não aboliu, a ingestão de sódio estimulada pelo tratamento com furosemida ou pela privação de sódio, situações nas quais há um aumento concomitante nos níveis plasmáticos de aldosterona e de All (Douglas e Catt, 1976; Fregly e Rowland, 1985; Rowland e Morian, 1999).

O quarto ventrículo cerebral está localizado no romboencéfalo e ao seu redor localizam-se importantes estruturas, tais como, a AP (Johnson e Loewy, 1990; Geerling e cols., 2006b) e parte da subdivisão medial dos núcleos do trato solitário (Ciriello e cols., 1994; Geerling e cols., 2006b). A AP está envolvida na regulação do apetite ao sódio e sua principal função está relacionada à inibição deste comportamento. Lesões centradas na AP de ratos produzem aumento significativo na ingestão espontânea de salina hipertônica (Contreras e Stetson, 1981; Kosten e cols., 1983; Hide e Miselis, 1984; Edwards e cols., 1993; Wang e Edwards, 1997; Curtis e cols., 1999). Porém, quando há o envolvimento do NTS imediatamente adjacente à AP, diferentes respostas de ingestão são vistas dependendo do tamanho da lesão que acomete este núcleo (Contreras e Stetson, 1981; Wang e Edwards, 1997; Curtis e cols., 1999). Esses resultados já sugeriam o envolvimento de áreas bulbares, próximas a AP, na regulação da ingestão de sódio e mostraram possível função excitatória para o NTS sobre este comportamento. Pois, quanto maior era a área do NTS acometida, menor era a ingestão espontânea de sódio (Contreras e Stetson, 1981; Wang e Edwards, 1997; Curtis e cols., 1999). Nossos resultados contribuem com novas informações a respeito da função estimulatória de regiões localizadas próximas ao 4V, e, portanto próximas a AP, no controle do apetite ao sódio dependente de aldosterona.

Recentemente, estudos neuroanatômicos mostraram evidências adicionais sobre a função do NTS no controle do apetite ao sódio: os neurônios HSD2 sensíveis à aldosterona (Geerling e cols., 2006a; 2006b). Esses neurônios receberam este nome porque além de expressarem o MR, expressam também a enzima 11  $\beta$ -hidroxiesteróide desidrogenase do tipo 2 (HSD2) (Geerling e cols., 2006a; 2006b), a qual inativa os glicocorticóides endógenos em seus metabólitos

inativos 11-ceto, permitindo assim livre acesso à aldosterona no MR (Náray-Fejes-Tóth e Fejes-Tóth, 1996; Odermatt e cols., 1999; 2001). Geerling e colaboradores (2006b) consideraram os neurônios HSD2 como a única população de neurônios sensíveis e seletivos à ação da aldosterona no SNC, já que não encontraram em outro local neurônios que co-expressassem HSD2 e MR. As concentrações mais densas de neurônios HSD2 localizam-se no NTS medial que está na borda do 4V, abaixo da AP (Geerling e cols., 2006a; 2006b). A função destes neurônios está especificamente associada à sinalização da necessidade de sódio (Geerling e Loewy, 2008), pois são seletivamente ativados por situações relacionadas à prolongada deficiência de sódio (Geerling e cols., 2006a; Geerling e Loewy, 2006c, Geerling e Loewy, 2007b). E uma vez ativados, os neurônios HSD2 são rapidamente inibidos após a ingestão de salina hipertônica (Geerling e cols., 2006a; Geerling e Loewy, 2006c, Geerling e Loewy, 2007b).

Nossos resultados mostraram que a infusão crônica de aldosterona no 4V estimula importante apetite ao sódio e que apenas uma microinjeção de antagonista de MR no mesmo local é capaz de reduzir significativamente a ingestão de sódio induzida por furosemida e por privação de sódio. Esses achados só veem corroborar e complementar os dados anteriores provenientes dos estudos de lesão de AP e NTS (Contreras e Stetson, 1981; Wang e Edwards, 1997; Curtis e cols., 1999) e com os estudos neuroanatômicos de Geerling e colaboradores (2006a, 2006b). Todos esses dados juntos mostram a importância de áreas bulbares como parte essencial do circuito responsável por controlar o apetite ao sódio de ratos.

A participação de áreas prosencefálicas na estimulação do apetite ao sódio induzido por All é bastante estudada (Buggy e Fisher, 1974; Bryant e cols., 1980; Avrith e Fitzsimons, 1980), no entanto, a ação da All em estimular o apetite ao sódio

ainda é questão muito controversa na literatura (Daniels e Fluharty, 2004; Krause e Sakai, 2007; Geerling e Loewy, 2008). Já a ação da aldosterona no SNC tem sido mais bem estabelecida em estudos relacionados à sua influência sobre o sistema cardiovascular, sugerindo áreas prosencefálicas como o seu provável local de atuação. A infusão i.c.v. (VL) crônica de aldosterona causa hipertensão (Gomez-Sanchez, 1986), hiperreatividade simpática e prejuízo do baroreflexo (Huang e cols., 2005; Huang e cols., 2008; revisado por Formenti e cols., 2008). Com relação à ingestão de sódio, alguns estudos também sugeriram a importância da atuação da aldosterona nestas áreas, mostrando que o uso de antagonistas específicos de MR foi capaz de reduzir a ingestão de sódio em situações nas quais havia aumento da aldosterona plasmática (Sakai e cols., 1986; Francis e cols., 2001; Sullivan e cols., 2004). Essas evidências sugerem que áreas prosencefálicas sejam importante local de atuação da aldosterona no SNC, por isso realizamos a infusão de aldosterona no VL por 6 dias nas doses de 10 ou 100 ng/h, doses estas que foram capazes de estimular aumento significativo na ingestão de salina hipertônica quando infundidas no 4V. Surpreendentemente, a aldosterona infundida cronicamente no VL não foi capaz de modificar a ingestão basal de NaCl 0,3 M dos ratos e nem a microinjeção de antagonista de MR no mesmo local foi capaz de reduzir a ingestão de sódio desencadeada pelo pré-tratamento com furosemida. Com isso, nossos resultados falharam em mostrar possível função dos MRs prosencefálicos no controle da ingestão de sódio como foi previamente demonstrado por trabalhos usando antagonistas para esse tipo de receptor (Sakai e cols., 1986; Francis e cols., 2001; Sullivan e cols., 2004). Obviamente não podemos excluir a hipótese de que a aldosterona possa agir em áreas prosencefálicas para estimular o apetite ao sódio, talvez haja a necessidade de maiores doses ou maior tempo de infusão. Porém,

podemos dizer que em baixas doses a aldosterona infundida no 4V é capaz de estimular substancial ingestão de NaCl 0,3 M que não pode ser replicada pela mesma infusão no VL, o que pode indicar que áreas bulbares possam ser o principal local de ação da aldosterona no SNC como parte do circuito que desencadeia a ingestão de sódio. No entanto, o que mais chama a atenção é que Sakai e colaboradores (1986) obtiveram importante redução na ingestão de sódio estimulada pelo tratamento com furosemida ao infundir no VL o mesmo antagonista de MR que utilizamos em nossos experimentos. Porém, apenas uma microinjeção de RU 28318 no 4V reduziu de maneira significativa a ingestão de sódio estimulada por furosemida, o que não ocorreu quando repetimos o protocolo no VL. Esses resultados, mais uma vez não excluem possível função dos MRs prosencefálicos no controle da ingestão de sódio, porém eles enaltecem a importância dos MRs próximos ao 4V no controle da ingestão de sódio em ratos. Pois, em nosso trabalho uma microinjeção de 100 ng de RU 28318 no 4V foi capaz de reduzir em aproximadamente 50% a ingestão de sódio quando comparada ao controle, sendo que para resposta semelhante Sakai e colaboradores (1986) realizaram a infusão de 5 µg/h por cerca de 24 horas.

O NTS é uma importante estrutura localizada na região dorsal do bulbo que é responsável por integrar diversos tipos de informações, tais como aferências cardiovasculares, respiratórias (Colombari e cols., 2001), gastrointestinais (Carlson e cols., 1997), gustatórias (Hamilton e Norgren, 1984) e hormonais (Geerling e cols., 2006a). Muitas dessas informações contribuem para o funcionamento do circuito neural que controla os comportamentos ingestivos, incluindo a ingestão de sódio. Além de integrar todas essas informações, o NTS possui a única população de neurônios sensíveis à ação da aldosterona e que são ativados durante situações de

deficiência de sódio (Geerling e cols., 2006a; 2006b). Ademais, o NTS se conecta, por meio de projeções, com diversos locais do SNC relacionados à inibição ou a estimulação do apetite ao sódio. Dentre tantos podemos citar o núcleo leito da estria terminal (BST), que é uma região prosencefálica envolvida no controle da ingestão de sódio, pois lesões desta região reduzem a ingestão de sódio em resposta a depleção de sódio ou a administração de mineralocorticóides (Zardetto-Smith e cols., 1994; Reilly e cols., 1994). O BST recebe projeções diretas do NTS caudal (Ricardo e Koh, 1978) e importante projeções diretas e indiretas dos neurônios HSD2 do NTS (Geerling e Loewy, 2006b). As projeções indiretas dos neurônios HSD2 para o BST ocorrem por meio de duas regiões pontinas, o pré- locus ceruleus (pre-LC) e a região externo-lateral do núcleo parabraquial (PBNel), ambas estruturas que recebem projeções diretas dos neurônios HSD2 (Geerling e Loewy, 2006b). O NTS apresenta importantes conexões com o PBN (Loewy, 1990; Ter Horst e Streefland, 1994), que é um núcleo pontino. O núcleo parabraquial lateral (LPBN) apresenta importante função inibitória dentro do circuito neural que controla a ingestão de sódio (Menani e cols., 1995; 1996). O núcleo central da amígdala (CeA) é outro local envolvido no controle do apetite ao sódio e modula a ingestão de sódio principalmente em resposta ao tratamento mineralocorticóide (Schulkin e cols., 1989). O NTS também se projeta e recebe projeções do CeA (Ter Horst e Streefland, 1994), bem como os neurônios HSD2, que apresentam uma conexão bidirecional tanto direta quanto indiretamente (via PBNel) (Geerling e Loewy, 2006a).

Além dessas conexões com várias estruturas encefálicas, os neurônios HSD2 também recebem informações de microcircuitos locais que envolvem a AP e os neurônios neurotensinérgicos no NTS (Sequeira e cols., 2006). Todas essas evidências funcionais e anatômicas tornam o NTS importante estrutura dentro dos

circuitos neurais envolvidos no controle da ingestão de sódio. Nossos resultados não demonstraram diretamente que a aldosterona infundida no 4V ou que a microinjeção de RU 28318 no mesmo local atuaram nos MRs do NTS ou dos neurônios HSD2, porém diante de diversos dados apresentados pela literatura é lícito dizer que o NTS, e principalmente os neurônios HSD2 foram os possíveis alvos de ação da aldosterona e de seu antagonista neste estudo. A função do NTS em modular a participação das demais áreas envolvidas no apetite ao sódio com as quais ele se conecta direta ou indiretamente ainda precisa ser esclarecido.

A infusão crônica de aldosterona no 4V em doses que causaram importante aumento na ingestão de NaCl 0,3 M, também levou a redução na ingestão de água. Porém, esse efeito não foi dependente de dose, uma vez que não houve diferença significativa entre a redução na ingestão de água ocasionada pelas doses de 10 ou 100 ng/h. Ao contrário da All, que exerce efeitos tanto sobre a ingestão de água quanto de sódio (Buggy e Fisher, 1974; Avrith e Fitzsimons, 1980; Bryant e cols., 1980), os mineralocorticóides tem função específica em estimular apenas a ingestão de sódio (Geerling e Loewy, 2008). Por isso, acreditamos que a redução na ingestão de água não tenha relação com a ação direta da aldosterona sobre este comportamento. Aumento na ingestão de água após a ingestão de salina hipertônica é esperado (Rice e Richter, 1943; Stellar e cols., 1954; Ma e cols., 1993; Stricker e cols., 2007), porém isto não ocorreu em nosso estudo. Talvez a alta ingestão de NaCl 0,3 M possa ter ocasionado importante distensão gástrica que foi capaz de manter a ingestão de água reduzida (Stricker e Hoffmann, 2006). Mas como a ingestão de comida não foi alterada, acreditamos que a distensão gástrica não tenha sido o fator determinante neste caso. Acreditamos que algum sinal hormonal relacionado à inibição da ingestão de sódio e água possa ter reduzido a ingestão de

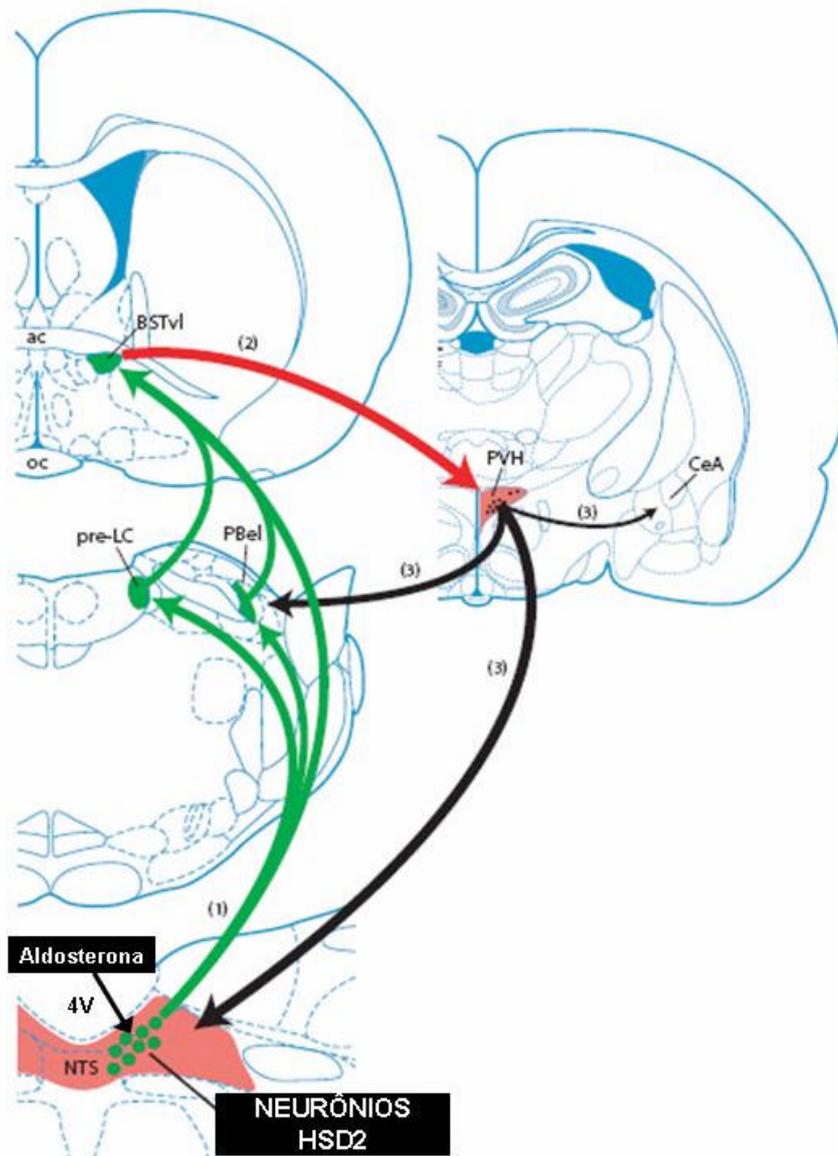
água nos animais com alta ingestão de sódio. Possivelmente, o aumento na ingestão de sódio tenha causado expansão de volume hipertônica ativando receptores de estiramento no átrio direito resultando em liberação do peptídeo atrial natriurético (ANP) dos miócitos cardíacos, bem como do ANP central, via impulsos aferentes dos barorreceptores para o SNC (Antunes-Rodrigues e cols., 2004). O ANP apresenta importante ação natriurética, inibe a ingestão de água e sódio e reduz a liberação de vasopressina (hormônio relacionado à conservação de água) (revisado por Antunes-Rodrigues e cols., 2004). Portanto, ainda que nosso estudo não contemple modificações da volemia, a provável expansão de volume ocasionada pela exarcebada ingestão de NaCl 0,3 M pode ter aumentado os níveis plasmáticos de ANP, o que resultou em redução da sede, mas que não foi capaz de inibir o apetite ao sódio, uma vez que o estímulo para ingestão de sódio (infusão de aldosterona) ainda persistia. Porém, provavelmente devido a sua ação natriurética e diurética (por redução da liberação de vasopressina) houve compensação renal para este aumento de volume circulante. Uma vez que os ratos com alta ingestão de sódio apresentavam grande volume urinário (sendo necessária a limpeza das gaiolas até duas vezes ao dia) e ao final do período de infusão esses animais não apresentaram alteração significativa do peso corporal em relação ao seu peso no início da infusão.

Inesperadamente, a microinjeção de RU 28318 no 4V não foi capaz de alterar a ingestão de NaCl 0,3 M nos animais tratados com DOCA, mesmo utilizando-se uma dose cinco vezes maior do que a utilizada para reduzir a ingestão em ratos tratados com furosemida ou privados de sódio. Porém, a literatura traz muitos dados que mostram que DOCA apresenta algumas diferenças em relação a aldosterona. Primeiro, ao contrário da aldosterona, DOCA atravessa livremente a BHE (Kraulis e

cols, 1975), o que facilitaria a sua ação em locais de difícil acesso para a aldosterona circulante, como por exemplo, a amígdala. Segundo, DOCA é capaz de se ligar não só no MR como também no GR (Vallee e cols., 1995), além disso, é precursor tanto de aldosterona como de corticosterona e sua administração pode elevar as concentrações de ambos os hormônios (Gomez-Sanchez e cols., 1997). Terceiro, a aldosterona (Wolf e Handal, 1966; Weisinger e Woods, 1971) é menos efetiva para estimular o apetite ao sódio do que a DOCA (Rice e Richter, 1943; Geerling e cols., 2006a, Geerling e Loewy, 2006c; Stricker e cols., 2007), apesar de sua maior potencia como agonista no MR (Geerling e Loewy, 2009). E por último, mostrou-se que DOCA é capaz de atuar em diversos locais do SNC, como a amígdala medial (Sakai e cols., 1996; 2000), o CeA (Schulkin e cols., 1989) e o BST (Reilly e cols., 1994), além de ser capaz de ativar também os neurônios HSD2 do NTS (Geerling e cols., 2006a; Geerling e Loewy, 2006c), apesar desta ativação ser menos potente que a vista em situações de aumento dos níveis de aldosterona circulante com o uso do protocolo de privação de sódio (Geerling e cols., 2006a). Portanto, muitos desses fatores podem ter contribuído para a ausência de efeito do antagonista em nosso protocolo, principalmente a possível ação da DOCA em muitas outras regiões do SNC. Ou talvez, porque haja a necessidade de maior tempo de tratamento com o antagonista de MR ou maiores doses de RU 28318 no 4V para que aconteça a redução ou o bloqueio dessa resposta, pois outros trabalhos conseguiram retardar ou reduzir a ingestão de sódio estimulada por DOCA com o uso de antagonista ou de antisense de MR, administrados periféricamente (Vallee e cols., 1995) ou diretamente no SNC (3V ou amígdala medial) (Sakai e cols., 1996; 2000). No entanto, trabalhos anteriores que utilizaram infusão (3 µg/h durante 4 semanas) (Janiak e cols., 1990); ou injeção (10 ng/2 µL) (Rahmouni e cols., 2002a)

de RU 28318 no VL de ratos, conseguiram reduzir significativamente a hipertensão desencadeada pelo tratamento com DOCA-sal, porém em ambos os trabalhos há o relato de que a ingestão de sódio não foi alterada pelo tratamento com o antagonista de MR. Somado aos demais resultados deste trabalho envolvendo o uso de microinjeção de RU 28318 no 4V, podemos sugerir que DOCA se comporta de maneira diferente da aldosterona para estimular a ingestão de sódio em ratos.

Em conclusão, nossos resultados são as primeiras evidências funcionais a mostrarem que a infusão crônica de aldosterona no 4V, mas não no VL, é capaz de estimular importante ingestão de NaCl 0,3 M de maneira dependente de dose. E que apenas uma microinjeção de antagonista de MR no 4V é capaz de reduzir significativamente a ingestão de sódio induzida por furosemida ou por privação de sódio, mas não pelo tratamento crônico com DOCA. Sugerindo que áreas bulbares, próximas ao 4V, são importantes alvos de ação da aldosterona no SNC para estimular o apetite ao sódio (figura 23). Nossos resultados são compatíveis com dados recentes provenientes de estudos neuroanatômicos que identificaram a presença de um pequeno grupamento de neurônios localizados exclusivamente no NTS, que são ativados pela aldosterona e estão estritamente relacionados à estimulação do apetite ao sódio (figura 23). No entanto, mais estudos são necessários para confirmar o local sobre o qual a aldosterona infundida no 4V atua para estimular a ingestão de sódio e qual é a função das áreas bulbares dentro do complexo circuito que controla o apetite ao sódio em ratos.



**Figura 23:** Representação esquemática sugerindo prováveis vias envolvidas na ativação do apetite ao sódio promovido pela infusão de aldosterona no quarto ventrículo (4V). **(1)** Projeções eferentes dos neurônios HSD2 (setas verde) para núcleo parabraquial externo-lateral (PBel), pré-locus ceruleus (pre-LC) e porção ventrolateral do núcleo leito da estria terminal (BSTvl). **(2)** Projeção inibitória GABAérgica do BSTvl (seta vermelha) para o núcleo paraventricular (PVH) do hipotálamo. **(3)** Projeções excitatórias do PVH (setas pretas) para a subdivisão medial dos núcleos do trato solitário (NTS), PB e para o núcleo central da amígdala (CeA). Extraído e adaptado de Geerling e Loewy (2008).

## ABSTRACT

Aldosterone is a mineralocorticoid hormone that acts within the central nervous system (CNS) to induce sodium appetite; however the central mechanism involved in this effect is poorly understood. More recently, neuroanatomical studies identified a unique group of aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract (NTS) near to the fourth cerebral ventricle (4V), which are activated in association with sodium appetite. In the present study we sought to investigate if (1) chronic infusion of aldosterone into the 4V or lateral ventricle (LV) may induce the sodium appetite, and if (2) a single microinjection of a selective mineralocorticoid receptor (MR) antagonist, RU 28318, into the 4V or LV would be able to affect the sodium intake induced by different protocols. Male Wistar Hannover rats were implanted with a guide cannula into the 4V and were infused with vehicle (1% ethanol-saline; n= 5) or aldosterone (1, 10 or 100 ng/h; n= 5) and those rats implanted with cannula into the LV were infused with aldosterone (10 or 100 ng/h; n= 4), during 6 days. The infusion of aldosterone (1, 10 or 100 ng/h) into the 4V significantly increased the 0.3 M NaCl intake compared with baseline levels. In addition, aldosterone (10 or 100 ng/h) induced a robust dose-dependent daily 0.3 M NaCl intake (up to  $45.8 \pm 14.9$  and  $129.8 \pm 5.5$  mL/24 h, respectively), that returned to the baseline levels few hours after stopping the infusion. However, the infusion of aldosterone (10 or 100 ng/h) into the LV failure to induce any significant 0.3 M NaCl intake. The water intake was reduced by the infusion of aldosterone (10 or 100 ng/h) into the 4V when compared with vehicle and 1 ng/h, but the food intake was not affected. In the next experiment, rats implanted with a guide cannula into the 4V or LV were treated according to following protocols: depletion with furosemide (20

mg/kg, s.c.; n= 6) 24 h before the experiment, or sodium deprivation for 9 days (n= 4-5), or treatment with DOCA (2 mg/dia, s.c.; n= 4-7) for 7 days. At the end of the treatment rats received a single microinjection of RU 28318 (100 or 500 ng/2  $\mu$ L) or vehicle (1% ethanol-saline, 2  $\mu$ L) and after 2 h the intake test started. The single microinjection of RU 28318 (100 ng/2  $\mu$ L) into the 4V significantly reduced the 0.3 M NaCl intake induced by previous treatment of furosemide ( $5.6 \pm 0.8$  vs. vehicle  $12.2 \pm 1.7$  mL/2 h,  $p < 0.05$ ) or sodium deprivation protocol ( $1.2 \pm 0.6$  vs. vehicle  $9.5 \pm 2.6$  mL/2 h,  $p < 0.001$ ). However, the same dose of RU 28318 injected into the LV was not able to affect the furosemide induced-0.3 M NaCl intake ( $14.8 \pm 2.8$  vs. vehicle  $15.1 \pm 3$  mL/2 h,  $p > 0.05$ ). Surprisingly, the microinjection of RU 28318 (500 ng/2  $\mu$ L) into the 4V failure to reduce the 0.3 M NaCl intake induced by chronic treatment with DOCA ( $13.6 \pm 2.7$  vs. vehicle  $11.1 \pm 2.3$  mL/2 h,  $p > 0.05$ ). Our results are the first functional evidence to show that chronic infusion of aldosterone into the 4V, but not into the LV, induce a robust dose-dependent sodium appetite. These results are reinforced by our studies using MR antagonist, which a single microinjection of RU 28318 into the 4V significantly reduced the sodium intake induced by furosemide or sodium deprivation. These data confirm the central action of aldosterone in the sodium appetite control, and together with previous neuroanatomical studies suggest that hindbrain areas around of 4V are the preferential site of action for aldosterone to induce sodium appetite.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ahima R, Krozowski Z, Harlam R. Type I corticosteroid receptor-like immunoreactivity in the rat CNS: distribution and regulation by corticosteroids. *J Comp Neurol* 313: 522-528, 1991.
2. Antunes-Rodrigues J, de Castro M, Elias LLK, Valença MM, McCann SM. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. *Physiol Rev* 84: 169-208, 2004.
3. Arriza JL, Weinberger C, Cerelli G, Glaser TM, Handelin BL, Housman DE, Evans RM. Cloning of human mineralocorticoid receptor complementary DNA: structural and functional kinship with glucocorticoid receptor. *Science* 237: 268-275, 1987.
4. Avrith DB, Fitzsimons JT. Increased sodium appetite in the rat induced by intracranial administration of components of the renin-angiotensin system. *J Physiol* 301: 349-364, 1980.
5. Blair-West JR, Coghlan JP, Denton DA, Nelson JF, Orchard E, Scoggins BA, Wright RD, Myers K, Junqueira CL. Physiological, morphological and behavioural adaptation to a sodium deficient environment by wild native Australian and introduced species of animals. *Nature* 217: 922-928, 1968.
6. Bryant RW, Epstein AN, Fitzsimons JT, Fluharty SJ. Arousal of a specific and persistent sodium appetite in the rat with continuous intracerebroventricular infusion of angiotensin II. *J Physiol* 301: 365-382, 1980.
7. Buggy J, Fisher AE. Evidence for a dual central role for angiotensin in water and sodium intake. *Nature* 250: 733-735, 1974.
8. Carlson SH, Beitz A, Osborn JW. Intragastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. *Am J Physiol* 272: R750-R758, 1997.
9. Ciriello J, Hochstenbach SL, Roder S. Central projections of baroreceptor and chemoreceptor afferent fibers in the rat. In: *Nucleus of the Solitary Tract*, edited by IRA Barraco. Boca Raton: CRC Press, cap. 2, p. 35-50, 1994.

10. Colombari E, Sato MA, Cravo SL, Bergamaschi CT, Campos RR e Lopes OU. Role of medulla oblongata in hypertension. *Hypertension* 38: 549-554, 2001.
11. Contreras RJ, Stetson PW. Changes in salt appetite after lesions of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. *Brain Res* 211: 355-366, 1981.
12. Curtis KS, Huang W, Sved AF, Verbalis JG, Stricker EM. Impaired osmoregulatory responses in rats with area postrema lesions. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 277: R209-R219, 1999.
13. Daniels D, Fluharty SJ. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. *Physiol Behav* 81: 319-337, 2004.
14. Douglas J, Catt KJ. Regulation of angiotensin II receptors in the rat adrenal cortex by dietary electrolytes. *J Clin Invest* 58: 834-843, 1976.
15. Edwards GL, Beltz TG, Power JD, Johnson AK. Rapid-onset "need-free" sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 264: R1242-R1247, 1993.
16. Epstein AN, Massi M. Salt appetite in the pigeon in response to pharmacological treatments. *J Physiol* 393: 555-568, 1987.
17. Epstein AN. Mineralocorticoids e cerebral angiotensin may act together to produce sodium appetite. *Peptides* 3: 493-494, 1982.
18. Fluharty SJ, Epstein AN. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. *Behav Neurosci* 97: 746-758, 1983.
19. Formenti S, Schoorlemmer GHM, Moreira TS, Colombari E. Mecanismos neurais da aldosterona no controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrólítico. *Arq Bras Ciênc Saúde* 33: 54-63, 2008.
20. Francis J, Weiss RM, Wei SG, Johnson AK, Beltz TG, Zimmerman K, Felder RB. Central mineralocorticoid receptor blockade improves volume regulation and reduces sympathetic drive in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H2241-H2251, 2001.

21. Fregly MJ, Rowland NE. Role of renin-angiotensin-aldosterone system in NaCl appetite of rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 248: R1-R11, 1985.
22. Funder J, Myles K. Exclusion of corticosterone from epithelial mineralocorticoid receptors is insufficient for selectivity of aldosterone action: in vivo binding studies. *Endocrinology* 137: 5264-5268, 1996.
23. Geerling JC, Engeland WC, Kawata M, Loewy AD. Aldosterone target neurons in the nucleus tractus solitarius drive sodium appetite. *J Neurosci* 26: 411-417, 2006a.
24. Geerling JC, Kawata M, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 494: 515-527, 2006b.
25. Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: bidirectional connections with the central nucleus of the amygdala. *J Comp Neurol* 497: 646-657, 2006a.
26. Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of the solitary tract: efferent projections. *J Comp Neurol* 498: 223-250, 2006b.
27. Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive NTS neurons are inhibited by saline ingestion during chronic mineralocorticoid treatment. *Brain Res* 1115: 54-64, 2006c.
28. Geerling JC, Loewy AD. Sodium depletion activates the aldosterone-sensitive neurons in the NTS independently of thrist. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R1338-R1348, 2007a.
29. Geerling JC, Loewy AD. Sodium deprivation and salt intake activate separate neuronal subpopulations in the nucleus of the solitary tract and the parabrachial complex. *J Comp Neurol* 504: 379-403, 2007b.
30. Geerling JC, Loewy AD. Central regulation of sodium appetite. *Exp Physiol* 93: 177-209, 2008.
31. Geerling JC, Chimenti PC, Loewy AD. Phox2b expression in the aldosterone-sensitive HSD2 neurons of the NTS. *Brain Res* 1226: 82-88, 2008.

32. Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone in the brain. *Am J Physiol Renal Physiol*, 2009 (in press).
33. Gomez-Sanchez EP. Intracerebroventricular infusion of aldosterone induces hypertension in rats. *Endocrinology* 118: 819-823, 1986.
34. Gomez-Sanchez CE, Zhou MY, Cozza EN, Morira H, Foeking MF, Gomez-Sanchez EP. Aldosterone biosynthesis in the rat brain. *Endocrinology* 138: 3369-3373, 1997.
35. Gross PM, Wall KM, Pang JJ, Shaver SW, Wainman DS. Microvascular specializations promoting rapid interstitial solute dispersion in nucleus tractus solitarius. *Am J Physiol* 259: R1131-R1138, 1990.
36. Hamilton RB, Norgren R. Central projections of gustatory nerves in the rat. *J Comp Neurol* 222: 560-577, 1984.
37. Huang BS, Wang H, Leenen FHH. Chronic central infusion of aldosterone leads to sympathetic hyperreactivity and hypertension in Dahl S but not Dahl R rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H517-H524, 2005.
38. Huang BS, White RA, Ahmad M, Jeng AY, Leenen FHH. Central infusion of aldosterone synthase inhibitor prevents sympathetic hyperactivity and hypertension by central Na<sup>+</sup> in Wistar rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 295: R166-R172, 2008.
39. Hyde TM, Miselis RR. Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance. *Am J Physiol* 247: R173-R182, 1984.
40. Janiak PC, Lewis SJ, Brody MJ. Role of central mineralocorticoid binding sites in development of hypertension. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 259: R1025-R1034, 1990.
41. Johnson AK, Loewy AD. Circumventricular organs and their role in visceral functions. In: *Central regulation of autonomic functions*, edited by AD Loewy, KM Spyer. New York: Oxford University Press, cap.14, p. 247-267, 1990.
42. Kochli A, Tenenbaum-Rakover Y, Leshem M. Increased salt appetite in patients with congenital adrenal hyperplasia 21-hydroxylase deficiency. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288: R1673-R1681, 2005.

43. Kosten T, Contreras RJ, Stetson PW, Ernest MJ. Enhanced saline intake and decreased heart rate after area postrema ablations in rat. *Physiol Behav* 31: 777-785, 1983.
44. Kraulis I, Foldes G, Traikov H, Dubrovsky B, Birmingham. Distribution, metabolism and biological activity of deoxycorticosterone in the central nervous system. *Brain Res* 88: 1-14, 1975.
45. Krause EG, Sakai RR. Richter and sodium appetite: from adrenalectomy to molecular biology. *Appetite* 49: 353-367, 2007.
46. Loewy AD. Central autonomic pathways. In: Loewy AD, Spyer, KM, editors. *Central regulation of autonomic functions*, edited by AD Loewy, KM Spyer. New York: Oxford University Press, cap.6, p. 88-103, 1990.
47. Ma LY, McEwen BS, Sakai RR, Schulkin J. Glucocorticoids facilitate mineralocorticoid-induced sodium intake in the rat. *Horm Behav* 27: 240-250, 1993.
48. McCance RA. Medical problems in mineral metabolism: III. Experimental human salt deficiency. *Lancet* 1: 823-830, 1936.
49. McEwen BS, Lambdin LT, Rainbow TC, De Nicola AF. Aldosterone effects on salt appetite in adrenalectomized rats. *Neuroendocrinology* 43: 38-43, 1986.
50. Menani JV, Johnson AK. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 269: R1044-R1049, 1995.
51. Menani JV, Thunhorst RL, Johnson AK. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 270: R162-R168, 1996.
52. Náray-Fejes-Tóth A, Fejes-Tóth G. Subcellular localization of the type 2  $11\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 271:15436-15442, 1996.
53. Nitabach MN, Schulkin J, Epstein AN. The medial amygdala is part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. *Behav Brain Res* 35: 127-134, 1989.

54. Odermatt A, Arnold P, Stauffer A, Frey BM, Frey FJ. The N-terminal anchor sequences of 11  $\beta$  – hydroxysteroid dehydrogenase determine their orientation in the endoplasmatic reticulum membrane. *J Biol Chem* 274:28762-28770, 1999.
55. Odermatt A, Arnold P, Frey FJ. The intracellular localization of the mineralocorticoid receptor is regulated by 11  $\beta$  – hydroxysteroid dehydrogenase type 2. *J Biol Chem* 276: 28484-28492, 2001.
56. Omouessi ST, Falconetti C, Fernette B, Thornton SN. DOCA stimulates salt appetite in Zucker rats: effects of doses, synergistic action with central angiotensin II, and obesity. *Brain Res Bull* 74: 14-20, 2007.
57. Orent-Keiles E, Robinson A, McCollum EV. The effects of sodium deprivation on the animal organism. *Am J Physiol* 119: 651-661, 1937.
58. Pardridge WM, Mietus LJ. Transport of steroid hormones through the rat blood-brain barrier. Primary role of albumin-bound hormone. *J Clin Invest* 64: 145-154, 1979.
59. Paxinos G, Watson C. *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, 1986.
60. Rahmouni K, Sibug RM, De Kloet ER, Barthelmebs M, Grima M, Imbs JL, De Jong W. Effects of brain mineralocorticoid receptor blockade on blood pressure and renal functions in DOCA- salt hypertension. *Eur J Phamacol* 436: 207-216, 2002a.
61. Rahmouni K, Barthelmebs M, Grima M, Imbs JL, De Jong W. Influence of sodium intake on cardiovascular and renal effects of brain mineralocorticoid receptor blockade in normotensive rats. *J Hypertens* 20: 1829-1834, 2002b.
62. Reilly JJ, Maki R, Nardozi J, Schulkin J. The effects of lesions of the bed nucleus of the stria terminalis on sodium appetite. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 54: 253-257, 1994.
63. Ricardo JA, Koh ET. Anatomical evidence of direct projections from the nucleus of the solitary tract to the hypothalamus, amygdala, and other forebrain structures in the rat. *Brain Res* 153: 1-26, 1978.
64. Rice KK, Richter CP. Increased sodium chloride and water intake of normal rats treated with desoxycorticosterone acetate. *Endocrinology* 33: 106-115, 1943.

65. Richter CP. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. *Am J Physiol* 115: 155-161, 1936.
66. Richter CP, Eckert JF. Mineral metabolism of adrenalectomized rats studied by the appetite method. *Endocrinology* 22: 214-224, 1938.
67. Roland BL, Li KX, Funder JW. Glucocorticoid receptor, mineralocorticoid receptors, 11 beta- hydroxysteroid dehydrogenase-1 and -2 expression in rat brain and kidney: in situ studies. *Mol Cell Endocrinol* 111: R1-R7, 1995.
68. Rowland NE, Morian KR, Nicholson TM, Salisbury JJ. Preference for NaCl solutions in sham drinking Sprague-Dawley rats: water deprivation, sodium depletion, and angiotensin II. *Physiol Behav* 57: 753-757, 1994.
69. Rowland NE, Morian KR. Roles of aldosterone and angiotensin in maturation of sodium appetite in furosemide-treated rats. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 276: R1453-R1470, 1999.
70. Sakai RR, Nicolaidis S, Epstein AN. Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin II and aldosterone. *Am J Physiol* 251: R762-R768, 1986.
71. Sakai RR, Fine WB, Epstein AN, Frankmann SP. Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. *Behav Neurosci* 101: 724-731, 1987.
72. Sakai RR, Frankmann SP, Fine WB, Epstein AN. Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake of the rat. *Behav Neurosci* 103: 186-192, 1989.
73. Sakai RR, Ma LY, Zhang DM, McEwen BS, Fluharty SJ. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. *Neuroendocrinology* 64: 425-429, 1996.
74. Sakai RR, McEwen BS, Fluharty SJ, Ma LY. The amygdala: Site of genomic and nongenomic arousal of aldosterone-induced sodium intake. *Kidney Int* 57: 1337-1345, 2000.
75. Schulkin J, Marini J, Epstein AN. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. *Behav Neurosci* 103: 179-185, 1989.

76. Sequeira SM, Geerling JC, Loewy AD. Local inputs to aldosterone-sensitive neurons of the nucleus tractus solitarius. *Neuroscience* 141:1995-2005, 2006.
77. Shade RE, Blair-West JR, Carey KD, Madden LJ, Weisinger RS, Denton DA. Synergy between angiotensin and aldosterone in evoking sodium appetite in baboons. *Am J Physiol Integr Comp Physiol* 283: R1070-R1078, 2002.
78. Shekhtman E, Geerling JC, Loewy AD. Aldosterone-sensitive neurons in the nucleus of solitary tract: Multisynaptic pathway to the nucleus accumbens. *J Comp Neurol* 501: 274-298, 2007.
79. Shepard KE, Funder JW. Equivalent affinity of aldosterone and corticosterone for type I receptors in kidney and hippocampus: direct binding studies. *J Steroid Biochem* 28: 737-742, 1987.
80. Shin J-W, Geerling JC, Loewy AD. Vagal innervation of the aldosterone-sensitive HSD2 neurons in the NTS. *Brain Res* 1249: 135-147, 2009.
81. Stellar E, Hyman R, Samet S. Gastric factors controlling water-and salt-solution-drinking. *J Comp Physiol Psychol* 47: 220-226, 1954.
82. Stricker EM, Hoffmann ML. Control of thirst and salt appetite in rats: early inhibition of water and NaCl ingestion. *Appetite* 46: 234-237, 2006.
83. Stricker EM, Bushey MA, Hoffmann ML, McGhee M, Cason AM, Smith JC. Inhibition of NaCl appetite when DOCA-treated rats drink saline. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292: R652-R662, 2007.
84. Sullivan MJ, Hasser EM, Moffitt JA, Bruno SB, Cunningham JT. Rats exhibit aldosterone-dependent sodium appetite during 24 h hindlimb unloading. *J Physiol* 557: 661-670, 2004.
85. Tait SAS, Tait JF. The correspondence of S.A.S. Simpson e J.F. Tait with T Reichstein during their collaborative work on the isolation and elucidation of the structure of electrocortin (later aldosterone). *Steroids* 63: 440-453, 1998.
86. Tait SAS, Tait JF, Coghlan JP. The discovery, isolation and identification of aldosterone: reflections on emerging regulation and function. *Mol Cell Endocrinol* 217:1-21, 2004.

87. Ter Horst GJ, Streefland C. Ascending projections of the solitary tract nucleus. In: *Nucleus of the Solitary Tract*, edited by IRA Barraco. Boca Raton: CRC Press, cap. 6, p. 93-104, 1994.
88. Urh M, Holsboer F, Müller MB. Penetration of endogenous steroid hormones corticosterone, cortisol, aldosterone e progesterone into the brain is enhanced in mice deficient for both mrd1a and mrd1b P-glycoproteins. *J Neuroendocrinol* 14: 753-729, 2002.
89. Vallee SM, Grillo CA, Gonzalez S, Cosen-Binker L, De Kloet ER, McEwen BS, De Nicola AF. Further studies in deoxycorticosterone acetate treated rats: brain content of mineralocorticoid and glucocorticoid receptors and effect of steroid antagonists on salt intake. *Neuroendocrinology* 61: 117-124, 1995.
90. Voorhies AC, Bernstein IL. Induction and expression of salt appetite: Effects on Fos expression in nucleus accumbens. *Behav Brain Res* 172: 90-96, 2006.
91. Wang T, Edwards GL. Differential effects of dorsomedial medulla lesion size on ingestive behavior in rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 273: R1299-R1308, 1997.
92. Weisinger RS, Woods SC. Aldosterone-elicited sodium appetite. *Endocrinology* 89: 538-544, 1971.
93. Wilkins L, Richter CP. A great craving for salt by a child with cortico-adrenal insufficiency. *Journal of the American Medical Association* 114: 866-868, 1940.
94. Wolf G. Effect of deoxycorticosterone on sodium appetite of intact and adrenalectomized rats. *Am J Physiol* 208: 1281-1285, 1965.
95. Wolf G, Handal PJ. Aldosterone-induced sodium appetite: dose-response and specificity. *Endocrinology* 78: 1120-1124, 1966.
96. Zardetto-Smith AM, Beltz TG, Johnson AK. Role of the central nucleus of the amygdala and the bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. *Brain Res* 645: 123-134, 1994.
97. Zhang DM, Epstein AN, Schulkin J. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. *Brain Res* 600: 20-26, 1993.

## APÊNDICE

### 1. Tabelas de valores individuais

**Tabela 2:** Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	2,1	1,2	1,1	1,4	0	0
2	3	2,5	1,5	2	2,1	2
3	0,6	0	3,5	2,1	1,2	3,4
4	0,7	0	0	0	0	0
5	1,3	0	1,4	0,6	0,8	0
Média ± EPM	1,5 ± 0,5	0,7 ± 0,5	1,5 ± 0,6	1,2 ± 0,4	0,8 ± 0,4	1,1 ± 0,7

**Tabela 3:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) durante a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	0	0	1	0	0	0
2	0	0,9	0,8	1,1	0	3,3
3	0	0	0,8	0	1,3	1
4	0,8	1,7	0	0	0	0,7
5	0	0	0	1,9	0	0,8
Média ± EPM	0,2 ± 0,2	0,5 ± 0,3	0,5 ± 0,2	0,6 ± 0,4	0,3 ± 0,3	1,2 ± 0,6

**Tabela 4:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	0	2	0
2	1,5	8,9	4,8
3	1,1	2,3	1,2
4	0,9	1,6	0,7
5	1	0,8	0,6
Média ± EPM	0,9 ± 0,2	3,1 ± 1,5	1,5 ± 0,9

**Tabela 5:** Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V .

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	0,8	1,2	0	1,3	1,1	1,1
2	4,2	0	1,1	0	0,6	0
3	4,2	0	3,4	1,9	3,1	1,1
4	2,1	1,2	1,1	1,4	0	0
5	3	2,5	1,5	2	2,1	2
Média ± EPM	2,9 ± 0,6	1 ± 0,5	1,4 ± 0,6	1,3 ± 0,4	1,4 ± 0,6	0,8 ± 0,4

**Tabela 6:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) promovida pela infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	0,6	2,3	2,4	11,8	17,8	11,2
2	7,1	1,2	1	1,5	5,7	9,2
3	1,4	1,8	1,8	4,7	0,9	14,2
4	0	0	0	0,6	4,7	1
5	1,8	4,8	11,8	9,1	10,9	17,4
Média ± EPM	2,2 ± 1,3	2 ± 0,8	3,4 ± 2,1	5,5 ± 2,2	8 ± 2,9*	10,6 ± 2,8*

\* Indica um aumento significativo em relação ao valor basal (tabela 5), ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	1,2	1,7	0
2	1,7	0	1,5
3	4,4	1,7	3,1
4	0	0,9	0
5	3,2	3,9	5,1
Média ± EPM	2,1 ± 0,8	1,6 ± 0,6	1,9 ± 1

**Tabela 8:** Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	0	1,9	0,8	2,1	2,9	1,3
2	0,8	1,2	0	1,3	1,1	1,1
3	0,6	0	3,5	2,1	1,2	3,4
4	0	0	0	0	0	1,1
5	0,7	0	0	0	0	0
Média ± EPM	0,4 ± 0,2	0,6 ± 0,4	0,9 ± 0,7	1,1 ± 0,5	1 ± 0,5	1,4 ± 0,6

**Tabela 9:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) promovida pela infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	1,7	3,8	9,3	27,2	26,1	26,3
2	3,8	35,7	40,5	54,3	85,3	84,9
3	0	1,9	5,2	8,5	14,9	14,9
4	1,9	27,1	53	103,1	78,5	49,3
5	0	30,9	16,1	28,9	24,1	21,4
Média ± EPM	1,5 ± 0,7	19,9 ± 7,1	24,8 ± 9,3	44,4 ± 16,4	45,8 ± 14,9	39,4 ± 12,8
				<b>*d</b>	<b>*d</b>	<b>*d</b>

\* Indica um aumento significativo em relação ao valor basal (tabela 8), ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**d** Indica um aumento significativo em relação ao veículo (tabela 3) e 1 ng/h (tabela 6), ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 10:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	5,7	0	1
2	6,1	0	0,9
3	7,2	3,8	0,6
4	0,9	0	0
5	2,6	0,8	0
Média ± EPM	4,5 ± 1,2	0,9 ± 0,7	0,5 ± 0,2

**Tabela 11:** Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	3,9	2,7	1,6	0,7	1,7	2,3
2	0,8	0	1,5	1,1	0	2
3	1	0,9	5,6	1	0,8	0
4	1,2	1,3	4,2	4,9	4,1	5
5	4,4	1,7	0	0,7	0	0
Média ± EPM	2,3 ± 0,8	1,3 ± 0,4	2,6 ± 1	1,7 ± 0,8	1,3 ± 0,8	1,9 ± 0,9

**Tabela 12:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) promovida pela infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	5	14,9	29	91,8	78,9	129,4
2	7,2	31,7	81,5	123,7	121,2	130,8
3	2,5	20,9	48,9	104,1	118,5	112,6
4	9,2	29,4	73	108,9	143,5	147,6
5	3,4	22,2	50,3	68	88,6	128,8
Média ± EPM	5,5 ± 1,2	23,8 ± 3	56,5 ± 9,4	99,3 ± 9,3	110,1 ± 11,7	129,8 ± 5,5
		*	* d	* d	* d	* d

\* Indica um aumento significativo em relação ao valor basal (tabela 11), ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

**d** Indica um aumento significativo em relação ao veículo (tabela 3), a 1 ng/h (tabela 6) e a 10 ng/h (tabela 9), ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 13:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	11,7	0,9	0,8
2	5,5	1,9	0
3	3,8	0,7	0
4	2,5	1,1	1,5
5	8,6	3,3	0,4
Média ± EPM	6,4 ± 1,7	1,6 ± 0,5	0,5 ± 0,3

**Tabela 14:** Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	34,4	35,2	34,2	36,5	39,8	31,7
2	34,3	35	32,4	33,2	28,9	31,4
3	29,7	29,9	35,2	32,1	37,5	26,4
4	40,7	21,2	24,6	24,3	26	26
5	36	40,1	34,8	37,8	41,5	36,6
Média ± EPM	35 ± 1,8	32,3 ± 3,2	32,2 ± 2	32,8 ± 2,4	34,7 ± 3,1	30,4 ± 2

**Tabela 15:** Ingestão de água (mL) durante a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	24,5	29,5	24	31,2	29,4	31,4
2	12,2	21	22	24,1	29,4	27,8
3	19,5	29,9	25,2	31,2	31,4	28
4	12,3	22,2	23,8	26,7	22,8	25,3
5	24,8	33,9	36,6	33,1	35,1	34,5
Média ± EPM	<u>18,7 ± 2,8</u> *	27,3 ± 2,5	<u>26,3 ± 2,6</u> *	29,3 ± 1,7	<u>29,6 ± 2</u> *	29,4 ± 1,6

\* Indica uma redução significativa em relação ao valor basal (tabela 14), ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 16:** Ingestão de água (mL) após a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	33,2	44,7	30,2
2	29,5	33	27
3	24,4	37,8	25,1
4	15,8	30,5	22
5	25,9	36,2	31,2
Média ± EPM	25,8 ± 2,9	36,4 ± 2,4	27,1 ± 1,7

**Tabela 17:** Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	38,2	38,3	46,8	47,3	53,6	32
2	44,9	31,1	32	37,3	24,7	31
3	33,1	33,7	35,4	37,3	29,8	40,4
4	34,4	35,2	34,2	36,5	39,8	31,7
5	34,3	35	32,4	33,2	28,9	31,4
Média ± EPM	37 ± 2,2	34,7 ± 1,2	36,2 ± 2,7	38,3 ± 2,4	35,4 ± 5,2	33,3 ± 1,8

**Tabela 18:** Ingestão de água (mL) durante a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	35,1	27,2	29,4	28,4	22,5	21,7
2	18,2	22,1	34,8	31,9	26,7	26,1
3	20,4	32,6	31,8	31,7	30,8	43,6
4	20,1	31,7	32,3	27,5	27,6	27,2
5	25,3	26	29,5	32,5	29,2	27,5
Média ± EPM	<u>23,8 ± 3,1</u> *	27,9 ± 1,9	31,6 ± 1	<u>30,4 ± 1</u> *	<u>27,4 ± 1,4</u> *	29,2 ± 3,7

\* Indica uma redução significativa em relação ao valor basal (tabela 17), ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 19:** Ingestão de água (mL) após a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	32,3	37,3	33
2	22,8	36,5	35,9
3	40,2	38,7	38,2
4	24	36,7	33,6
5	30,6	31	33,8
Média ± EPM	30 ± 3,1	36 ± 1,3	34,9 ± 1

**Tabela 20:** Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	32,1	31,4	28,6	32,1	31,7	28,9
2	38,3	38,3	46,8	47,3	53,6	32
3	29,7	29,9	35,2	32,1	37,5	26,4
4	23,2	28,8	22,8	28,7	22	25,7
5	40,7	21,2	24,6	24,3	26	26
Média ± EPM	32,8 ± 3,1	29,9 ± 2,7	31,6 ± 4,4	32,9 ± 3,9	34,2 ± 5,5	27,8 ± 1,2

**Tabela 21:** Ingestão de água (mL) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	20,2	13	22,8	25	22,8	18,2
2	25,6	13,9	21,8	11,4	16,8	16,7
3	18,4	26,6	27	29,1	22,9	22,9
4	16,3	18,6	14,8	17,1	20,2	16,1
5	18,5	16,2	15	15,9	14,3	15,7
Média ± EPM	19,8 ± 1,6 *	17,7 ± 2,4 *	20,3 ± 2,4 * a	19,7 ± 3,2 *	19,4 ± 1,7 *	17,9 ± 1,3 * d a

\* Indica uma redução significativa em relação ao valor basal (tabela 20), ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**d** Indica uma redução significativa em relação ao veículo (tabela 15) e **a** indica uma redução significativa em relação a 1 ng/h (tabela 18), ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 22:** Ingestão de água (mL) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	21,4	30,6	30,4
2	27,9	33,5	37,3
3	24,9	35	32
4	27	27,3	26,3
5	21,2	26,8	27,1
Média ± EPM	24,5 ± 1,4	30,6 ± 1,6	30,6 ± 2

**Tabela 23:** Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	33,7	19,6	23,2	23,5	29,6	22,6
2	34,5	33,7	31	42,9	34,4	31,2
3	33,2	43,1	36,4	30,4	34,5	28,4
4	38,8	32,5	29,3	33,2	39	47,6
5	35	40,3	44,7	40,5	39	42
Média ± EPM	35 ± 1	33,8 ± 4,1	32,9 ± 3,6	34,1 ± 3,5	35,3 ± 1,8	34,4 ± 4,6

**Tabela 24:** Ingestão de água (mL) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	19,3	20	14,9	5,4	2,2	5,4
2	28,8	24,1	28,9	29,6	36,9	40,5
3	23,9	13,7	15,7	17,6	16	13,5
4	22,9	28	25,6	29,2	42,1	30,1
5	16,8	23,6	20,2	14,3	14,2	22
Média ± EPM	<u>22,3 ± 2,1</u> *	<u>21,9 ± 2,4</u> *	<u>21,1 ± 2,7</u> *	<u>19,2 ± 4,6</u> *	<u>22,3 ± 7,5</u> *	<u>22,3 ± 6,1</u> *

\* Indica uma redução significativa em relação ao valor basal (tabela 23), ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 25:** Ingestão de água (mL) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	23,9	23,5	26,8
2	33	38,9	32
3	41,1	28,6	27,5
4	20,6	39,2	29,9
5	37,9	36,6	42,1
Média ± EPM	31,3 ± 3,9	33,4 ± 3,1	31,7 ± 2,8

**Tabela 26:** Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	26,2	26,3	25,6	28,2	26	26,8
2	25,4	24,8	24,5	23,6	25,8	25,7
3	24,7	24,2	25,8	24,1	26,9	23,3
4	28,9	19,5	22,6	23,9	22,6	22,6
5	25,4	30,3	27,5	29,7	29,2	32,5
Média ± EPM	26,1 ± 0,7	25 ± 1,7	25,2 ± 0,8	25,9 ± 1,3	26,1 ± 1,1	26,2 ± 1,8

**Tabela 27:** Ingestão de comida (g) durante a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	22,2	27,3	24,8	29,6	24,9	26,6
2	19,1	17	21,4	25,3	27	24,4
3	22,8	24	27,4	26,8	30,3	29,2
4	21,2	22,4	22,1	30,9	24,2	26,8
5	27	25,7	29,2	32,9	33,2	28,7
Média ± EPM	22,5 ± 1,3	23,3 ± 1,8	25 ± 1,5	29,1 ± 1,4	27,9 ± 1,7	27,1 ± 0,9

**Tabela 28:** Ingestão de comida (g) após a infusão de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	22,7	29,1	22,3
2	23,6	28	24,9
3	19,4	33,3	24,1
4	13,7	31,1	21,7
5	18,9	29,1	28
Média ± EPM	19,7 ± 1,7	30,1 ± 0,9	24,2 ± 1,1

**Tabela 29:** Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	24,8	18,8	23,6	22,4	26,2	24,6
2	25,6	27,3	23,5	26,6	21,9	28
3	26,8	22,8	26,5	26,6	23,5	28,7
4	26,2	26,3	25,6	28,2	26	26,8
5	25,4	24,8	24,5	23,6	25,8	25,7
Média ± EPM	25,8 ± 0,3	24 ± 1,5	24,7 ± 0,6	25,5 ± 1,1	24,7 ± 0,8	26,8 ± 0,7

**Tabela 30:** Ingestão de comida (g) durante a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	30,3	23,6	31,8	31,6	26,5	25,2
2	20,5	23,2	27,6	30,8	27,2	29,6
3	12,3	18,9	19,6	22,1	15,6	24,6
4	22,5	25,9	29,2	27,7	25,5	28
5	30,1	26,8	32,8	30,4	30,3	30,7
Média ± EPM	23,1 ± 3,4	23,7 ± 1,4	28,2 ± 2,3	28,5 ± 1,7	25 ± 2,5	27,6 ± 1,2

**Tabela 31:** Ingestão de comida (g) após a infusão de 1 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	25,3	25,7	22,4
2	9,6	28,4	26,5
3	23,6	25	27,9
4	18,6	27,9	26,6
5	26,2	25,4	28,8
Média ± EPM	20,7 ± 3,1	26,5 ± 0,7	26,4 ± 1,1

**Tabela 32:** Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	21,1	17,5	20,8	21,9	20,2	18,7
2	24,8	18,8	23,6	22,4	26,2	24,6
3	24,7	24,2	25,8	24,1	26,9	23,3
4	21,3	25,3	22,7	23,9	22,1	22,9
5	28,9	19,5	22,6	23,9	22,6	22,6
Média ± EPM	24,2 ± 1,4	21,1 ± 1,6	23,1 ± 0,8	23,2 ± 0,5	23,6 ± 1,3	22,4 ± 1

**Tabela 33:** Ingestão de comida (g) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	22	18,4	20,3	21,8	20,4	24,1
2	27,6	31,5	26,3	24,2	26,3	25,4
3	24,7	24,5	28,6	27,8	30,2	28,5
4	23	25,9	27,8	29,7	28,1	25,5
5	22,5	27,8	28,3	32,4	28	22,6
Média ± EPM	24 ± 1	<u>25,6 ± 2,2</u> *	26,3 ± 1,5	<u>27,2 ± 1,9</u> *	26,6 ± 1,7	25,2 ± 1

\* Indica um aumento significativo em relação ao valor basal (tabela 32), ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 34:** Ingestão de comida (g) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	19,3	27,7	20,1
2	26,5	31,5	33,3
3	25,2	27,6	29,7
4	23,3	23,4	24,1
5	25	22,4	23,9
Média ± EPM	23,9 ± 1,2	26,5 ± 1,6	26,2 ± 2,3

**Tabela 35:** Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	27,6	21,7	21,2	23,2	27	21,2
2	23,1	20,7	19,2	25,6	23,9	22,5
3	17,1	28,3	23,1	25,3	26,2	24,3
4	27,5	26	24,2	25,3	26	27,6
5	23,7	27,6	31,3	30,7	28,5	32,7
Média ± EPM	23,8 ± 1,9	24,9 ± 1,5	23,8 ± 2,1	26 ± 1,2	26,3 ± 0,7	25,7 ± 2,1

**Tabela 36:** Ingestão de comida (g) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	17,2	24,1	23,3	23,6	22,7	23,5
2	25,1	20,2	26,4	27,6	26,4	23,3
3	24,5	23,4	25,7	24,8	24,7	26,3
4	18,5	28,4	24,2	22,2	19,3	22,3
5	27,3	51	48	36,4	28,1	37
Média ± EPM	22,5 ± 2	29,4 ± 5,6	29,5 ± 4,7	26,9 ± 2,5	24,2 ± 1,5	26,5 ± 2,7

**Tabela 37:** Ingestão de comida (g) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no 4V.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	20,6	21,3	24,1
2	19,5	27,1	24,3
3	25,7	27,6	25,7
4	24,5	19,9	27,1
5	33	31,7	40
Média ± EPM	24,7 ± 2,4	25,5 ± 2,2	28,2 ± 3

**Tabela 38:** Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	4,4	1,6	1	4,2	2,3	2,5
2	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	1,6	2,9	1,3
4	0	0	0	0,6	1,9	0
Média ± EPM	1,1 ± 1,1	0,4 ± 0,4	0,3 ± 0,3	1,6 ± 0,9	1,8 ± 0,6	1 ± 0,6

**Tabela 39:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	0	0,9	2,1	2,9	2,6	0
2	0	0,7	0	0,7	0	0
3	0,6	1,2	2,3	6,5	7,6	12,8
4	0	0	0	0	0,9	0
Média ± EPM	0,2 ± 0,2	0,7 ± 0,3	1,1 ± 0,6	2,5 ± 1,5	2,8 ± 1,7	3,2 ± 3,2

**Tabela 40:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	5,6	7,5	2,6
2	0	0,9	1,9
3	2,5	0,9	0
4	0	0,6	0
Média ± EPM	2 ± 1,3	2,5 ± 1,7	1,1 ± 0,7

**Tabela 41:** Ingestão basal de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	1,4	1,1	0	1,6	1,3	1,7
2	3,7	1,1	0	0,6	0	1,1
3	0,8	1,4	0,6	6,7	3	2,6
4	0	0,7	0	0,6	0	0
Média ± EPM	1,5 ± 0,8	1,1 ± 0,1	0,2 ± 0,2	2,4 ± 1,5	1,1 ± 0,7	1,4 ± 0,5

**Tabela 42:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	1,3	0	3,5	0,7	0	0
2	0	1,7	1	2,3	0,9	0
3	2,1	0,7	1,1	1,3	5,4	5,1
4	0	0	0,7	0	0,8	0
Média ± EPM	0,9 ± 0,5	0,6 ± 0,4	1,6 ± 0,6	1,1 ± 0,5	1,8 ± 1,2	1,3 ± 1,3

**Tabela 43:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	0,7	0,7	0
2	3	0	0
3	5,5	0	0,7
4	0	0,6	0
Média ± EPM	2,3 ± 1,2	0,3 ± 0,2	0,2 ± 0,2

**Tabela 44:** Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	32,7	30	33,1	31	32,1	27,7
2	35,1	31,6	41	28,5	30,1	29,1
3	38,7	34,5	36,6	32,1	31,2	30,3
4	27,6	24,9	31,2	27,1	35	29
Média ± EPM	33,5 ± 2,3	30,3 ± 2	35,5 ± 2,2	29,7 ± 1,1	32,1 ± 1	29 ± 0,5

**Tabela 45:** Ingestão de água (mL) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	22,8	21,6	24,1	24,2	32,5	39,1
2	25,6	23,6	27,3	22,6	23,4	47,5
3	30,3	30,5	30,3	29,9	29,5	24,8
4	32,4	26,3	33,1	31,6	34,8	29,3
Média ± EPM	27,8 ± 2,2	25,5 ± 1,9	28,7 ± 1,9	27,1 ± 2,2	30,1 ± 2,5	35,2 ± 5,1

**Tabela 46:** Ingestão de água (mL) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	29	36,8	27,8
2	24,1	27	29
3	30,9	28,7	28,6
4	36,6	29,2	34,8
Média ± EPM	30,2 ± 2,6	30,4 ± 2,2	30,1 ± 1,6

**Tabela 47:** Ingestão basal de água (mL) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	32,8	35	29,1	26,6	33,5	33,9
2	31,2	34,5	29,2	33,1	29,2	20,7
3	26,2	20,2	22,5	16,7	17,1	17,9
4	30,7	30,8	26	28,2	21,9	31,6
Média ± EPM	30,2 ± 1,4	30,1 ± 3,4	26,7 ± 1,6	26,2 ± 3,4	25,4 ± 3,7	26 ± 4

**Tabela 48:** Ingestão de água (mL) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	33,2	26,6	24,6	23,8	20,2	20,8
2	23,2	32,5	31,7	32,4	34,1	31,6
3	16,4	16,2	20	18,5	18,6	17,1
4	25,6	29,4	28,5	27	24,7	22,1
Média ± EPM	24,6 ± 3,5	26,2 ± 3,5	26,2 ± 2,5	25,4 ± 2,9	24,4 ± 3,5	<u>22,9 ± 3,1</u> *

\* Indica um redução significativa em relação a 10 ng/h (tabela 45), ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 49:** Ingestão de água (mL) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	20,9	34,7	31,1
2	31,8	31,7	35,6
3	20,1	15,8	21,5
4	17,8	45,6	38,7
Média ± EPM	22,7 ± 3,1	32 ± 6,2	31,7 ± 3,7

**Tabela 50:** Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	22,8	23	24,3	22	23,1	25
2	24,9	26,1	33,3	23,1	25,2	22,7
3	19,2	21	22,4	22,2	16,7	23,9
4	21,1	22,3	30,6	23,1	25,8	27
Média ± EPM	22 ± 1,2	23,1 ± 1,1	27,7 ± 2,6	22,6 ± 0,3	22,7 ± 2,1	24,7 ± 0,9

**Tabela 51:** Ingestão de comida (g) durante a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	19,3	18,9	20,2	22,1	25,7	22,9
2	28,6	27,5	27,7	26,7	27,2	24,9
3	28,6	26,4	26,6	28,4	28,6	26,4
4	31,3	24,5	34	32,8	37	29,4
Média ± EPM	27 ± 2,6	24,3 ± 1,9	27,1 ± 2,8	27,5 ± 2,2	29,6 ± 2,5	25,9 ± 1,4

**Tabela 52:** Ingestão de comida (g) após a infusão de 10 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	16,3	31,8	27,6
2	26,6	22,8	26,3
3	22,6	22,3	20,3
4	24,5	23,1	25,8
Média ± EPM	22,5 ± 2,2	25 ± 2,3	25 ± 1,6

**Tabela 53:** Ingestão basal de comida (g) nos ratos que posteriormente receberam a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	20,1	26,2	22,5	23,6	25,1	26,6
2	24,7	30,2	24,7	26,5	25,5	22,3
3	20,1	14,2	16,5	14,3	15,7	17,8
4	20,1	23,3	20,4	21,1	19,2	20,7
Média ± EPM	21,3 ± 1,2	23,5 ± 3,4	21 ± 1,7	21,4 ± 2,6	21,4 ± 2,4	21,9 ± 1,8

**Tabela 54:** Ingestão de comida (g) durante a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias					
	1	2	3	4	5	6
1	30,3	26,9	22,7	25,2	24,3	19,5
2	23,6	28,7	32	31	26,6	27,3
3	16,8	13,9	16,9	19,9	20	19,2
4	17,7	22,4	14,1	23,6	24,5	23,4
Média ± EPM	22,1 ± 3,1	23 ± 3,3	21,4 ± 4	24,9 ± 2,3	23,9 ± 1,4	22,4 ± 1,9

**Tabela 55:** Ingestão de comida (g) após a infusão de 100 ng/h de aldosterona no VL.

Rato	Dias		
	1	2	3
1	26,2	26,4	28,6
2	27	30	30,2
3	19,8	13,8	19,3
4	22	23,1	23,4
Média ± EPM	23,8 ± 1,7	23,3 ± 3,5	25,4 ± 2,5

**Tabela 56:** Ingestão de água (mL) após a microinjeção de 10 ng/2 µL de All no VL durante o teste de ingestão de 15 minutos nos ratos que posteriormente receberam a infusão i.c.v. de 10 ou 100 ng/h de aldosterona.

Rato	Grupo 10 ng/h	Grupo 100 ng/h
1	17,9	12,1
2	13,9	9,7
3	5	8,6
4	10,4	5,2

**Tabela 57:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	16,6	18,1	18,5	18,9	19,8
2	10,2	10,2	12	12,1	12,6
3	7,7	10	10	10	10
4	6,3	7	8	8	8
5	4,8	7	8,2	10	10
6	6,2	9	12,8	12,8	12,8
Média ± EPM	8,6 ± 1,8	10,2 ± 1,7	11,6 ± 1,6	12 ± 1,6	12,2 ± 1,7

**Tabela 58:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	8	8	8,2	8,4	8,4
2	3,5	3,8	4,2	4,4	4,4
3	3,4	3,4	3,4	3,4	3,4
4	3,8	3,8	3,8	3,8	3,8
5	4	4	5,9	5,9	5,9
6	7,5	7,5	7,5	7,5	7,5
Média ± EPM	5 ± 0,9*	5,1 ± 0,8*	5,5 ± 0,8*	5,6 ± 0,8*	5,6 ± 0,8*

\* Indica uma redução significativa em relação ao veículo (tabela 57), ANOVA de duas vias para medidas repetidas seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 59:** Ingestão de NaCl 0,3 M (mL) após 24 horas da microinjeção de 100 ng/2  $\mu$ L de RU 28318 no 4V dos ratos depletados com furosemida.

<b>Rato</b>	<b>NaCl</b>
1	1
2	13,4
3	7,1
4	1,1
5	6,9
6	15,3
Média $\pm$ EPM	7,5 $\pm$ 2,4

**Tabela 60:** Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	2,4	2,4	7,1	7,3	7,3
2	0,9	0,9	3,3	4,1	4,2
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0
Média ± EPM	0,6 ± 0,4	0,6 ± 0,4	1,7 ± 1,2	1,9 ± 1,3	1,9 ± 1,3

**Tabela 61:** Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	0	0	0	0	0
2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
3	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
4	0	0	0	0	0
5	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
6	0	0	0,3	0,3	0,3
Média ± EPM	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,1

**Tabela 62:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no VL.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	18,5	24,9	26,9	26,9	26,9
2	8	13,3	16,3	16,5	16,5
3	8,1	11,2	13,4	14,7	18,7
4	5,6	6,5	7,6	7,6	7,6
5	4	2	7,8	8,2	8,2
6	9,6	12,7	12,8	12,8	12,8
Média ± EPM	9 ± 2,1	11,8 ± 3,2	14,1 ± 2,9	14,5 ± 2,9	15,1 ± 3

**Tabela 63:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no VL.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	18,3	23,1	23,1	25,2	25,2
2	12,1	20,5	20,6	20,8	20,8
3	9,9	12,3	14,7	14,7	14,7
4	6,9	10,5	10,5	10,5	11,3
5	7,5	7,9	7,9	7,9	7,9
6	6,6	6,6	8,3	8,9	8,9
Média ± EPM	10,2 ± 1,8	13,5 ± 2,8	14,2 ± 2,6	14,7 ± 2,9	14,8 ± 2,8

**Tabela 64:** Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no VL.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,9
2	0,1	2,6	2,6	2,7	2,7
3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
4	0	0,6	0,7	0,7	0,7
5	0	0	0	0	0
6	0,1	0,1	4	4	4
Média ± EPM	0,1 ± 0,1	0,7 ± 0,4	1,3 ± 0,7	1,3 ± 0,7	1,4 ± 0,6

**Tabela 65:** Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos depletados com furosemida após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no VL.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
2	0	2	7,1	9,6	10,1
3	0	0	1,7	1,7	1,7
4	0,1	0,1	3,3	4	4,2
5	0	0	0	0	0
6	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
Média ± EPM	0,1 ± 0	0,4 ± 0,3	2,1 ± 1,1	2,6 ± 1,5	2,7 ± 1,6

**Tabela 66:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	6,6	6,6	6,6	7,7	7,7
2	11	13,3	13,3	15,2	17,2
3	6,1	6,1	6,1	7,3	7,3
4	9,4	9,4	9,4	12,1	12,1
Média ± EPM	8,3 ± 1,2	8,9 ± 1,7	8,9 ± 1,7	10,6 ± 1,9	11,1 ± 2,3

**Tabela 67:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de 500 ng/2 µL de RU 28318 no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	7,1	7,1	7,1	7,1	7,1
2	11,4	14,7	14,7	18,2	19,6
3	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
4	4,2	8,4	8,4	8,4	8,4
5	12,2	14,3	15,3	15,3	15,3
6	10,1	11,3	12,7	12,7	12,7
7	12,3	14,5	22,6	25	25,6
Média ± EPM	9,1 ± 1,2	11 ± 1,4	12,5 ± 2,2	13,3 ± 2,6	13,6 ± 2,7

**Tabela 68:** Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2	0,3	0,4	0,6	0,6	0,6
3	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
4	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3
Média ± EPM	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1

**Tabela 69:** Ingestão acumulativa de água (mL) nos ratos tratados com DOCA após 2 horas da microinjeção de 500 ng/2 µL de RU 28318 no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
2	0,5	1,3	1,3	1,5	1,5
3	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0
5	0,2	0,2	1,7	1,7	1,7
6	0,4	0,4	1,7	2,3	2,3
7	0,3	0,3	3,3	5,9	5,9
Média ± EPM	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0,2	1,2 ± 0,5	1,6 ± 0,8	1,6 ± 0,8

**Tabela 70:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	14,4	15,8	16,6	16,8	16,8
2	5,3	5,3	6,6	8	9,6
3	4,2	4,2	5,2	5,2	5,2
4	6,4	6,4	6,4	6,4	6,4
Média ± EPM	7,6 ± 2,3	7,9 ± 2,7	8,7 ± 2,7	9,1 ± 2,6	9,5 ± 2,6

**Tabela 71:** Ingestão acumulativa de NaCl 0,3 M (mL) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
2	3,7	3,7	3,7	3,7	3,7
3	1,1	1,1	1,1	1,1	1,1
4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Média ± EPM	1,2 ± 0,6*	1,2 ± 0,6*	1,2 ± 0,6*	1,2 ± 0,6*	1,2 ± 0,6*

\* Indica uma redução significativa em relação ao veículo (tabela 70), ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 72:** Ingestão acumulativa de água destilada (mL) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de veículo (1% etanol-salina) no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,6
3	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
4	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Média ± EPM	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,5 ± 0,1

**Tabela 73:** Ingestão acumulativa de água destilada (mL) nos ratos privados de sódio após 2 horas da microinjeção de 100 ng/2 µL de RU 28318 no 4V.

Rato	Tempo (min)				
	15	30	60	90	120
1	0	0	0	0	0
2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
3	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
4	0,3	0,3	0,3	0,4	0,4
5	0	0	0	0	0
Média ± EPM	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1*

\* Indica uma redução significativa em relação ao veículo (tabela 72), ANOVA de duas vias seguida pelo pós-teste de Tukey ( $p < 0,001$ ).

## 2. Publicações

### **Manuscrito publicado:**

**Formenti S**, Schoorlemmer GHM, Moreira TS, Colombari E. Mecanismos neurais da aldosterona no controle cardiovascular e do equilíbrio hidroeletrolítico. Arq Bras Ciênc Saúde 33: 54-63, 2008.

### **Manuscritos em fase de elaboração:**

**Formenti S**, Schoorlemmer GHM, Menani JV, Colombari E. Functional evidence of hindbrain mechanism for aldosterone-induced sodium appetite (a ser submetido no American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology).

**Formenti S**, Schoorlemmer GHM, Menani JV, Colombari E. Central mineralocorticoid receptor blockade reduces sodium depletion and sodium deprivation-induced sodium intake (a ser submetido no American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology).

### **Resumos em congressos internacionais:**

**Formenti S**, Schoorlemmer GHM, Menani JV, Colombari E. Functional evidence of hindbrain mechanism for aldosterone-induced sodium appetite (a ser apresentado no 17<sup>th</sup> Annual Meeting of the Society for the Study of Ingestive Behavior – SSIB, 28 de julho - 1 de agosto de 2009, Portland, Oregon, EUA; e no XVIII<sup>th</sup> Scientific Sessions of the Inter-American Society of Hypertension / XVII Congresso da Sociedade

Brasileira de Hipertensão – IASH-SBH, 5-8 de agosto de 2009, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).

**Formenti S**, Schoorlemmer GHM, Menani JV, Colombari E. Central mineralocorticoid receptor blockade reduces sodium depletion and sodium deprivation-induced sodium intake (a ser apresentado no XVIII<sup>th</sup> Scientific Sessions of the Inter-American Society of Hypertension / XVII Congresso da Sociedade Brasileira de Hipertensão – IASH-SBH, 5-8 de agosto de 2009, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil).