

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

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS ALFA₂ DO NÚCLEO
PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO**

Carina Aparecida Fabrício de Andrade

**SÃO CARLOS
2006**

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

**PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES ADRENÉRGICOS ALFA₂ DO NÚCLEO
PARABRAQUIAL LATERAL NO CONTROLE DA INGESTÃO DE SÓDIO**

Carina Aparecida Fabrício de Andrade

**Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós Graduação em Ciências
Fisiológicas, Convênio UFSCar/UNESP, do
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
da Universidade Federal de São Carlos,
como parte dos requisitos para a obtenção
do Título de Doutor em Ciências, área de
concentração: Fisiologia.**

Orientador: Prof Dr José Vanderlei Menani

**SÃO CARLOS
2006**

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

A553pr

Andrade, Carina Aparecida Fabrício de.

Participação dos receptores adrenérgicos alfa₂ do núcleo parabraquial lateral no controle da ingestão de sódio / Carina Aparecida Fabrício de Andrade. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

145 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Neurofisiologia. 2. Equilíbrio hidro-eletrolítico (Fisiologia). 3. Ingestão de sódio. 4. Núcleo parabraquial lateral. 5. Receptores adrenérgicos Alfa₂. I. Título.


CDD: 612.8 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**Participação dos receptores adrenérgicos α_2 do núcleo
parabraquial lateral no controle da ingestão de sódio**

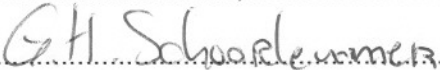
Defesa de Tese de Carina Aparecida Fabrício Andrade

Prof. Dr. José Vanderlei Menani 

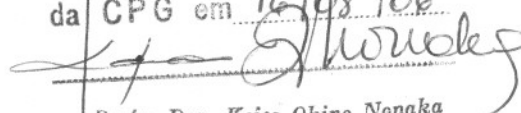
Prof. Dr. José Antunes Rodrigues 

Prof. Dr. João Carlos Callera 

Prof. Dr. José Eduardo Nogueira Silveira 

Prof. Dr. Gerhardus Schollemmer 

Homologado na 140^ª reunião
da CPG em 16/08/06



Profa. Dra. Keiko Okino Nonaka
Coordenadora do PPG-CF UFSCar

“Ainda que eu tivesse o dom da profecia, o conhecimento de todos os mistérios e de toda a ciência; ainda que eu tivesse toda a fé, a ponto de transpor montanhas, se não tivesse o amor, eu nada seria .”

1Cor 13,2

AOS MEUS PAIS

SONIA E ANTONIO CARLOS

E IRMÃS

GLAUCIA E ALINE

Obrigada pelo amor e apoio constantes

AGRADECIMENTOS

Ao Prof Dr José Vanderlei Menani pela orientação, apoio e dedicação a este trabalho. Desde minha iniciação científica tive o privilégio de tê-lo como orientador.

Ao Prof Dr Laurival Antonio De Luca Jr pela colaboração na realização deste trabalho.

Aos funcionários Ana, Reginaldo, Silvia, Silvana e Silas e também a todos os professores, pós-graduandos e estagiários do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP, pelo apoio, atenção e amizade. Particularmente agradeço ao Silas pela sua colaboração nos implantes de cânulas no NPBL. A Lisandra, pela colaboração no procedimento imunohistoquímico.

A todos os professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Fisiológicas pela dedicação às disciplinas ministradas.

Ao Prof Dr Alan Kim Johnson, pela oportunidade da realização do estágio de doutorando na Universidade de Iowa.

Minha gratidão a todos os meus familiares pelo apoio e incentivo. Ao meu noivo Aleksander, pela ajuda na área computacional e principalmente pelo constante companheirismo. Aos meus amigos(as) e a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES, e CNPq, sem os quais, muito não seria concretizado. Especialmente à FAPESP pela concessão da bolsa.

RESUMO

A ingestão de água e de NaCl 0,3 M é fortemente inibida pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 com clonidina ou moxonidina (agonistas de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos) injetadas perifericamente ou em áreas prosencefálicas, ou pela serotonina e colecistocinina no núcleo parabraquial lateral (NPBL), estrutura bilateral localizada na ponte. Neurônios serotoninérgicos e catecolaminérgicos estão presentes nas projeções da área postrema e núcleo do trato solitário para o NPBL e a presença de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL já foi demonstrada. O objetivo do presente estudo foi investigar o possível envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL no controle da ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com furosemida (FURO, 10 mg/kg de peso corporal) + captopril (CAP, 5 mg/kg de peso corporal) subcutaneamente e durante desidratação celular, induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (2 ml). Além disso, também foi investigada a possível interação entre os receptores adrenérgicos α_2 e os mecanismos serotoninérgicos, GABAérgicos e opioidérgicos do NPBL no controle da ingestão de água de NaCl 0,3 M. Foram usados ratos Holtzman com cânulas implantadas bilateralmente em direção ao NPBL. Contrariamente aos efeitos produzidos pelas injeções prosencefálicas, as injeções de moxonidina (0,1; 0,5 e 1,0 nmol/0,2 μ l) produziram um forte e surpreendente aumento da ingestão de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP, e um pequeno aumento da ingestão de água, sem alterações cardiovasculares e da expressão da proteína c-fos em áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrolítico. Injeções prévias de RX 821002 (antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , 10 e 20 nmol/0,2 μ l) aboliram o efeito da moxonidina (0,5 nmol) sobre a ingestão de NaCl 0,3 M. Em ratos previamente tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, as injeções bilaterais de moxonidina no NPBL induziram uma forte ingestão de NaCl 0,3 M, sem alterar a ingestão de água. Injeções de

moxonidina no NPBL não alteram a ingestão de sódio e de água em animais saciados. A ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL inibiu os efeitos da ativação do mecanismo serotoninérgico inibitório do NPBL. O aumento da ingestão de sódio produzido pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL foi parcialmente dependente de mecanismos GABAérgicos e opioidérgicos do NPBL. O bloqueio de receptores serotoninérgicos no NPBL promoveu aumento das respostas hedônicas a infusão intra-oral ao sódio hipertônico em animais desidratados. Em conclusão, os prévios e presentes resultados indicam papéis opostos para os receptores adrenérgicos α_2 no controle da ingestão e de água de acordo com sua distribuição no cérebro do rato. A ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL promove um potente aumento da ingestão de sódio em condições de desidratação extracelular ou intracelular. Os efeitos da ativação dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL possivelmente se devem ao bloqueio dos mecanismos serotoninérgicos inibitórios do NPBL e pelo menos parte dos efeitos também depende de uma interação com mecanismos GABAérgicos e opioidérgicos do NPBL. Finalmente, os receptores serotoninérgicos do NPBL podem estar envolvidos na modulação da palatabilidade ao sódio hipertônico.

ABSTRACT

Water and NaCl intake is strongly inhibited by the activation of α_2 -adrenergic receptors with clonidine or moxonidine (α_2 -adrenergic/imidazoline agonists) injected peripherally or into the forebrain and by serotonin and cholecystokinin into the lateral parabrachial nucleus (LPBN), a pontine structure. Serotonergic and catecholaminergic neurons are present in the projection from AP/NTS to the LPBN and the presence of α_2 -adrenergic sites in the LPBN has been shown. The aim of the present study was to investigate the possible involvement of α_2 -adrenergic receptors of the LPBN in the control of water and 0.3 M NaCl intake induced by the treatment with subcutaneous furosemide (FURO, 10 mg/kg of body weight) + captopril (CAP, 5 mg/kg of body weight) and also during cellular dehydration induced by intragastric 2 M NaCl load (2 ml). In addition, the possible interaction between α_2 -adrenergic receptors and serotonergic, GABAergic or opioidergic mechanisms in the LPBN to control of water and 0.3 M NaCl intake was also investigated. Male Holtzman rats with cannulas implanted bilaterally in the LPBN were used. Contrary to forebrain injections, bilateral LPBN injections of moxonidine produced a strong and surprising increase in FURO + CAP-induced 0.3 M NaCl intake and a small increase in water intake, without change mean arterial pressure and heart rate or FURO + CAP-induced c-fos expression in forebrain areas related to the control of fluid-electrolyte balance. Prior injections of RX 821002 (α_2 -adrenergic antagonist, 10 and 20 nmol/0.2 μ l) abolished the effect of moxonidine (0.5 nmol) on 0.3 M NaCl intake. Bilateral injections of moxonidine (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN also induced a strong ingestion of 0.3 M NaCl intake, without changing water intake in rats with increased plasma osmolarity. However, moxonidine into the LPBN in satiated rats not treated with 2 M NaCl produced no change on 0.3 M NaCl intake. The activation of the LPBN α_2 -adrenoceptors inhibited the LPBN serotonergic inhibitory mechanism involved in

the control of water and NaCl intake, and the increase in FURO+CAP-induced sodium intake produced by the activation of the α_2 -adrenergic receptors in the LPBN was partially dependent on GABAergic or opioidergic mechanisms in the LPBN. In rats submitted to the taste reactivity test to oral infusions of a 0.3 M sodium solution, the blockage serotonergic receptors into the LPBN enhanced positive hedonic taste reactivity patterns. In conclusion, previous and present results indicate opposite roles for α_2 -adrenergic receptors in the control of sodium and water intake according to their distribution in the rat brain. The α_2 -adrenergic activation into the LPBN produces a potent increase in hypertonic sodium intake during extracellular and cellular dehydration. These effects of α_2 -adrenergic activation into the LPBN is possibly due to the inhibitory serotonergic mechanisms blockage into the LPBN and at least part of these effects is also dependent of an interaction with GABAergic and opioidergic mechanisms into the same area. Finally, the blockade of serotonergic receptors in the LPBN can enhance sodium palatability thus contributing to the increase in sodium intake during cell dehydration.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ANG I – angiotensina I
ANG II – angiotensina II
ANP – peptídeo natriurético atrial
AP – área postrema
ASM – área septal medial
AV3V – região anteroventral do terceiro ventrículo
CAP – captopril
CCK – colecistocinina
DOCA – acetato de desoxicorticosterona
DOI – agonista serotoninérgico
FC – frequência cardíaca
FURO – furosemida
g – grama(s)
h – hora(s)
icv – intracerebroventricular
kg – quilograma
M – molar
mEq – miliequivalente
mg – miligrama(s)
min - minutos
ml – mililitro(s)
mm – milímetro(s)
MnPO – núcleo pre-óptico mediano
NaCl – cloreto de sódio
NPBL – núcleo parabraquial lateral
NTS – núcleo do trato solitário
NTSm – núcleo do trato solitário medial
OCVs – órgãos circunventriculares
OT – ocitocina
OVL – órgão vascular da lâmina terminal
PAM – pressão arterial média
PBS – salina em tampão fosfato

PVN – núcleo paraventricular

Sal – salina

sc – subcutâneo

SFO – órgão subfornical

SNC – sistema nervoso central

Vei – veículo

VL – ventrículo lateral

% - por cento

α - alfa

β - beta

± - mais ou menos

μg – micrograma(s)

μl – microlitro(s)

μm – micrometro(s)

< - menor

> - maior

5-HT – serotonina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Equipamento utilizado no teste de reação ao sabor	47
Figura 2: Localização histológica das injeções bilaterais no NPBL	62
Figura 3: Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina (5, 10 e 20 nmol) sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP.....	65
Figura 4: Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina (0,1, 0,5 e 1 nmol) sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP	66
Figura 5: Efeitos de injeções bilaterais de clonidina (0,5, 1 e 5 nmol) sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP	67
Figura 6: Efeitos de injeções bilaterais de α -metilnoradrenelina (40 e 80 nmol) sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP	69
Figura 7: Efeitos da prévia injeção de RX 821002 sobre o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M produzido pelas injeções bilaterais de moxonidina no NPBL.....	71
Figura 8: Efeitos da prévia injeção de RX 821002 sobre o aumento da ingestão de água produzido pelas injeções bilaterais de moxonidina no NPBL	72
Figura 9: Efeitos da prévia injeção de RX 821002 sobre o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M e água produzido pelas injeções bilaterais de α -metilnoradrenelina no NPBL	74
Figura 10: Imunorreatividade da proteína c-Fos em áreas prosencefálicas em ratos tratados com FURO + CAP após injeções de moxonidina no NPBL	79
Figura 11: Fotomicrografias do órgão vasculoso da lâmina terminal mostrando a imunorreatividade da proteína c-Fos após diferentes tratamentos.....	80
Figura 12: Fotomicrografias do órgão subfornical mostrando a imunorreatividade da proteína c-Fos após diferentes tratamentos	81
Figura 13: Fotomicrografias do núcleo pré-óptico mediano dorsal mostrando a imunorreatividade da proteína c-Fos após diferentes tratamentos.....	82
Figura 14: Fotomicrografias do núcleo pré-óptico mediano ventral mostrando a imunorreatividade da proteína c-Fos após diferentes tratamentos.....	83
Figura 15: Fotomicrografias do núcleo paraventricular mostrando a imunorreatividade da proteína c-Fos após diferentes tratamentos.....	84
Figura 16: Fotomicrografias do núcleo supra-óptico mostrando a imunorreatividade da proteína c-Fos após diferentes tratamentos.....	85
Figura 17: Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de sacarose 0,06 M	87

Figura 18: Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, água e alimento induzidas por 14 h de privação alimentar	89
Figura 19: Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, água e alimento induzidas por 24 h de privação alimentar	90
Figura 20: Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos com 24 h de privação alimentar	91
Figura 21: Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com desidratação celular	93
Figura 22: Efeitos da combinação de injeções de RX 821002 (10 nmol) e moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com desidratação celular	94
Figura 23: Efeitos da combinação de injeções de RX 821002 (20 nmol) e moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com desidratação celular	945
Figura 24: Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos submetidos a privação hídrica	98
Figura 25: Efeitos da combinação de injeções de moxonidina e DOI no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP	100
Figura 26: Efeitos da combinação de injeções de metisergida e RX 821002 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP	101
Figura 27: Efeitos da combinação de injeções de bicuculina e moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP	103
Figura 28: Efeitos da combinação de injeções de saclofen e moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP	104
Figura 29: Efeitos da combinação de injeções de naloxona e moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com FURO + CAP	106
Figura 30: Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina e metisergida no NPBL sobre as respostas hedônicas a infusão intra-oral de NaCl 0,3 M.....	108
Figura 31: Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina e metisergida no NPBL sobre as respostas aversivas a infusão intra-oral de NaCl 0,3 M.....	109
Figura 32: Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina e metisergida no NPBL sobre as respostas neutras a infusão intra-oral de NaCl 0,3 M.....	110
Figura 33: Diagrama representativo do envolvimento do NPBL no controle da sede e apetite ao sódio durante a desidratação celular	123
Figura 34: Esquema do mecanismo serotoninérgico inibitório e a possível interação com os outros mecanismos do NPBL para o controle da ingestão de água e sódio.....	128

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Especificidade do NPBL como local de ação da moxonidina para os efeitos da ingestão de NaCl 0,3 M e água	76
Tabela 2: Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com desidratação celular que receberam injeções de moxonidina ou veículo em locais fora do NPBL	96

SUMÁRIO

1 – INTRODUÇÃO	20
2 – OBJETIVOS	38
3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	39
3.1 – Animais	39
3.2 – Cirurgia cerebral.....	39
3.3 – Injeção de fármacos no cérebro.....	40
3.4 – Fármacos utilizados.....	40
3.5 – Medida da ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP.	42
3.6 – Medida da ingestão de alimento, água e NaCl 0,3 M induzida por privação de alimento.	42
3.7 – Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M.....	43
3.8 – Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por 24 horas de privação hídrica	43
3.9 – Procedimento imunohistoquímico	44
3.10 – Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca	45
3.11 – Teste de reação ao sabor.....	46
3.12 – Análise dos dados dos testes de reação ao sabor.....	48
3.13 – Análise histológica	48
3.14 – Análise estatística.....	49
3.15 – Protocolos experimentais	50
4 – RESULTADOS	61
4.1 – Localização histológica das cânulas no NPBL	61
4.2 – Efeitos de injeções bilaterais de agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc.	63
4.3 – Efeitos de injeções bilaterais de agonista adrenérgico α_2 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc.....	68

4.4 – Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista adrenérgico α_2 + agonista adrenérgico α_2 /imidazólico no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc.....	70
4.5 – Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista adrenérgico α_2 + agonista adrenérgico α_2 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc.....	73
4.6 – Testes de especificidade do NPBL como local de ação da moxonidina para a ingestão de NaCl 0,3 M e água.....	75
4.7 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).....	77
4.8 – Estudo da expressão da proteína c-Fos em algumas áreas prosencefálicas após administração de moxonidina no NPBL em ratos tratados com FURO + CAP.	77
4.9 – Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de sacarose 0,06 M.	86
4.10 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de alimento induzida por privação de alimento e ingestão de água e NaCl 0,3 M associada a ingestão de alimento.	88
4.11 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina sozinha ou combinada com RX 821002 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M.	92
4.12 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por 24 h de privação hídrica.	97
4.13 – Interação entre o mecanismos serotoninérgico e adrenérgico α_2 no controle da ingestão água e NaCl.	99
4.14 – Interação entre o mecanismos GABAérgico e adrenérgico α_2 do NPBL no controle da ingestão água e NaCl.	102
4.15 – Interação entre o mecanismos opioidérgico e adrenérgico α_2 no controle da ingestão água e NaCl.	105
4.16 – Efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos e do bloqueio serotoninérgico no NPBL sobre o teste de reação ao sabor	107
5 – DISCUSSÃO	111
5.1 – Papel dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL na ingestão de NaCl	111
5.2 – Ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL e desidratação intracelular	118

5.3 – Interação entre os mecanismos adrenérgico α_2 e os mecanismos serotoninérgico, GABAérgico e opioidérgico do NPBL.....	124
5.4 – Efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 e do bloqueio serotoninérgico no teste de reação ao sabor do NaCl hipertônico.....	129
6 – CONCLUSÕES.....	132
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	133

1 – INTRODUÇÃO

Regulação neuroendócrina da ingestão de água e sódio

A regulação precisa do volume dos líquidos corporais e da osmolaridade plasmática é fundamental para a sobrevivência das células. A água é responsável por cerca de 60 % do peso corporal, estando dois terços da água no compartimento intracelular e um terço no compartimento extracelular. O sódio (Na^+) é um importante constituinte do compartimento extracelular e o maior determinante da osmolaridade, assim como do volume do líquido extracelular. Portanto, a quantia de sódio nos líquidos corporais deve ser mantida dentro de estreitos limites de variação para assegurar um funcionamento ideal de inúmeros processos fisiológicos. A sede, sensação da necessidade de água, é um mecanismo de defesa do organismo para aumentar o consumo de água em resposta à percepção das deficiências dos líquidos corporais, e a ingestão de NaCl, também chamada de apetite ao sódio, contribui para repor as necessidades de NaCl do organismo (FITZSIMONS, 1998).

Normalmente, mais água e sódio são ingeridos do que o necessário para a sobrevivência. As sociedades ocidentais ingerem uma quantidade de sódio na dieta acima do necessário, e esse excesso pode estar associado a doenças, como por exemplo, a hipertensão. O excesso é excretado, e a regulação dos líquidos corporais é feita por mecanismos renais. Contudo, mecanismos que asseguram a ingestão continuada dessas substâncias são fundamentais para a regulação do equilíbrio hidroeletrolítico. Um aumento na osmolaridade plasmática cerca de 2% e hipovolemia em torno de 10% causam sede em humanos (FITZSIMONS, 1985). Em relação à ingestão de sódio, vários estudos mostram aumento da preferência ao sódio em humanos submetidos a diversas situações em que o balanço hidro-mineral está alterado, como por exemplo, administração de diuréticos acompanhada de dieta

hipossódica, privação hídrica mais sudorese, hemodiálise e gestação (BEAUCHAMP et al., 1990; TAKAMATA et al., 1994; LESHEM & RUDOY, 1997; DUFFY et al., 1998).

Quando a concentração extracelular de sódio aumenta, há um aumento na pressão osmótica efetiva do compartimento extracelular, promovendo uma redução do volume de água das células, caracterizando assim a “desidratação intracelular”. A desidratação pode ser absoluta quando há perda de água dos compartimentos celular e extracelular, como acontece na privação de água, ou relativa se existir apenas uma perda de água celular, que se difunde para o líquido extracelular, como ocorre, por exemplo, na ingestão ou sobrecarga de solutos osmoticamente ativos. Em situações como hemorragia, diarreia, vômito, depleção de sódio, etc, ocorre redução unicamente do volume do líquido extracelular, caracterizando assim a “desidratação extracelular”. É importante destacar que nessa situação há uma perda conjunta de água e de sódio, e por isso ela é geralmente acompanhada de comportamento apetitivo ao sódio. Embora os dois tipos de desidratação sejam experimentalmente e clinicamente separáveis, é comum a ocorrência simultânea de ambas, principalmente durante privação hídrica (DE LUCA JR et al., 2005).

O comportamento de ingestão é a única forma pela qual um animal pode repor as perdas de água e NaCl. A ingestão de água e NaCl é regulada por mecanismos ativados em situações de hipovolemia ou alterações de osmolaridade plasmática e depende de receptores localizados em diferentes partes do corpo (por exemplo, barorreceptores e osmorreceptores) ou hormônios (angiotensina II e aldosterona) que ativam algumas regiões cerebrais específicas, desencadeando as respostas comportamentais de busca pela água e NaCl, (JOHNSON & THUNHORST, 1997).

Um pequeno aumento de 1 – 2% na pressão osmótica efetiva do plasma resulta na estimulação da sede em mamíferos. Há mais de 25 anos, um papel importante do tecido localizado ao redor da porção anterior do terceiro ventrículo nos mecanismos da sede foi

evidenciado ao se demonstrar que a ablação da região antero ventral do terceiro ventrículo (AV3V) de carneiros e ratos causava adipsia permanente, (ANDERSSON, 1978; JOHNSON et al., 1996). Em estudos subseqüentes, novas evidências confirmaram que no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e no órgão subfornical (SFO) provavelmente estão localizados os osmorreceptores. O SFO e o OVLT são dois órgãos circumventriculares que se situam fora da barreira hematoencefálica, e estão situados na lâmina terminal. Trabalhos eletrofisiológicos e imunohistoquímicos sugerem que os neurônios dos órgãos circumventriculares são ativados através de suas células sódio e angiotensina II-sensíveis, durante uma deficiência aguda de sódio corporal (VIVAS et al., 1990; VIVAS et al., 1995; PASTUSKOVAS & VIVAS, 1997). O núcleo pré-óptico mediano (MnPO), o qual também faz parte da região AV3V, recebe aferências dos neurônios do SFO e OVLT e pode integrar sinais neurais vindos desses órgãos circumventriculares com as informações sensoriais viscerais vindas do tronco cerebral (MCKINLEY & JOHNSON, 2004).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é um importante sistema hormonal ativado em situações de hipovolemia. A renina, uma enzima proteolítica, atua sobre o substrato plasmático, o angiotensinogênio (uma proteína globular sintetizada no fígado), produzindo um decapeptídeo, a angiotensina I (ANG I). A ANG I sob a ação da enzima conversora da angiotensina (ECA) localizada especialmente nos endotélios da circulação pulmonar, produz um octapeptídeo ativo, identificado como angiotensina II (ANG II). Atualmente, sabe-se que a fonte de renina é o aparelho justaglomerular renal, e que as células da mácula densa também exercem importante função no controle da secreção da renina. Fatores como redução da pressão de perfusão arterial renal, redução da concentração do íon sódio para a mácula densa, aumento da atividade do nervo renal, ativação dos receptores do subtipo β_1 adrenérgicos, catecolaminas ou prostaglandinas circulante, ativam a secreção de renina (FITZSIMONS, 1998).

Estudos clássicos de Fitzsimons e colaboradores (para revisão vide FITZSIMONS, 1998) foram os primeiros a demonstrar que a renina e seu peptídeo efetor ANG II eram efetivos como estímulos dipsogênicos. Além de estimular a ingestão de água e de sódio, a ANG II apresenta outras funções fisiológicas, como regulação da pressão arterial, excreção de sódio, e a secreção de vasopressina, podendo ter também importantes funções no aprendizado e memória (FITZSIMONS, 1998). Receptores centrais para ações da ANG II já foram demonstrados em diversas áreas cerebrais como órgão subfornical, órgão vasculoso da lâmina terminal, núcleo paraventricular, núcleo pré-óptico mediano, área postrema e núcleo do trato solitário, (LEWIS et al., 1986; MCKINLEY et al., 1987; ALLEN et al., 1988). Dos vários receptores de ANG II (existem pelo menos quatro) os mais importantes para seu efeito dipsogênico são os receptores AT₁ presentes em órgãos cincunventriculares prosencefálicos, tais como SFO e OVLT, podendo haver também alguma participação de receptores AT₂ (FITZSIMONS, 1998).

A aldosterona, um mineralcorticóide, também tem papel fundamental na conservação de sódio no organismo, e é o sinal endócrino final do sistema renina-angiotensina-aldosterona. A secreção de aldosterona pela zona fasciculada da adrenal é regulada pela ANG II e concentração extracelular de potássio. A aldosterona atua nos ductos coletores renais e cólon para regular a (re)absorção de sódio e secreção de potássio (BOOTH et al., 2002). Atuando no SNC, em áreas como no núcleo central da amígdala, a aldosterona induz aumento do apetite ao sódio (GALAVARNA et al., 1991; SAKAI et al., 1996).

Variações no volume e na osmolaridade plasmática desencadeiam alterações nos níveis plasmáticos de vasopressina, ocitocina e peptídeo natriurético atrial (ANP). Os neurônios responsáveis pela síntese e liberação de vasopressina e ocitocina localizam-se no núcleo paraventricular (PVN) e núcleo supra-óptico (SON), tendo uma predominância de neurônios de ocitocina no PVN e neurônios vasopressinérgicos no SON [para revisão vide

(ANTUNES-RODRIGUES et al., 2004)]. A vasopressina (AVP), também conhecida como hormônio antidiurético (ADH), desempenha importante função na homeostase hídrica, atuando diretamente no nas células renais responsáveis pela reabsorção de água livre, conservando água corporal. Verney (1947) originalmente demonstrou que a liberação de AVP na circulação sanguínea é estimulada pela ativação dos osmorreceptores (VERNEY, 1947). A liberação de AVP também é estimulada pela hipovolemia e queda na pressão arterial.

Em situações de expansão do volume ou aumento da osmolaridade plasmática ocorre a liberação do peptídeo natriurético atrial (ANP), um peptídeo de 28 aminoácidos, sintetizado principalmente nos miócitos atriais. O ANP participa da manutenção do volume por produzir diurese, natriurese e vasodilatação (DE BOLD et al., 1981). O ANP também inibe a ação vasoconstritora da ANG II, AVP (vasopressina) e noradrenalina (BAXTER et al., 1988). Administração central ou periférica de ANP reduz a ingestão de água (induzida por privação hídrica) e de sódio (induzida por depleção de sódio), (ANTUNES-RODRIGUES et al., 1985; ANTUNES-RODRIGUES et al., 1986; MCCANN et al., 1996).

A ocitocina (OT) é secretada na circulação sanguínea durante expansão de volume, particularmente durante expansão hipertônica, e tem ação natriurética, um mecanismo importante para compensar ou pelo menos atenuar essa expansão (MCCANN et al., 2003). Complementando a ação renal, esse hormônio também inibe a sede e o apetite ao sódio. A ocitocina plasmática aumenta em resposta a uma carga osmótica e este aumento é revertido em resposta à diluição do líquido extracelular durante a ingestão de água que precede o apetite ao sódio em animais hipovolêmicos (VERBALIS et al., 1995; BLACKBURN et al., 1995). Injeção intracerebroventricular de ocitocina reduz a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio e a injeção de antagonista de ocitocina pela mesma via potencia a ingestão de sódio induzida por angiotensina II (VERBALIS et al., 1995; SATO et al., 1997). Concomitantemente à ativação de mecanismos facilitadores do apetite ao sódio (ANG II,

aldosterona, desativação de receptores de volume), a ocitocina central participa dos mecanismos que inibem o apetite ao sódio nas fases iniciais de hipovolemia. Os mecanismos inibitórios seriam desativados durante a redução da osmolaridade extracelular, liberando então a ação dos mecanismos facilitadores (VERBALIS et al., 1995; BLACKBURN et al., 1995).

Pesquisas pioneiras com lesão ou estimulação seletiva de áreas cerebrais foram importantes para se identificar como algumas áreas prosencefálicas estão envolvidas com a produção ou inibição da sede e do apetite ao sódio. A ativação elétrica do hipotálamo lateral induz sede que pode ser aumentada ou suprimida pela estimulação elétrica do dorso da área septal e do núcleo leito da estria terminal, respectivamente (MOGENSON, 1975). Os resultados de vários estudos com lesão seletiva sugeriram uma hierarquia entre as três áreas límbicas no controle do apetite ao sódio, com o hipotálamo - médio basal, ativador; lateral anterior, inibidor - exercendo as principais funções, sendo estas moduladas pela área septal e amígdala, com a ação da segunda se sobrepondo à da terceira (COVIAN et al., 1975).

O modelo atual da ação dipsogênica da angiotensina II admite que a quantidade aumentada do hormônio circulante em resposta a uma hipovolemia se difunde para o espaço extracelular parenquimal ativando neurônios do SFO, que então se projetam formando a primeira estação sináptica em estruturas com barreira hematoencefálica como, por exemplo, no MnPO, de onde partem sinais em direção aos circuitos neurais que comandam a ingestão de água (OLDFIELD & MCKINLEY, 1995; JOHNSON & THUNHORST, 1997; MCKINLEY et al., 2001; MCKINLEY & JOHNSON, 2004). A ablação combinada de ambos SFO e OVLT deixando apenas uma parte do MnPO intacta, reduz, mas não abole a ingestão de água induzida osmoticamente, (MCKINLEY et al., 1999). Esses dados sugerem que os neurônios do MnPO podem ser sensíveis a osmolaridade também ou que eles recebem informação relacionadas a osmolaridade vindas de outras partes do cérebro [por exemplo, a

área postrema (AP)] ou do corpo (por exemplo, sistema porta hepático), (MCKINLEY & JOHNSON, 2004).

Além dos fatores humorais (osmolaridade, concentração de sódio, hormônios) agindo em áreas prosencefálicas e nos circuitos que facilitam a ingestão de água e de sódio, informações dos barorreceptores arteriais, receptores de volume e receptores de baixa pressão chegam ao tronco cerebral e também contribuem para controlar a ingestão de água e sódio, (JOHNSON & THUNHORST, 1997).

Assim como os mecanismos excitatórios, os mecanismos inibitórios também são importantes no controle da ingestão de água e sódio. Um mecanismo inibitório da ingestão de água e de sódio presente em áreas prosencefálicas envolve os receptores adrenérgicos α_2 . No tronco cerebral, um importante mecanismo inibitório para o controle da ingestão de água e especialmente de sódio foi descrito recentemente no núcleo parabraquial lateral. Esses mecanismos inibitórios são descritos a seguir.

Receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos no controle da ingestão de água e sódio

Na década de setenta foi sugerido que a ação dipsogênica da angiotensina II dependia de sua interação com catecolaminas cerebrais, particularmente dopamina e noradrenalina (para revisão vide DE LUCA JR et al., 1994; FITZSIMONS, 1998). Essa sugestão provém de estudos utilizando a aplicação intracerebral de toxina específica para neurônios catecolaminérgicos, que diminui a ingestão de água induzida por angiotensina II, e essa inibição é revertida pela injeção central de noradrenalina. O uso de antagonistas adrenérgicos específicos mostra que a noradrenalina age em adrenoceptores α_1 prosencefálicos para mediar a ação dipsogênica da angiotensina II (BARBOSA et al., 1995). Entretanto, é curioso ressaltar que a injeção direta de noradrenalina em áreas prosencefálicas tipicamente reduz de forma dose-dependente tanto a ingestão de água como a de sódio, mas não a ingestão de alimento

(SUGAWARA et al., 1999). Assim, tem sido sugerido que a noradrenalina tem um papel duplo no controle da ingestão de água e de sódio (DE LUCA JR et al., 1994; DE LUCA JR et al., 2005).

A ação inibidora da noradrenalina envolve outra classe de receptores, os receptores adrenérgicos α_2 . Há mais de 3 décadas foram demonstradas evidências da participação dos receptores adrenérgicos α_2 centrais na inibição da sede, e mais recentemente do apetite ao sódio. Os agonistas de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, como a clonidina e a moxonidina, são os mais eficientes para inibir a ingestão de água e sódio induzida por diferentes estímulos (LE DOUAREC et al., 1971; FREGLY et al., 1981; FREGLY et al., 1984a; FREGLY et al., 1984b; FERRARI et al., 1990; CALLERA et al., 1993; DE PAULA et al., 1996; DE LUCA JR & MENANI, 1997; MENANI et al., 1999).

Le Douarec e colaboradores demonstraram o efeito antidipsogênico da clonidina administrada periféricamente em ratos privados de água (LE DOUAREC et al., 1971). Injeções centrais ou periféricas de clonidina reduzem a ingestão de água induzida pela administração periférica de salina hipertônica, ANG II ou desidratação, (FREGLY et al., 1981; FREGLY et al., 1984a; FREGLY et al., 1984b). A clonidina injetada diretamente em áreas cerebrais como o hipotálamo lateral, área pré-óptica e área septal média (ASM) produziu uma inibição da ingestão de água induzida por diferentes estímulos (FERRARI et al., 1990; LEITE et al., 1992; CALLERA et al., 1993). Mais recentemente, outros estudos mostraram que além de inibir a ingestão de água, a clonidina atuando centralmente é um potente inibidor da ingestão de sódio (DE PAULA et al., 1996; DE LUCA JR & MENANI, 1997; YADA et al., 1997a; YADA et al., 1997b). O pré-tratamento central com ioimbina (antagonista de receptores adrenérgicos receptores α_2) reduz o efeito antidipsogênico da clonidina (FREGLY et al., 1984a) e o pré-tratamento com idazoxan, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos, reduz os efeitos inibitórios da clonidina sobre a

ingestão de água e sódio (YADA et al., 1997b), sugerindo a participação dos receptores adrenérgicos receptores α_2 nos efeitos da clonidina.

A inibição da ingestão de água ou sódio hipertônico também foi demonstrada com injeções de moxonidina, outro agonista de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos, no ventrículo lateral (VL) e área septal medial (MENANI et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2003; ANDRADE et al., 2003). O pré-tratamento com injeções intracerebroventriculares (icv) de RX 821002 (antagonista de receptores adrenérgicos α_2) aboliu os efeitos inibitórios da moxonidina sobre a ingestão de água induzida por ANG II (MENANI et al., 1999). Injeções de RX 821002 e ioimbina (antagonista de receptores adrenérgicos α_2) aboliram o efeito inibitório da moxonidina sobre a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio (DE OLIVEIRA et al., 2003). Esses resultados sugerem a participação dos receptores adrenérgicos α_2 nos efeitos inibitórios da moxonidina sobre a ingestão de água e sódio.

A noradrenalina, um ligante endógeno sem característica imidazólica, injetada icv também inibe a ingestão de água e de sódio, um efeito antagonizado pelo pré-tratamento com idazoxan, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos (SUGAWARA et al., 1999), confirmando a participação dos receptores adrenérgicos α_2 localizados em áreas prosencefálicas na inibição da ingestão de água e de sódio.

O efeito anti-hipertensivo dos agonistas de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, como a clonidina e moxonidina, é atribuído a uma redução da atividade simpática produzida pela ação central em receptores imidazólicos do bulbo ventrolateral rostral (ERNSBERGER et al., 1993; HAXHIU et al., 1994; ERNSBERGER & HAXHIU, 1997). Além da inibição da atividade simpática, esses agonistas apresentam efeitos diurético e natriurético, (PENNER & SMYTH, 1994a; PENNER & SMYTH, 1994b; PENNER & SMYTH, 1995). Embora a moxonidina quando injetada no VL induz a diurese e natriurese e inibe a ingestão de água e de sódio, ela não altera a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC), (PENNER

& SMYTH, 1994a; PENNER & SMYTH, 1994b; PENNER & SMYTH, 1995; NURMINEN et al., 1998; MENANI et al., 1999; SUGAWARA et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2003; ANDRADE et al., 2003; MOREIRA et al., 2004). Mas quando injetada em áreas posteriores, como no 4º ventrículo, o único efeito conhecido da moxonidina é a redução da PAM e FC, (NURMINEN et al., 1998; MOREIRA et al., 2004).

A presença de receptores imidazólicos já foi demonstrada em várias regiões do SNC, (RUGGIERO et al., 1998). A literatura tem enfatizado que os receptores adrenérgicos α_2 e os receptores imidazólicos são estruturas independentes, (BOUSQUET et al., 1992; FRENCH, 1995; ERNSBERGER et al., 1995; REIS & PILETZ, 1997; BOUSQUET et al., 2003). De um modo geral, as drogas que atuam simultaneamente nos dois receptores são mais potentes para produzir efeitos agonistas ou antagonistas sobre a inibição da ingestão de água e de sódio. Uma hipótese para se entender esses resultados é se admitir que receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos não sejam estruturas totalmente independentes funcionalmente. Haveria uma interação complexa entre esses dois tipos de receptores e o efeito final dependeria de como a droga injetada estaria atuando nesses dois receptores, (HIEBLE & RUFFOLO JR, 1995; SUGAWARA et al., 2001).

Assim, agonistas específicos de receptores adrenérgicos α_2 , como a noradrenalina ou mesmo a α -metilnoradrenalina, podem produzir efeitos semelhantes aos dos agonistas adrenérgico/imidazólicos como clonidina ou moxonidina, mas para isso precisam ser injetados em doses 5 a 10 vezes maiores. Ou seja, a ativação de receptores adrenérgicos α_2 isoladamente não é tão eficiente como a ativação simultânea dos dois receptores. Por outro lado, o bloqueio simultâneo dos dois receptores também seria muito mais eficaz para abolir os efeitos dos agonistas. A limitação para se testar os diferentes aspectos dessa hipótese é a inexistência, até hoje, de agonistas e antagonistas específicos de receptores imidazólicos, uma vez que todos têm pelo menos alguma afinidade pelos receptores adrenérgicos α_2 . De

qualquer modo, os prévios estudos confirmaram a participação dos receptores adrenérgicos α_2 localizados em áreas prosencefálicas na inibição da ingestão de água e de sódio (FREGLY et al., 1984a; DE PAULA et al., 1996; DE LUCA JR & MENANI, 1997; YADA et al., 1997a; MENANI et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2003).

Importância do núcleo parabraquial lateral no controle da ingestão de sódio e água

No tronco cerebral, um importante mecanismo inibitório para o controle da ingestão de água e especialmente de sódio foi descrito para o núcleo parabraquial lateral (NPBL), uma estrutura pontina que se situa dorsolateralmente ao pedúnculo cerebelar superior, (EDWARDS & JOHNSON, 1991; MENANI & JOHNSON, 1995; MENANI et al., 1996; COLOMBARI et al., 1996; MENANI et al., 1998a; MENANI et al., 1998b; MENANI J V et al., 2000). O NPBL também tem papel importante no controle respiratório [para revisão vide (EZURE, 2004)], e regulação cardiovascular (WARD, 1988; HADE et al., 1988; BLAIR et al., 2001; HAIBARA et al., 2002).

Os primeiros estudos mostraram que lesão eletrolítica ou a lesão neurotóxica (com injeção de ácido ibotênico) no NPBL em ratos levava a um aumento da ingestão de água induzida pela administração central ou periférica de ANG II ou injeção periférica de isoproterenol (OHMAN & JOHNSON, 1986; OHMAN & JOHNSON, 1989; JOHNSON & EDWARDS, 1990; EDWARDS & JOHNSON, 1991). Outros estudos têm mostrado que injeções bilaterais no NPBL de metisergida, um antagonista de receptores serotoninérgicos, aumenta a ingestão de NaCl induzida pela ANG II administrada tanto icv quanto no órgão subfornical (MENANI et al., 1996; COLOMBARI et al., 1996). Metisergida injetada bilateralmente no NPBL também aumentou a ingestão de NaCl induzida pelo tratamento combinando o diurético furosemida e o bloqueador da enzima conversora de angiotensina captopril, ambos injetados subcutaneamente (MENANI et al., 1996). Por outro lado, a injeção

de DOI (agonista de receptores 5-HT_{2A/2C}) no NPBL reduziu a ingestão de NaCl induzida pelo tratamento com furosemida + captopril subcutaneamente (sc), (MENANI et al., 1996).

O tratamento com o diurético furosemida (10 mg/kg de peso corporal) + o inibidor da enzima conversora de angiotensina II captopril (5 mg/kg de peso corporal) sc induz uma significativa ingestão de NaCl 0,3 M que se inicia num curto período de tempo (uma hora após o tratamento) devido à hipotensão associada a um aumento da formação de ANG II no cérebro (FITTS & MASSON, 1989; THUNHORST & JOHNSON, 1994; MENANI et al., 1996). O tratamento com furosemida (FURO) + captopril (CAP) sc induz a expressão para c-fos em estruturas como o órgão subfornical (SFO), órgão vascular da lâmina terminal (OVLT), núcleo pré-óptico mediano (MnPO), núcleo supra-óptico (SON), núcleo paraventricular (PVN), AP, NPBL, e NTS rostral e caudal (THUNHORST et al., 1998).

Outros estudos têm mostrado que metisergida injetada no NPBL aumenta a ingestão de água e NaCl hipertônico induzida por 24 horas de privação hídrica ou depleção de sódio (FURO subcutaneamente seguida de 24 horas com dieta deficiente de sódio), (MENANI et al., 1998a; MENANI et al., 1998b). Recentemente, foi demonstrado que estes mecanismos inibitórios serotoninérgicos do NPBL também exercem forte influência inibitória na ingestão de NaCl 1,8% induzida pelo tratamento com desoxicorticosterona (DOCA), um composto esteróide com propriedades semelhantes a aldosterona, (DE GOBBI et al., 2000). Além disso, estudo de De Luca Jr e cols demonstrou que o bloqueio serotoninérgico no NPBL combinado com o aumento da osmolaridade plasmática produzido por sobrecarga intragástrica de NaCl induz um aumento paradoxal da ingestão de NaCl hipertônico além da ingestão normal de água (DE LUCA JR et al., 2003). Além da serotonina, também a colecistocinina (CCK) no NPBL tem um papel inibitório na ingestão de água e sódio (MENANI & JOHNSON, 1998), demonstrando-se inclusive uma interdependência e cooperatividade entre serotonina (5-HT) e CCK no NPBL no controle da ingestão de água e sódio (DE GOBBI et al., 2001).

Tanaka e colaboradores empregando a técnica de microdiálise no NPBL estudaram a liberação de serotonina e seu metabólito 5-HIAA (ácido hidroxindolacético) em ratos tratados com FURO + CAP, com acesso ou não as buretas de sódio e de água, (TANAKA et al., 2004). Foi verificado que com a ingestão de NaCl 1,8% e água, os níveis extracelulares de 5-HT e de 5-HIAA significativamente aumentaram no NPBL. Os níveis de 5-HT e de 5-HIAA significativamente reduziram no NPBL nos animais tratados com FURO + CAP que não tiveram acesso ao sódio e à água. Isto é, em animais depletados de sódio ocorre redução da liberação de 5-HT no NPBL, e a ingestão de sódio e água causam uma elevação na concentração de 5-HT, que por sua vez restabelece a inibição do comportamento de ingestão.

Outros estudos também já demonstraram o papel inibitório do glutamato e do fator liberador de corticotrofina na ingestão de água e sódio (XU et al., 1997; DE CASTRO E SILVA et al., 2005). Mais recentemente ainda, foi demonstrado também o envolvimento dos receptores GABAérgicos e receptores opioidérgicos do NPBL no controle da ingestão de sódio (OLIVEIRA et al., 2005; CALLERA et al., 2005). Injeções bilaterais de muscimol (agonista GABA) no NPBL promove uma indução da ingestão de NaCl 0,3 M em ratos saciados, e o prévio tratamento com bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) reverteu esses efeito (CALLERA et al., 2005). Injeções do agonista opióide β -endorfina no NPBL também induzem ingestão de NaCl 0,3 M em ratos saciados e o pré-tratamento com o antagonista opióide naloxona aboliu esse efeito, (OLIVEIRA et al., 2005).

A região AP/NTSm recebe projeções aferentes dos receptores de volume (barorreceptores arteriais, cardiopulmonares), receptores gustatórios e outros receptores viscerais (NORGREN, 1981) e estes receptores podem influenciar a ingestão de água e sódio (JOHNSON & THUNHORST, 1997). O NPBL recebe muitas fibras provenientes da área postrema e porção adjacente do núcleo do trato solitário medial (AP/NTSm), (NORGREN, 1981; SHAPIRO & MISELIS, 1985) e a lesão da AP/NTSm também produz efeitos

semelhantes aos da lesão do NPBL na ingestão de água (OHMAN & JOHNSON, 1989). O NPBL também envia projeções para as áreas anteriores do cérebro envolvidas no controle hidroeletrólítico, tais como órgão subfornical, núcleo pré-óptico mediano, núcleo paraventricular hipotalâmico e amígdala (CIRIELLO et al., 1984; JHAMANDAS et al., 1992; KRUKOFF et al., 1993). Dessa forma, o NPBL pode ser uma região de integração entre as vias ascendentes vindas do NTSm e AP e as áreas anteriores envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico.

Além da importância sobre o equilíbrio hidroeletrólítico, o NPBL também está envolvido com a integração das informações dos receptores gustatórios. As sensações gustatórias chegam ao cérebro por meio de três principais vias: inervação vagal (X) da faringe, inervação glossofaríngea (IX) da parte posterior da língua e inervação facial (VII) da parte anterior da língua. É por meio desta última que o sabor do sódio chega ao SNC (FRANK et al., 1983). Secção do ramo corda do tímpano do nervo facial, mas não a secção do nervo glossofaríngeo, interrompe drasticamente a discriminação do NaCl de outros cloretos, enquanto que a discriminação aos outros sabores permanece intacta, (BRESLIN et al., 1993). As fibras do nervo corda do tímpano terminam na porção rostral do núcleo do trato solitário (NTS), (HAMILTON & NORGRÉN, 1984). Como revisado previamente (NORGRÉN, 1995), há projeções ascendentes do NTS para o núcleo parabraquial (PBN), que por sua vez envia sinais para regiões talâmicas, como o núcleo talâmico posteromedial ventral parvocelular (VPMpc), a qual envia projeções passando pela zona incerta até relevantes regiões corticais. Estudos com lesões tentaram determinar a importância de estruturas da via gustatória central para o aparecimento do apetite ao sódio. Lesões realizadas tanto no NTS, PBN ou VPMpc interromperam a mudança na reação ao sabor observada em animais intactos após a depleção de sódio, (FLYNN et al., 1991). Já as lesões do PBN e NTS, mas não do tálamo bloquearam a expressão comportamental do apetite ao sódio, observada em animais

intactos após a depleção de sódio, (FLYNN et al., 1991). Esses estudos mostram que o núcleo parabraquial contém a segunda estação sináptica das aferências gustatórias no rato, e é importante na reatividade ao sabor após a depleção de sódio.

Uma conexão da AP/NTSm para o NPBL tem a serotonina como neurotransmissor, (LANÇA & VAN DER KOOY, 1985). Um grande número de projeções do NTS e AP que se dirigem ao NPBL também utilizam a adrenalina ou noradrenalina como neurotransmissores (HERBERT & FLUGGE, 1995). Em um estudo utilizando-se técnicas de imunohistoquímica para marcação de neurônios com tirosina hidroxilase (TH) e serotonina (5-HT) da área postrema, verificou-se que muitos neurônios apresentaram imunorreatividade positiva para ambas TH e 5-HT e que mais de 40% desses neurônios duplamente marcados projetavam-se para o núcleo parabraquial, (MICELI et al., 1987).

Herbert e Flugge (1995) em um estudo para avaliar a distribuição de receptores adrenérgicos α_2 no núcleo parabraquial, utilizando-se como ligante o antagonista de receptores adrenérgicos α_2 rauwolscina marcada com trítio, demonstraram que o núcleo parabraquial exibe uma distinta distribuição de sítios de ligação adrenérgicos α_2 , sendo que a porção externa do NPBL é uma das áreas que apresenta o maior número de sítios de ligação (HERBERT & FLUGGE, 1995). Em outro estudo utilizando-se técnicas de imunohistoquímica, foram observados densos depósitos de produtos de imunorreatividade para o subtipo A do receptor adrenérgico α_2 em diversas áreas do SNC de ratos, dentre elas vários núcleos da amígdala, locus coeruleus e NPBL, (TALLEY et al., 1996).

Os receptores adrenérgicos α_2 são encontrados no sistema nervoso central e periférico, e têm localização tanto pré- quanto pós-sináptica, (FRENCH, 1995). No SNC, esses receptores têm importante papel na regulação da liberação de neurotransmissores através de autorreceptores localizados em terminais nervosos noradrenérgicos e de heteroreceptores localizados em outros tipos de neurônios, como a serotonina. Os receptores adrenérgicos α_2

estão acoplados a proteína G e suas funções são mediadas pelas proteínas G_i/G_o . Há quatro subtipos de receptores adrenérgicos α_2 farmacologicamente (2A, 2B, 2C, e 2D) e três geneticamente classificados (2A/D, 2B, e 2C). Todos os subtipos estão negativamente acoplados a adenilato ciclase e o efeito inibitório é mediado por meio da inibição da produção de AMP cíclico, (BYLUND, 1995).

A interação entre os receptores adrenérgicos α_2 prosencefálicos e os receptores serotoninérgicos do NPBL parece não existir. A ingestão de sódio produzida pela combinação de dose baixa de captopril com o diurético furosemida é inibida pela injeção do agonista serotoninérgico DOI no NPBL, mas essa inibição não é alterada pela injeção de idazoxan no ventrículo lateral (MARGATHO et al., 2002). Por outro lado, a atividade espontânea do tálamo visceral foi quase abolida após injeção do antagonista adrenérgico α_2 ioimbina no núcleo parabraquial, enquanto que prazosin (antagonista de receptores adrenérgicos α_1) ou propranolol (antagonista de receptores adrenérgicos β) não apresentaram efeito algum, (SALEH & CECHETTO, 1994). Esses resultados sugerem que projeção do NPBL para áreas prosencefálicas parece ser mediada por receptores adrenérgicos α_2 .

Considerando-se: a) os estudos demonstrando o envolvimento de receptores adrenérgicos α_2 em áreas prosencefálicas com a inibição da ingestão de água e sódio; b) a importância de mecanismos inibitórios do NPBL para o controle da ingestão de água e sódio; c) a presença de vias catecolaminérgicas que se originam na AP/NTS em direção ao NPBL; d) a existência de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL, surge então a questão se os receptores adrenérgicos α_2 do NPBL teriam alguma participação sobre o controle da ingestão de água e sódio. Para tanto, foi proposto investigar os possíveis efeitos de injeções bilaterais de agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos (moxonidina e clonidina) e do agonista específico de receptores adrenérgicos α_2 (α -metilnoradrenalina) no NPBL, sobre a ingestão de água e NaCl induzida pelo tratamento combinando FURO + CAP sc em ratos. O possível envolvimento

dos receptores adrenérgicos α_2 sobre os efeitos da moxonidina e α -metilnoradrenalina foi investigado pelo pré-tratamento no NPBL com RX 821002, um antagonista seletivo de receptores adrenérgicos α_2 (CLARKE & HARRIS, 2002), que pode ser facilmente dissolvido em um pequeno volume para ser injetado no NPBL. Adicionalmente, foi investigado se a moxonidina poderia modificar a pressão arterial média e frequência cardíaca e também a expressão de proteína c-fos em áreas prosencefálicas, como o SFO, PVN, SON, OVLT e MnPO. Caso sejam observados efeitos após a ativação adrenérgica no NPBL, também seria interessante investigar se há alguma interação entre os receptores adrenérgicos e serotoninérgicos, GABAérgicos e opioidérgicos no NPBL, sobre o controle da ingestão de água e NaCl, assim como já foi descrito para a 5-HT e CCK.

Além de estudar o efeito dessas drogas injetadas no NPBL numa situação de hipovolemia (tratamento com FURO + CAP), também foi investigado no presente estudo os possíveis efeitos de injeções de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e sódio induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. Esse tratamento induz uma desidratação intracelular, e portanto ingestão de líquidos (FITZSIMONS, 1985), devido a uma elevação de cerca de 4 % da osmolaridade e concentração de sódio plasmática (PEREIRA et al., 2002). Os possíveis efeitos da moxonidina sobre outros comportamentos de ingestão, como a ingestão de alimento e sacarose, também foram investigados.

O teste de reação ao sabor desenvolvido por Grill and Norgren (GRILL & NORNGREN, 1978) avalia reações afetivas espécie específicas (tal como protrusão da língua ou abertura aversiva da boca), desencadeadas pelo estímulo do sabor diretamente infundido na cavidade oral do rato, (GRILL & NORNGREN, 1978). Essa metodologia foi utilizada recentemente por Berridge e colaboradores (PECIÑA & BERRIDGE, 1996; SÖDERPALM & BERRIDGE, 2000; SMITH & BERRIDGE, 2005; PECIÑA & BERRIDGE, 2005). Usando

essa técnica, seria interessante também estudar os possíveis efeitos da ativação adrenérgica e do bloqueio serotoninérgico do NPBL sobre a reação ao sabor do sódio hipertônico.

2 – OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi estudar o possível envolvimento de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL, assim como a interação dos mecanismos adrenérgicos e serotoninérgicos, GABAérgicos e opioidérgicos do NPBL no controle da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento simultâneo com FURO + CAP subcutaneamente. Adicionalmente, foi também estudado o efeito da administração de moxonidina no NPBL na PAM e FC e na expressão de c-Fos em algumas áreas prosencefálicas após administração de moxonidina no NPBL em ratos tratados com FURO + CAP .

Os efeitos da injeção de moxonidina no NPBL também foram estudados na ingestão de sódio e de água em ratos com aumento da osmolaridade plasmática induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. Paralelamente, também foi investigado se em ratos com aumento da osmolaridade plasmática ocorreria alteração da percepção do sabor ao NaCl 0,3 M após o tratamento com metisergida ou moxonidina no NPBL.

3 – MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com peso de 290 a 310 g provenientes do Biotério do Campus da UNESP de Araraquara. Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, com livre acesso a ração Guabi (Paulínia, SP), água e solução de NaCl 0,3 M. Os ratos foram mantidos em salas climatizadas (temperatura de $23 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade $50 \pm 10\%$) com ciclo claro-escuro 12-12 h (luz 7:00 – 19:00 h). Os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal – CEEA da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP.

3.2 - Cirurgia cerebral

Os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal) via intraperitoneal e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e bregma foram utilizadas como referência para nivelar as cabeças dos ratos. Utilizando-se o bregma foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável nas cabeças dos ratos. Nesses pontos foram feitas trepanações dos ossos do crânio com uma broca esférica, abrindo-se orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Para o NPBL, cânulas de aço inoxidável (12 x 0,5 mm d.i.) foram posicionadas bilateralmente no cérebro conforme as coordenadas: 9,4 mm caudal ao bregma, 2,0 mm lateral à linha mediana e 4,1 mm abaixo da dura-máter. As cânulas foram posicionadas 2 mm acima do NPBL e fixadas nas cabeças dos ratos com parafusos e resina acrílica. Mandris metálicos foram utilizados para obliteração das cânulas. Os ratos receberam injeções profiláticas de penicilina (20.000 unidades via intramuscular). Diariamente os ratos foram manipulados e treinados com manobras utilizadas durante os procedimentos

experimentais. Os experimentos foram realizados 5-7 dias após o implante das cânulas no NPBL.

3.3 - Injeção de fármacos no cérebro

Os fármacos utilizados foram dissolvidos em solventes adequados (solução salina fisiológica ou uma mistura de propilenoglicol e água 2:1, conforme o caso) e foram injetados no cérebro dos ratos utilizando-se uma seringa Hamilton (5 μ l), conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pelas cânulas guias previamente fixadas no cérebro. A cânula injetora (0,3 mm diâmetro) foi 2 mm mais longa do que as cânulas guias. O volume de injeção no NPBL foi 0,2 μ l de cada lado.

3.4 – Fármacos utilizados

Cloridrato de moxonidina, agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, (doação da Solvay Pharma, Hannover, Alemanha), foi administrada no NPBL nas doses de 0,1; 0,5; 1,0; 5, 10 ou 20 nmol/0,2 μ l. Moxonidina foi dissolvida em uma mistura de propilenoglicol e água 2:1 (veículo). As maiores doses de moxonidina usadas inicialmente foram baseadas em prévios estudos (MENANI et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2003; ANDRADE et al., 2003). Alpha-metil-noradrenalina (α -metilnor), agonista de receptores adrenérgicos α_2 , (Research Biomedical International, RBI, Natick, MA, USA), foi dissolvida em veículo e administrada no NPBL nas doses de 40 ou 80 nmol/0,2 μ l, escolhidas baseadas em estudo anterior (SUGAWARA et al., 2001). Cloridrato de clonidina, agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos, (Research Biomedical International, RBI, Natick, MA, USA), foi dissolvida em salina isotônica e administrada no NPBL nas doses de 0,5; 1 ou 5 nmol/0,2 μ l. Cloridrato de RX 821002, antagonista de receptores adrenérgicos α_2 , (Research Biomedical International, RBI, Natick, MA, USA), foi dissolvido em salina

isotônica e administrado no NPBL nas doses de 5, 10, 20 e também na dose de 160 nmol/0,2 µl. A maior dose de RX 821002 utilizada foi baseada no estudo anterior de Menani *et al.*, 1999.

Maleato de metisergida, antagonista inespecífico de receptores serotoninérgicos, (Research Biomedical International, RBI, Natick, MA, USA), foi dissolvida em veículo e administrada no NPBL na dose de 4 µg/0,2 µl. Hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI), agonista de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A/2C}, (Research Biomedical International, RBI, Natick, MA, USA), foi dissolvido em salina isotônica e administrado no NPBL na dose de 5 µg/0,2 µl. As doses de metisergida e DOI utilizadas foram baseadas em estudos anteriores (MENANI & JOHNSON, 1995; MENANI *et al.*, 1996; MENANI *et al.*, 1998a; MENANI *et al.*, 1998b; MENANI J V *et al.*, 2002).

Bicuculina, antagonista de receptores GABA_A, (Tocris, Elisville, MO, USA) foi dissolvida em veículo e administrada no NPBL na dose de 5 nmol/0,2 µl. Saclofen, antagonista de receptores GABA_B, (Research Biomedical International, RBI, Natick, MA, USA) foi dissolvido em veículo e administrado no NPBL na dose de 5,0 nmol/0,2 µl. Cloridrato de naloxona, antagonista de receptores opióides, (Tocris, Elisville, MO, USA) foi dissolvida em veículo e administrada no NPBL na dose de 40 nmol/0,2 µl. Os animais controles receberam injeções no mesmo volume de salina isotônica ou veículo em todos os experimentos. As doses dos antagonistas GABAérgicos e do antagonista opioidérgico utilizadas foram baseadas em estudos anteriores de Callera *et al.*, 2005 e de Oliveira *et al.*, 2005, respectivamente.

Furosemida (FURO), diurético salinúrico, (10 mg/kg de peso corporal, administração subcutânea) foi dissolvida em salina isotônica com pH próximo a 9,0 ajustado com solução de hidróxido de sódio 0,1 N. Captopril (CAP), inibidor da enzima conversora de angiotensina, (5 mg/kg de peso corporal, administração subcutânea) foi dissolvido em salina isotônica.

Furosemida e captopril foram comprados da Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA. O tratamento com FURO + CAP foi utilizado como descrito previamente por Fitts & Masson, 1989 e Menani *et al.*, 1996.

3.5 – Medida da ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP.

Além de água e ração, os ratos tiveram à disposição tubos com NaCl 1,8% (0,3 M), desde pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos.

A ingestão de água e NaCl 1,8% foi induzida pelo tratamento combinando-se FURO (10 mg/kg de peso corporal) + CAP (5 mg/kg de peso corporal) sc. Imediatamente após o tratamento com FURO + CAP, os ratos foram mantidos sem água e sem NaCl 0,3 M por uma hora. Após esse período, foram oferecidos aos animais água e NaCl 0,3 M. Para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram utilizados tubos com divisão de 0,1 ml. Durante o período de teste da ingestão de água e NaCl, os ratos não tiveram acesso à ração. Foi aguardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.6 – Medida da ingestão de alimento, água e NaCl 0,3 M induzida por privação de alimento.

Além de água e ração, os ratos tiveram à disposição tubos com NaCl 1,8%, desde pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos.

A ingestão de alimento foi induzida por 14 ou 24 horas de privação de alimento, com água e NaCl 0,3 M disponíveis. Após esse período os ratos receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL, e nesse momento água e NaCl 0,3 M foram removidos da gaiola, para serem oferecidos posteriormente juntamente com a ração. Quinze minutos após as

injeções no NPBL foram oferecidos aos animais ração, água e NaCl 0,3 M. Para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram utilizados tubos com divisão de 0,1 ml. Para o registro da ingestão de alimento foram utilizados recipientes contendo ração previamente pesada, e por diferença de peso calculou-se a quantidade de ração ingerida em gramas. Foi aguardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.7 – Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M.

Além de água e ração, os ratos tiveram à disposição tubos com NaCl 0,3 M, desde pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos.

No momento do experimento, água, ração e NaCl 0,3 M foram removidos das gaiolas e os animais receberam sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M (2 ml/rato). Este procedimento foi utilizado para induzir uma desidratação intracelular, e, portanto ingestão de líquidos (FITZSIMONS, 1985), devido a uma elevação de cerca de 4 % da osmolaridade e concentração de sódio plasmática (PEREIRA et al., 2002). Água e NaCl 0,3 M foram oferecidos aos animais uma hora após a sobrecarga intragástrica. Para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram utilizados tubos com divisão de 0,1 ml. Durante o período de teste da ingestão de água e NaCl os ratos não tiveram acesso à ração. Foi aguardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

3.8 – Medida da ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por 24 horas de privação hídrica

Além de água e ração, os ratos tiveram à disposição tubos com NaCl 0,3 M desde pelo menos 5 dias antes do início dos experimentos.

A ingestão de água foi induzida por 24 horas de privação de água, sendo que o NaCl 0,3 M também foi removido. Após esse período os ratos receberam injeções bilaterais de moxonidina ou veículo no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL foram oferecidos aos animais água e NaCl 0,3 M. Para o registro da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram utilizados tubos com divisão de 0,1 ml. Foi aguardado sempre um intervalo de no mínimo 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o teste os ratos não tiveram acesso à ração.

3.9- Procedimento imunohistoquímico

A expressão de c-fos no OVLT, SFO, MnPO, PVN e SON foi estudada em ratos submetidos ao tratamento com FURO + CAP ou salina sc seguido após quarenta e cinco minutos de injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol) ou veículo no NPBL. Duas horas após o tratamento com FURO + CAP ou salina sc, os ratos foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg de peso corpóreo) e submetidos a uma perfusão cerebral através de injeção no coração de salina em tampão fosfato 0,1 M (PBS, pH 7,4) por cinco minutos, seguido por solução de paraformaldeído 4% em PBS 0,1 M. Os cérebros foram removidos e fixados em paraformaldeído 4% por 4 – 6 h e então colocados em sacarose 20% em PBS 0,1 M por uma noite. No dia seguinte, os cérebros foram cortados em secções transversais de 50 μ m em um criostato. Os cortes foram lavados uma vez em PBS 0,1 M e com solução de peróxido de hidrogênio 1%, seguido por quatro lavagens consecutivas em PBS. Então os cortes foram incubados durante 22 horas com o anticorpo primário para a proteína c-fos (Santa Cruz Biotechnology, 1:4.000 em soro de cabra 4% e Triton X-100 0,02%) a temperatura ambiente em um agitador. Após esse períodos, os cortes foram lavados três vezes em PBS, e incubados em soro anti-coelho (1:400, Vector Laboratories) por uma hora sob agitação em temperatura ambiente, lavados três vezes em PBS e então processados

usando o kit ABC – Vectastain Elite, (Vector Laboratories) por uma hora a temperatura ambiente. Os cortes foram então lavados três vezes em PBS e tratados por 10 minutos com tetrahidrocloreto de diaminobenzidina (DAB – 0,2 mg/ml em PBS 0,1 M) acrescido com peróxido de hidrogênio a 0,012%. Os cortes foram montados em lâminas, secos e desidratados em álcool, e então cobertos com lamínulas e Permount.

As células com imunorreatividade positiva para a proteína Fos foram quantificadas usando um programa de análise de imagens *Image Pro Plus*. As regiões quantificadas foram padronizadas da seguinte maneira: todas as seções marcadas foram contadas para o OVLT, SFO, MnPO, PVN e SON. O MnPO foi dividido em dorsal e ventral e contado separadamente. A região selecionada foi medida pelo computador. Células marcadas positivamente foram contadas pelo computador e expressas como pontos por mm².

3.10 - Registro da pressão arterial e da frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM) e a frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiados. Sob a anestesia com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) combinada com xilazina (7 mg/kg de peso corporal), um tubo de polietileno (PE-10 conectado ao PE-50) foi inserido na aorta abdominal através da artéria femoral do rato um dia antes dos experimentos. A cânula foi conduzida subcutaneamente e exteriorizada pelo dorso do animal. Para o registro da pressão arterial pulsátil, PAM e FC, a cânula arterial foi conectada ao transdutor de pressão Stathan Gould (P23 Db) acoplado a um pré amplificador (modelo ETH-200 Bridge Bio Amplifier) que foi conectado ao sistema de aquisição de dados Powerlab (modelo Powerlab 16SP, ADInstruments) que fornecia os sinais para um computador. Após um registro basal de 15 min, moxonidina (0,5 nmol) ou veículo foram injetados no NPBL e o registro foi mantido por 30 min. A PAM e FC foram registradas em ratos submetidos ao tratamento com FURO + CAP sc e em ratos controles sem tratamento. Nos animais tratados

com FURO + CAP, moxonidina ou veículo foram injetados no NPBL 45 min após o tratamento com FURO + CAP.

3.11 – Teste de reação ao sabor

Para esse teste imediatamente antes ao implante de cânulas no NPBL, os ratos receberam o implante de uma cânula intra-oral. A cânula intra-oral (PE 50) foi inserida na cavidade oral do rato lateralmente ao primeiro molar maxilar, e ascendeu pela lateral do crânio e foi conduzida subcutaneamente e exteriorizada pelo dorso do animal (Figura 1A). Essa cânula não interfere com o comportamento alimentar normal do animal e permite infusão direta de soluções no interior da boca.

Previamente aos experimentos, os animais foram submetidos a um período de habituação por 3 dias, no qual eles foram expostos por 10 min à gaiola onde se realizou o teste da reação ao sabor e, a seguir, foi feita de infusão de 1 ml de água pela cânula intra-oral. Em cada teste os animais receberam sobrecargas intragástricas de salina hipertônica 2,0 M (2 ml/rato). Após 45 min da sobrecarga intragástrica, cada rato recebeu injeções de metisergida ou veículo no NPBL. Imediatamente após a injeção no NPBL, a cânula intra-oral foi conectada a um tubo de polietileno (PE 50), para a infusão da solução diretamente na cavidade oral do rato. O rato foi então colocado na gaiola teste (Figura 1B). Após 15 min de habituação, solução de NaCl 1,8% foi infundida na boca do rato a uma fração constante (0,5 ml/min) durante 3 min. O comportamento do rato foi gravado por meio de uma filmadora, com o auxílio de um espelho montado abaixo do fundo transparente da gaiola, que permitiu a câmera aproximar a imagem de tal forma que a face do rato ocupasse a tela inteira.

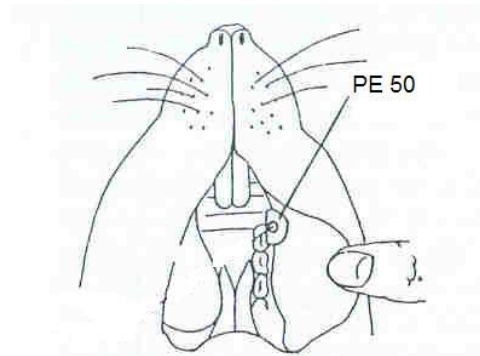
A)**B)**

Figura 1: **A)** Diagrama da cânula intra-oral *in situ* (Adaptado de Grill e Norgren, 1978). A terminação intra-oral da cânula é posicionada próximo ao primeiro molar e o tubo de polietileno é conduzido subcutaneamente e exteriorizado no dorso do animal. **B)** Fotografia da gaiola teste utilizada para a obtenção dos vídeos do teste de reação ao sabor ao estímulo infundido diretamente na cavidade oral do rato. A filmagem é feita por meio de um espelho localizado abaixo da gaiola de vidro transparente.

3.12 – Análise dos dados dos testes de reação ao sabor

O comportamento de cada rato foi avaliado pela ocorrência de comportamentos de reação ao sabor considerados “neutros”, hedônicos ou aversivos (vide Grill and Berridge, 1985 para uma discussão da análise dos comportamentos de reação ao sabor e classificação). Comportamentos **hedônicos** são: lambidas das patas, protrusões laterais da língua, protrusões rítmicas da língua ao longo da linha mediana com duração de cerca de 160 ms. Comportamentos **neutros** são: movimentos rítmicos da boca e escoamento passivo, ou seja, a saída passiva de líquidos da boca. Comportamentos **aversivos** são: gapes, grande abertura da mandíbula e retração dos lábios inferiores; chin rubbing, ato de trazer a boca em contato direto com o chão da gaiola e projetar o corpo para frente; limpeza da face, ato de passar as patas uma ou várias vezes sobre a face; forelimb flail, movimentos com os membros anteriores; movimentos da cabeça com frequência maior que 60 Hz, e finalmente rápida locomoção no interior da gaiola. As gravações foram analisadas em câmera lenta em 1/30 a 1/10 da velocidade normal.

3.13 – Análise histológica

Terminados os experimentos, os ratos receberam injeções de corante (azul de Evans, 2 mg/0,2 µl) no NPBL, foram profundamente anestesiados com tiopental sódico (80 mg/kg de peso corpóreo) e submetidos a uma perfusão cerebral através de injeção no coração de solução salina tamponada (50 ml) seguida de solução de formalina a 10% (50 ml). A seguir os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (50 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram corados com Giemsa e analisados para se localizar os pontos das injeções de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (1986).

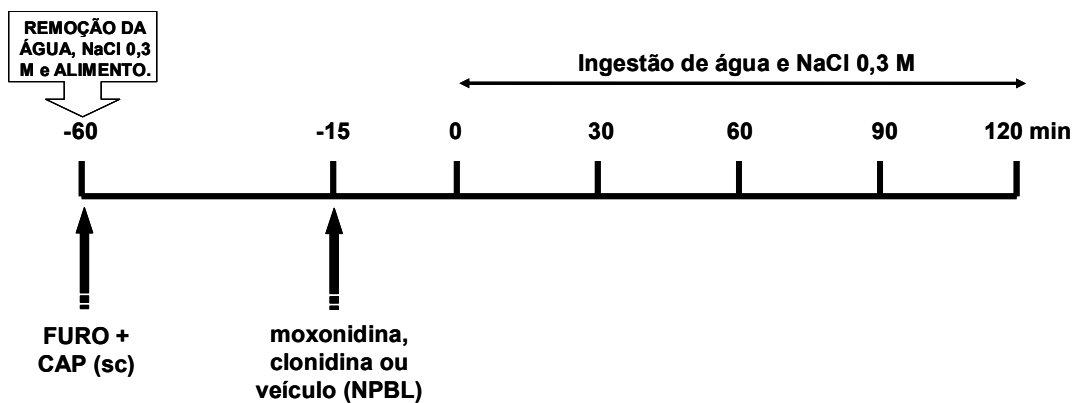
3.14 - Análise estatística

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média estão representados em gráficos. Análise de variância (um ou dois fatores) e o pós-teste de Newman Keuls e Fisher LSD foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$. O pós-teste de Fisher LSD foi utilizado apenas no teste de reação ao sabor, uma vez que o pós-teste de Newman Keuls não apontou a diferença estatística evidenciada pela ANOVA para esses resultados.

3.15 – Protocolos experimentais

3.15.1- Efeitos de injeções bilaterais de agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc.

Em ratos com cânulas bilaterais implantadas no NPBL, a ingestão de água e NaCl 1,8% foi induzida pelo tratamento combinado FURO + CAP sc, conforme descrito no item 5 dos métodos. Injeções bilaterais de moxonidina (0,1; 0,5; 1, 5, 10 ou 20 nmol/0,2 μ l) ou veículo, de clonidina (0,5; 1 ou 5 nmol/0,2 μ l) ou salina no NPBL foram feitas quinze minutos antes do oferecimento de NaCl 0,3 M e água aos animais. A medida da ingestão de água e sódio foi feita a cada trinta minutos durante duas horas, imediatamente após o oferecimento de água e NaCl 0,3 M.



Para o estudo de diferentes doses de cada agonista foram utilizados 3 diferentes grupos de animais. No primeiro foram testadas as doses de 5, 10 e 20 nmol, e no segundo grupo as doses de 0,1, 0,5 1,0 nmol de moxonidina. No terceiro grupo foram testadas as diferentes doses de clonidina. Cada grupo de animais foi submetido a quatro testes, em dias diferentes, com 48 h de intervalo entre eles. Em cada teste os animais foram divididos em 2 grupos e cada um recebeu um tratamento diferente no NPBL. A seqüência de tratamentos no NPBL

nos diferentes experimentos foi aleatória. No final dos testes, todos os animais receberam todos os tratamentos no NPBL: veículo ou salina, agonista (dose menor), agonista (dose intermediária) e agonista (dose maior) e cada rato recebeu apenas uma vez cada tratamento.

Para testar se as injeções de moxonidina no NPBL em animais saciados, não tratados com FURO + CAP poderia produzir algum efeito na ingestão de água e de NaCl 0,3 M, um grupo de ratos não tratados com FURO + CAP recebeu injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL e 15 minutos após tiveram acesso a água e NaCl 0,3 M. Esses ratos foram submetidos a dois testes. Também esse grupo foi dividido em dois e cada metade recebeu um tratamento diferente no NPBL em ordem aleatória.

Os efeitos de injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL sobre a ingestão de água induzida pelo tratamento com FURO + CAP quando apenas água estava disponível aos animais também foi investigada. Os tratamentos (FURO + CAP sc e moxonidina ou veículo no NPBL) foram semelhantes aos descritos anteriormente quando água e NaCl 0,3 M foram simultaneamente oferecidos, exceto pela ausência do NaCl 0,3 M neste último teste.

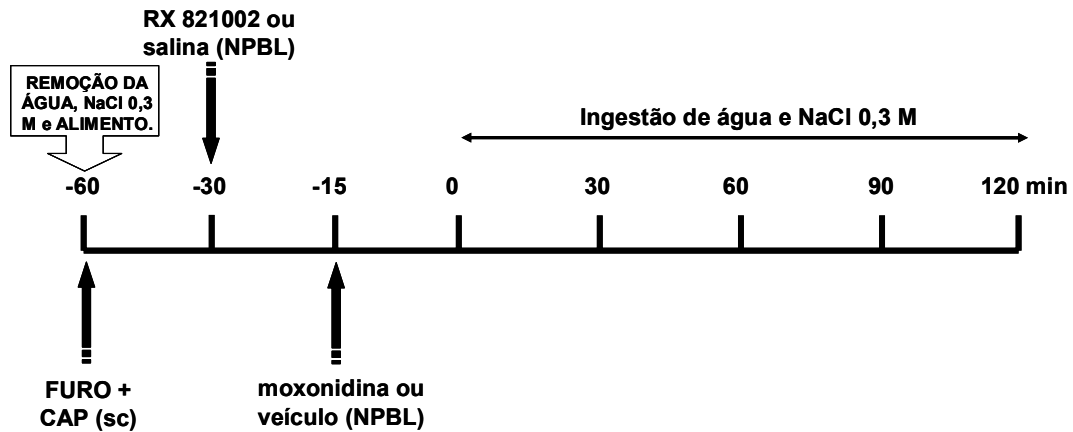
3.15.2 - Efeitos de injeções bilaterais de agonista adrenérgico α_2 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc.

Em ratos com cânulas bilaterais implantadas no NPBL, a ingestão de água e NaCl 1,8% foi induzida pelo tratamento combinado FURO + CAP sc, conforme descrito no item 5 dos métodos. Injeções bilaterais de α -metilnoradrenalina (40 ou 80 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL foram feitas quinze minutos antes do oferecimento de NaCl 0,3 M e água aos animais. A medida da ingestão de água e sódio foi feita a cada trinta minutos durante duas horas, imediatamente após o oferecimento de água e NaCl 0,3 M.

Os animais foram submetidos a três testes, em dias diferentes, com 48 h de intervalo entre eles. Em cada teste os animais foram divididos em 2 grupos e cada um recebeu um tratamento diferente no NPBL. A seqüência de tratamentos no NPBL nos diferentes experimentos foi aleatória. No final dos testes, todos os animais receberam todos os tratamentos no NPBL: veículo, α -metilnoradrenalina (40 nmol/0,2 μ l) ou α -metilnoradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) e cada rato recebeu apenas uma vez cada tratamento.

3.15.3 - Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista adrenérgico α_2 + agonista adrenérgico α_2 /imidazólico NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc.

Em ratos com cânulas bilaterais implantadas no NPBL a ingestão de água e NaCl 0,3 M foi induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc. Os ratos tratados com RX 821002 (5, 10 e 20 nmol/0,2 μ l) receberam injeções bilaterais desta substância ou salina no NPBL 15 minutos antes da moxonidina ou veículo no NPBL. Cada dose de RX 821002 foi testada em um grupo de animais que foi submetido a três combinações de tratamentos no NPBL: salina + veículo; salina + moxonidina (0,5 nmol) e RX 821002 + moxonidina (0,5 nmol) em três testes diferentes. Em cada teste, o grupo de animais foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu uma das três combinações de tratamentos indicadas acima. A seqüência dos tratamentos foi aleatória e no final dos três testes todos os animais receberam todas as combinações de tratamentos. Os efeitos de RX 821002 injetado sozinho no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc foram testados em outro grupo de ratos que receberam injeções de RX 821002 (20 nmol) ou salina no NPBL em um protocolo semelhante ao descrito anteriormente.



3.15.4 - Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista adrenérgico α_2 + agonista adrenérgico α_2 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc.

Os efeitos de injeções bilaterais de RX 821002 ou salina + α -metilnoradrenalina ou veículo no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc foram testados em um grupo de ratos. Esses animais receberam diferentes combinações de injeções de RX 821002 (160 nmol) ou salina + α -metilnoradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL em um protocolo semelhante ao descrito anteriormente.

3.15.5 - Testes de especificidade do NPBL como local de ação da moxonidina para a ingestão de NaCl 0,3 M e água.

A especificidade do NPBL como local de ação das injeções que produzem os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M foram confirmadas pelos resultados dos ratos os quais receberam moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo 1 mm dorsal ao NPBL. Esses ratos tinham cânulas bilaterais implantadas usando as mesmas coordenadas para as injeções no NPBL, mas as injeções foram feitas usando-se uma cânula injetora de 13 mm, ao invés da cânula de 14 mm regularmente utilizada.

Os efeitos da injeção unilateral de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc foram verificados nos mesmos animais do teste anterior. Embora esses animais tivessem cânulas implantadas bilateralmente no NPBL, neste experimento os animais receberam somente uma injeção unilateral de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no lado direito.

3.15.6 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

Após 24 horas de canulação da artéria femoral, os ratos não anestesiados foram ligados ao sistema de registro da PAM e FC. Após um registro basal, moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo foram injetados bilateralmente no NPBL e registrou-se a PAM e FC por mais 30 min. PAM e FC foram registradas em ratos submetidos ao tratamento FURO + CAP e em animais controles que não receberam nenhum tratamento prévio. Nos animais tratados com FURO + CAP, moxonidina foi injetada no NPBL 45 min após o tratamento com FURO + CAP sc.

3.15.7 - Estudo da expressão da proteína c-Fos em algumas áreas prosencefálicas após administração de moxonidina no NPBL em ratos tratados com FURO + CAP.

A expressão de c-Fos em áreas prosencefálicas (OVLT, OSF, MnPO, PVN e SON) foi estudada em ratos submetidos ao tratamento com FURO + CAP ou salina + salina (controle). Quarenta e cinco minutos após o tratamento com FURO + CAP ou tratamento controle, diferentes grupos de ratos receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. Duas horas após o tratamento com FURO + CAP, os ratos foram anestesiados e sacrificados, para retirar os cérebros e realizar os procedimentos de imuno-

histoquímica, como descrito no item 8 dos métodos. Esse intervalo de tempo entre as administrações de drogas e o sacrifício dos animais é equivalente ao tempo médio dos testes de ingestão de água e sódio induzida por FURO + CAP (60 min) quando a maior parte da ingestão de água e NaCl já ocorreu.

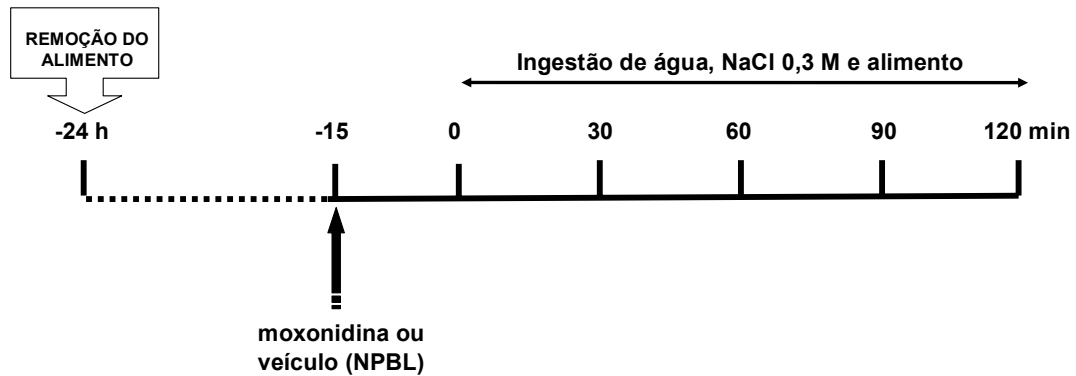
3.15.8 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de sacarose 0,06 M.

Para testar a especificidade das injeções de moxonidina no NPBL para aumentar a ingestão de NaCl em comparação com outros tipos de comportamento de ingestão, um grupo de animais que receberam a ração e água *ad libitum* tiveram acesso a solução de sacarose 0,06 M por duas horas diariamente durante uma semana (“teste de sobremesa”). Após esse período, moxonidina (0,5 nmol) ou veículo foi injetado bilateralmente no NPBL 15 minutos antes dos animais terem acesso à solução de sacarose 0,06 M. A ingestão cumulativa de água e de sacarose 0,06 M foram medidas a cada 30 minutos por duas horas.

3.15.9 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de alimento induzida por privação de alimento e ingestão de água e NaCl 0,3 M associada a ingestão de alimento.

Esse estudo foi realizado com o objetivo de verificar se a moxonidina injetada no NPBL poderia modificar a ingestão de alimento induzida por privação alimentar. Para tanto, um grupo de animais foi submetido a 14 de privação de alimento, com água e NaCl 0,3 M disponíveis. Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL foram feitas quinze minutos antes do acesso dos animais à ração. A ingestão de alimento, água e NaCl 0,3 M foram medidas a cada 30 minutos durante 2 horas após o acesso dos animais à

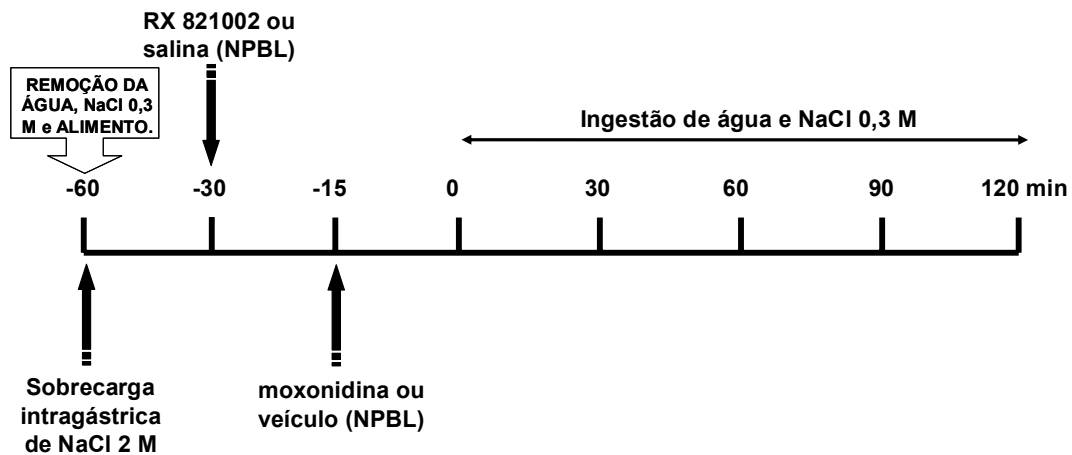
ração. Em outro grupo de animais foi realizado o mesmo protocolo, agora com 24 horas de privação de alimento.



Esse grupo de animais também foi submetido a mais dois experimentos semelhantes ao anteriormente descrito, onde foram privados de alimento por 24 h, mas durante o teste tiveram acesso apenas a água e NaCl 0,3 M e não ao alimento.

3.15.10 – Efeitos de injeções bilaterais de RX 821002 + moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M.

No dia do experimento a água, NaCl 0,3 M e ração foram removidos das gaiolas e os animais foram submetidos a uma sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M. Quarenta e cinco minutos após a sobrecarga, os animais receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol) ou veículo no NPBL. Metade dos animais recebeu moxonidina e a outra metade recebeu veículo no NPBL. Esse procedimento foi invertido no experimento seguinte. Quinze minutos após a moxonidina ou veículo, os animais tiveram acesso as buretas de água e de NaCl 0,3 M.

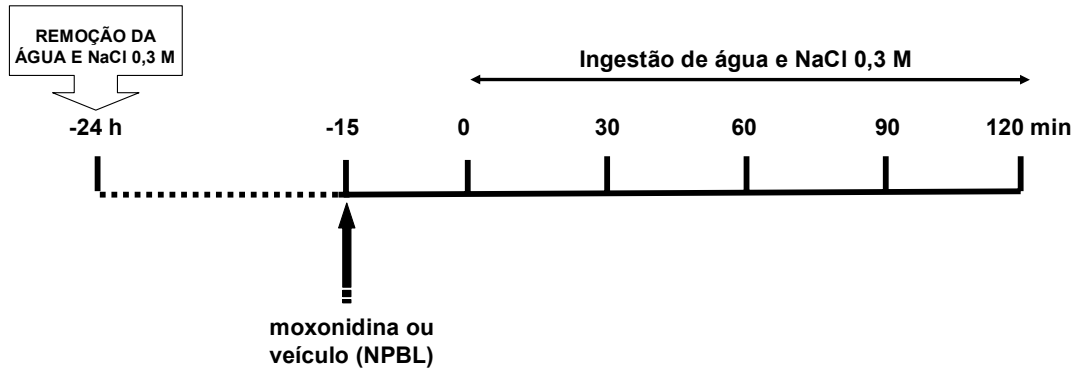


Os ratos tratados com RX 821002 (10 e 20 nmol/0,2 μ l) receberam injeções bilaterais desta droga ou salina no NPBL 15 minutos antes da moxonidina ou veículo no NPBL. Cada dose de RX 821002 foi estudada em um grupo de ratos que foi submetido a um dos seguintes tratamentos: salina + veículo; salina + moxonidina (0,5 nmol); RX 821002 + moxonidina (0,5 nmol) e RX 821002 + veículo em quatro testes diferentes. Em cada teste, o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu uma das quatro combinações dos tratamentos indicados acima. A seqüência dos tratamentos nos diferentes testes foi aleatória e no final dos experimentos todos os ratos receberam todas as combinações dos tratamentos.

3.15.11 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por 24 h de privação hídrica.

Os animais foram submetidos a 24 h de privação hídrica (buretas de água e de NaCl 0,3 M removidas por 24 h), com alimento disponível. Após esse período, metade dos animais recebeu moxonidina e a outra metade recebeu veículo no NPBL. Esse procedimento foi invertido no experimento seguinte. Quinze minutos após a moxonidina ou veículo, os animais tiveram acesso as buretas de água e de NaCl 0,3 M. A ingestão de água e de NaCl 0,3 M foi

medida a cada 30 min, durante duas horas. Durante o experimento os ratos não tiveram acesso à ração.



3.15.12 – Interação entre o mecanismos serotoninérgico e adrenérgico α_2 no NPBL no controle da ingestão água e NaCl.

Para testar uma possível interação entre os mecanismos serotoninérgico e adrenérgico α_2 no NPBL no controle da ingestão água e NaCl, ratos com cânulas bilaterais implantadas no NPBL foram tratados com FURO + CAP sc. Em um grupo de animais, as injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL foram feitas quinze minutos antes das injeções bilaterais de DOI (5 μ g/0,2 μ l) ou salina no NPBL, realizadas quinze minutos antes do oferecimento da água e sódio aos animais. Em outro grupo, as injeções bilaterais de RX 821002 (20 nmol/0,2 μ l) ou salina no NPBL foram feitas quinze minutos antes das injeções bilaterais de metisergida (4 μ g/0,2 μ l) ou veículo no NPBL, realizadas quinze minutos antes do oferecimento da água e sódio aos animais.

Em cada teste, os grupos de ratos foram divididos em dois e cada metade do grupo recebeu uma das quatro combinações dos tratamentos indicados acima. A seqüência dos tratamentos nos diferentes testes foi aleatória e no final dos experimentos todos os ratos receberam todas as combinações dos tratamentos. A medida da ingestão de água e sódio foi feita de acordo com o item 5 dos métodos.

3.15.13 – Interação entre o mecanismos GABAérgico e adrenérgico α_2 no NPBL no controle da ingestão água e NaCl.

O objetivo desse protocolo foi verificar se o bloqueio de receptores GABA_A com bicuculina ou bloqueio de receptores GABA_B com saclofen reverteria o aumento da ingestão de água e sódio promovido pela moxonidina. Em outras palavras, verificar se a ativação de receptores adrenérgicos α_2 poderia promover uma ativação gabaérgica, que por sua vez inibiria o mecanismo inibitório presente no NPBL, culminando com o aumento da ingestão de sódio.

Injeções bilaterais de bicuculina (5 nmol/0,2 μ l) ou do veículo no NPBL foram feitas quinze minutos antes da injeção de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Em outro grupo de animais, injeções bilaterais de saclofen (5 nmol/0,2 μ l) ou do veículo no NPBL foram feitas trinta minutos antes da injeção de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. As injeções de moxonidina no NPBL foram feitas 15 min antes do oferecimento de NaCl 1,8% e água aos animais. A medida da ingestão de água e sódio foi feita de acordo com o item 5 dos métodos.

3.15.14 – Interação entre o mecanismos opioidérgico e adrenérgico α_2 no NPBL no controle da ingestão água e NaCl.

Injeções do agonista opióide β -endorfina no NPBL induzem ingestão de NaCl 1,8% em ratos saciados e o pré-tratamento com o antagonista opióide naloxona aboliu esse efeito, (Oliveira et al., 2005). Para investigar a possível interação entre os mecanismos adrenérgico α_2 e opioidérgico do NPBL no controle da ingestão de água e de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP, injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ L) ou veículo no NPBL foram feitas quinze minutos antes do oferecimento de água aos animais. Injeções bilaterais de

naloxona (40 ng/0,2 µl) ou veículo no NPBL foram feitas quinze minutos antes das injeções de moxonidina. A medida da ingestão de água e sódio foi feita de acordo com o item 5 dos métodos.

3.15.15 – Efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos e do bloqueio serotoninérgico no NPBL sobre o teste de reação ao sabor

Os ratos com implante de cânula intra-oral foram submetidos a uma sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M. Quarenta e cinco minutos após, os animais receberam injeções de moxonidina (0,5 nmol) , metisergida (4 µg) ou veículo no NPBL e foram transferidos para a gaiola teste. Após 15 minutos iniciou-se o registro das reações afetivas a infusão intra-oral de NaCl 0,3 M. Em cada teste os animais foram divididos em dois, e cada metade recebeu injeções da moxonidina, metisergida ou veículo. Nos testes seguintes os mesmos tratamentos foram invertidos, de modo que todos os animais receberam os três tratamentos.

4 – RESULTADOS

4.1- Localização histológica das cânulas no NPBL

A Figura 2 mostra injeções bilaterais típicas no NPBL. Os pontos de injeção foram localizados principalmente nas porções centro lateral e dorso lateral do NPBL [vide Fulwiler e Saper para definições dos sub núcleos do NPBL (FULWILER & SAPER, 1984)]. Os pontos de injeção do presente estudo são similares àqueles em que estudos anteriores mostraram os efeitos de metisergida, proglumide ou DOI sobre a ingestão de água e sódio (MENANI & JOHNSON, 1995; MENANI et al., 1996; MENANI et al., 1998a; MENANI et al., 1998b; DE GOBBI et al., 2000; MENANI J V et al., 2000). Injeções que atingiram as porções ventro lateral e lateral externa, assim como o núcleo Kölliker-Fuse, foram observadas apenas em alguns ratos e os resultados desses animais foram incluídos na análise.

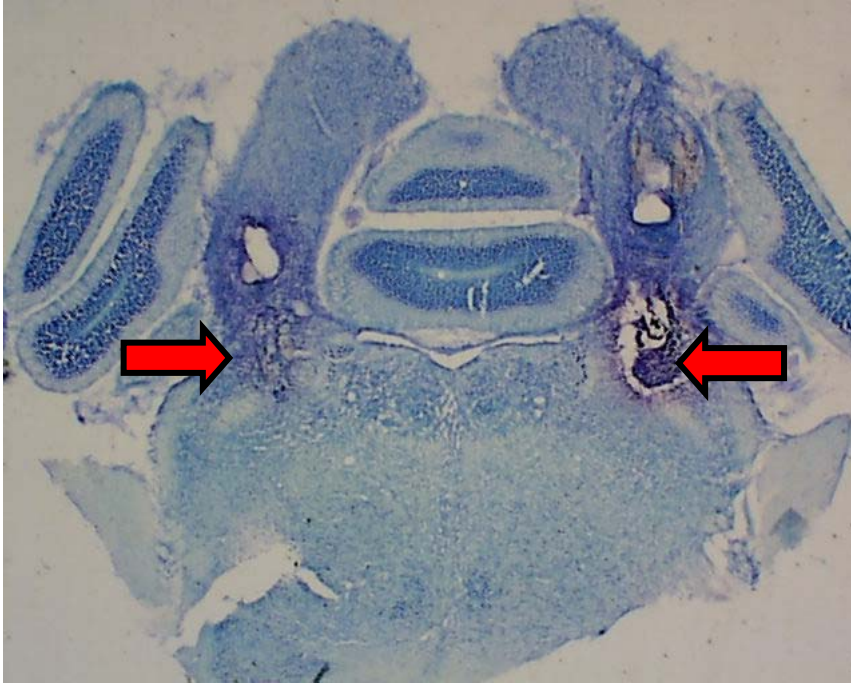


Figura 2: Fotomicrografia de um corte transversal de um cérebro de rato mostrando do local das injeções, indicado pelas setas, no núcleo parabraquial lateral (NPBL).

4.2- Efeitos de injeções bilaterais de agonistas adrenérgicos α_2 /imidazólicos no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc.

Moxonidina, injetada bilateralmente no NPBL nas doses de 5, 10 e 20 nmol, produziu potente e surpreendente aumento na ingestão de NaCl 0,3 M induzido por FURO + CAP sc em comparação a injeção do veículo no NPBL [$F(3,27) = 14,9$; $P < 0,001$], (Figura 3). Em relação à ingestão de água, não foram verificados efeitos tão marcantes, sendo que somente as injeções de moxonidina nas doses de 5 e 20 nmol promoveram um aumento na ingestão de água aos 120 min de experimento. ANOVA mostrou uma interação significativa entre tratamentos e tempos [$F(12,108) = 3,72$; $P < 0,01$], (Figura 3).

Foram testadas também doses menores de moxonidina (0,1; 0,5 e 1 nmol), a fim de encontrar uma dose intermediária entre o máximo e o mínimo efeito. Surpreendentemente, o aumento na ingestão de NaCl 0,3 M foi significativo até com a menor dose de moxonidina, [$F(3,24) = 34,9$; $P < 0,001$], (Figura 4). Considerando as doses mais baixas, apenas a dose de 1,0 nmol de moxonidina promoveu um aumento na ingestão de água aos 120 min de experimento. ANOVA mostrou uma interação significativa entre tratamentos e tempos para ingestão de água com as doses mais baixas de moxonidina [$F(12,96) = 3,45$; $P < 0,01$], (Figura 4).

As injeções bilaterais de clonidina no NPBL, nas doses de 0,5; 1,0 e 5,0 nmol, também promoveram um aumento na ingestão de NaCl 0,3 M, [$F(3,12) = 5,26$; $P < 0,05$], (Figura 5), porém de menor intensidade do que o aumento produzido pelas mesmas doses de moxonidina. Com relação à ingestão de água também ocorreu aumento após injeções de clonidina no NPBL. ANOVA mostrou uma interação significativa entre tratamentos e tempos, [$F(12,84) = 5,38$; $P < 0,001$], na ingestão de água, (Figura 5).

Quando apenas a água estava disponível durante o teste, injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol) no NPBL não modificaram a ingestão de água induzida pelo

tratamento com FURO + CAP sc ($14,1 \pm 1,1$ ml/2 h, vs. veículo: $15,1 \pm 1,3$ ml/2 h, $n = 13$), $[F(1,7) = 4,2; P > 0,05]$.

Em animais saciados, sem o prévio tratamento com FURO + CAP, injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol) no NPBL não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M ($2,6 \pm 1,9$ ml/2 h vs. veículo: $1,2 \pm 0,7$ ml/2 h, $n = 10$), $[F(1,9) = 0,61; P > 0,05]$ ou a ingestão de água ($2,1 \pm 1,2$ ml/2 h vs. veículo: $1,2 \pm 0,5$ ml/2 h), $[F(1,9) = 0,42; P > 0,05]$.

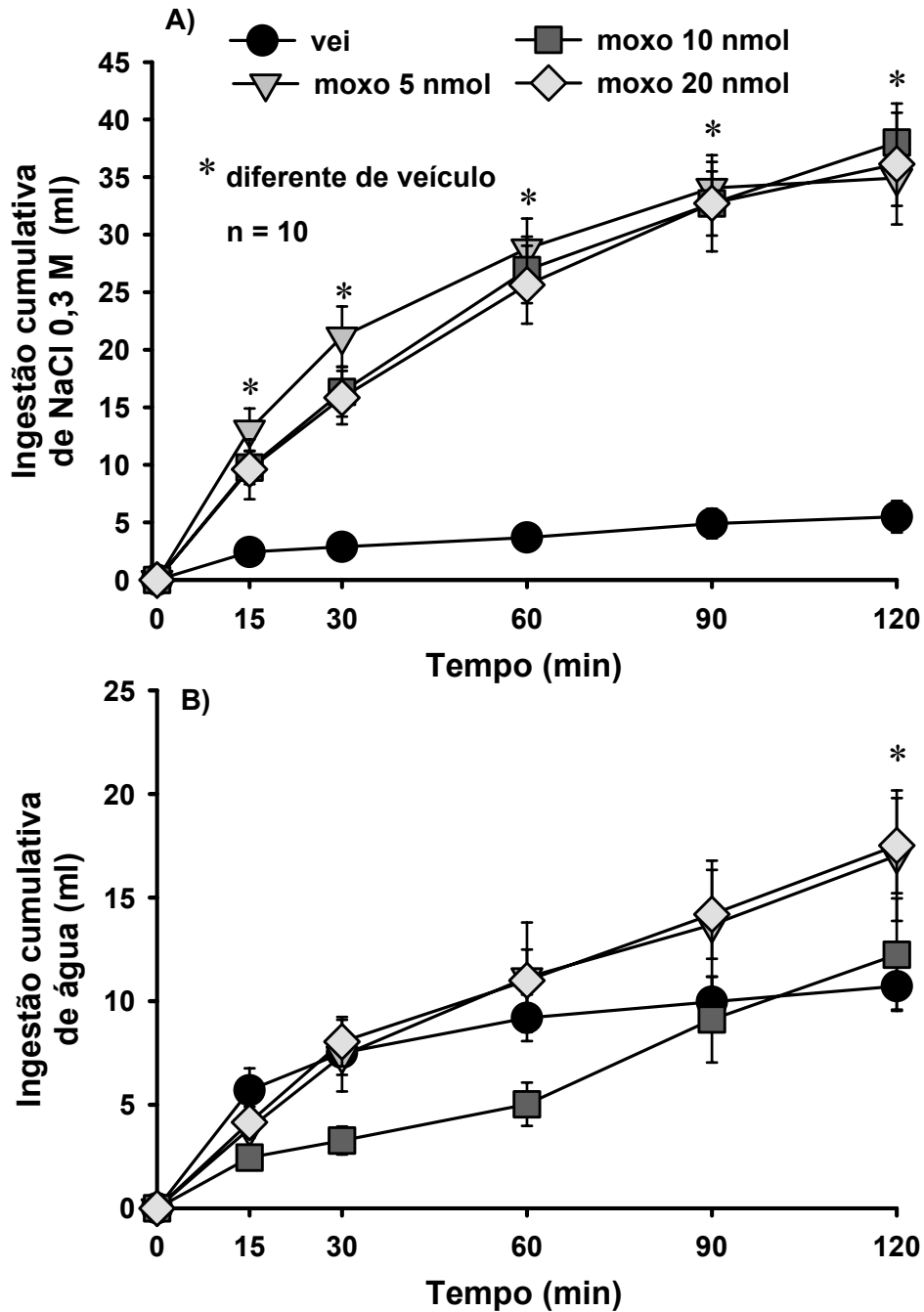


Figura 3: **A)** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; **B)** Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais moxonidina (moxo, 5, 10 e 20 nmol/0,2 μ l) ou veículo (veí) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

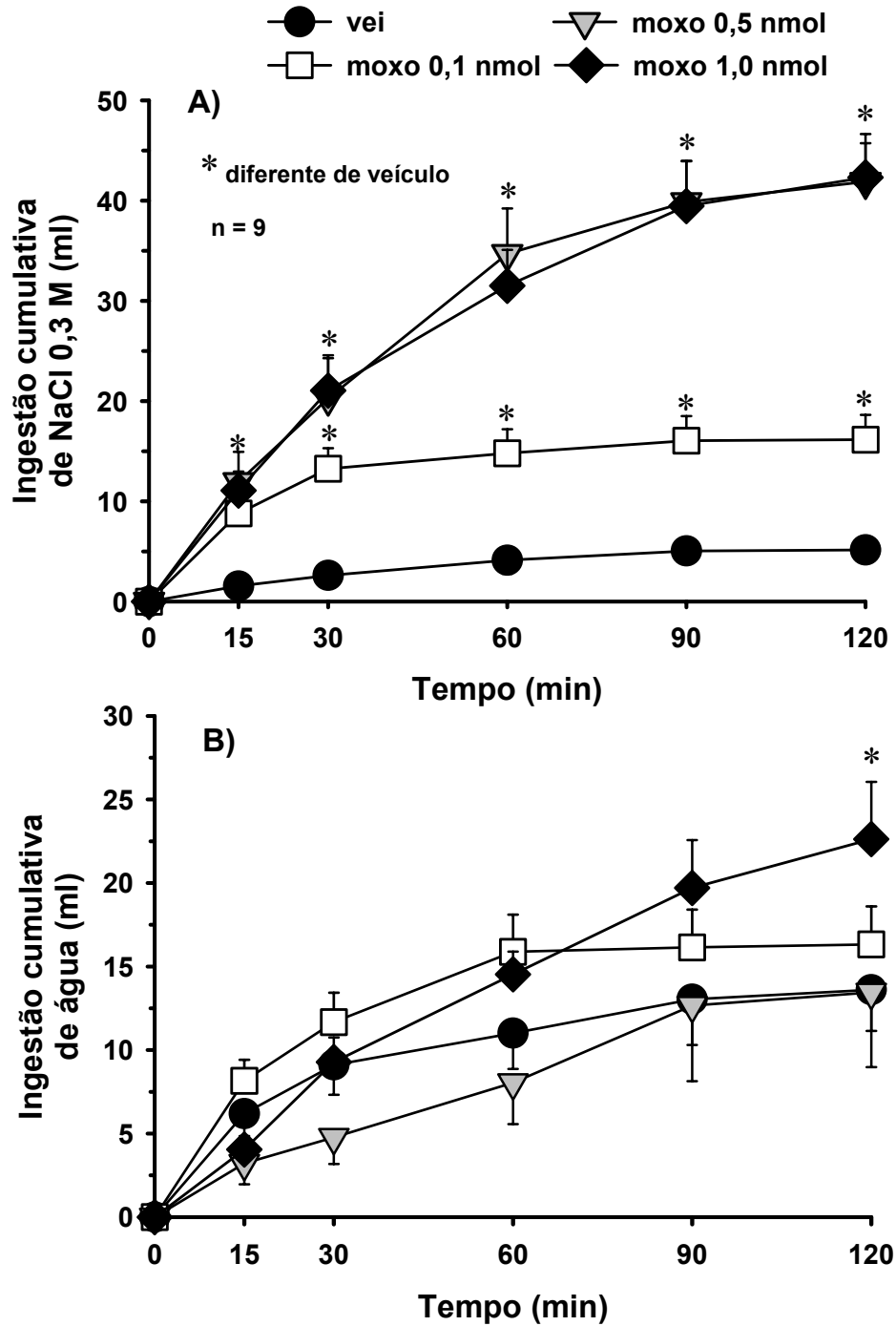


Figura 4: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; B) Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais moxonidina (moxo, 0,1; 0,5 e 1,0 nmol/0,2 μ l) ou veículo (vei) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

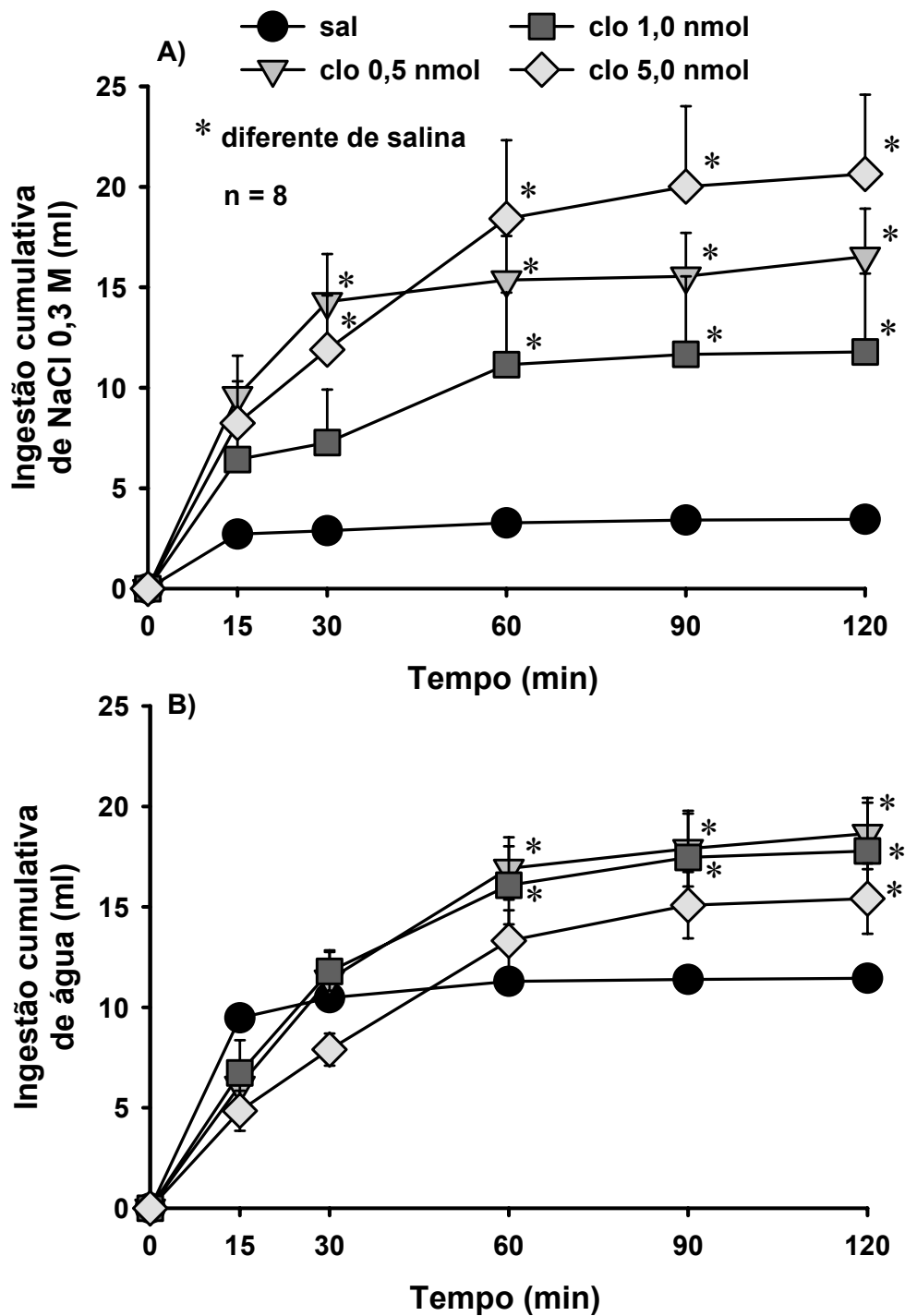


Figura 5: **A)** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; **B)** Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais clonidina (clo, 0,5; 1 e 5 nmol/0,2 μ l) ou salina (sal) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.3- Efeitos de injeções bilaterais de agonista adrenérgico α_2 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc.

Injeções bilaterais de α -metilnoradrenalina (40 e 80 nmol/0,2 μ l) também aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP, [F(2,16) = 5,2; $P < 0,05$], (Figura 6), enquanto a ingestão de água foi aumentada apenas com a dose de 40 nmol de α -metilnoradrenalina, [F(2,16) = 4,2; $P < 0,05$], (Figura 6).

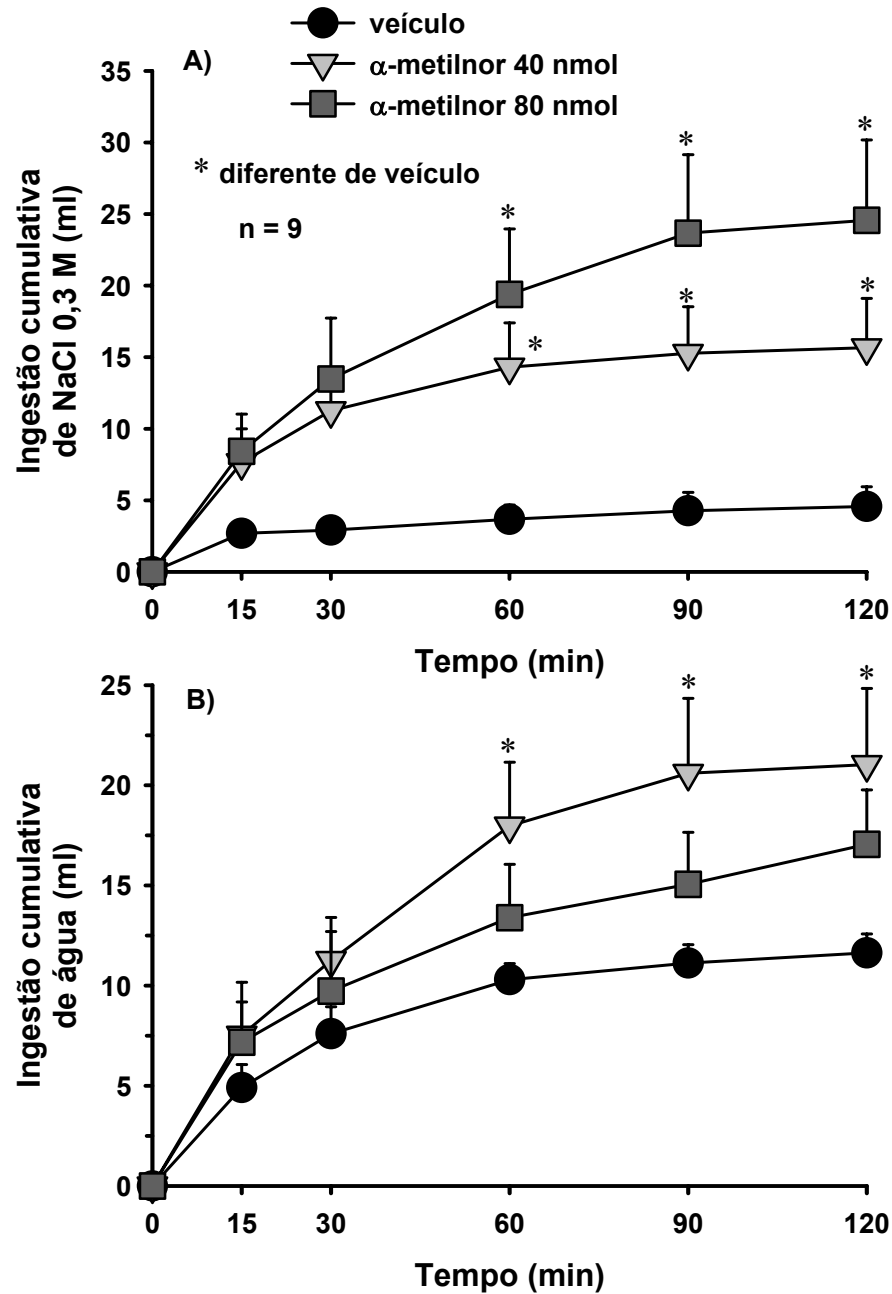


Figura 6: **A)** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; **B)** Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais α -metilnoradrenalina (α -metilnor, 40 e 80 nmol/0,2 μ l) ou veículo (vei) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.4 - Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista adrenérgico α_2 + agonista adrenérgico α_2 /imidazólico no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc.

Injeções prévias de RX 821002 no NPBL nas doses de 10 nmol/0,2 μ l [F(2, 28) = 17,2; $P < 0,001$] e 20 nmol/0,2 μ l [F(2, 12) = 6,9; $P < 0,05$] aboliram os efeitos da moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP, (Figura 7). RX 821002 na dose de 5 nmol/0,2 μ l não alterou os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de sódio, (Figura 7).

Considerando os diferentes grupos de ratos que receberam RX 821002, o tratamento apenas com moxonidina (5 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentou a ingestão de água induzida por FURO + CAP apenas no grupo que recebeu RX 821002 na dose de 5 nmol (Figura 8). Nesse grupo, ANOVA mostrou uma interação significativa entre tratamentos e tempos para a ingestão de água [F(8,80) = 9,7; $P < 0,05$], e o pré-tratamento com RX 821002 (5 nmol/0,2 μ l) no NPBL aboliu o efeito da moxonidina sobre a ingestão de água (Figura 8A). Nos outros dois grupos de ratos nenhuma diferença significativa na ingestão de água foi observada (Figuras 8B e 8C).

Apenas as injeções bilaterais de RX 821002 (20 nmol) não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M ($5,7 \pm 1,4$ ml/2 h vs. veículo: $5,3 \pm 1,5$ ml/2 h, $n = 10$), [F(1,9) = 0,03; $P > 0,05$] nem a de água induzida pelo tratamento FURO + CAP sc, ($16,3 \pm 1,1$ ml/2 h vs. veículo: $16,0 \pm 1,2$ ml/2 h), [F(1,9) = 0,07; $P > 0,05$].

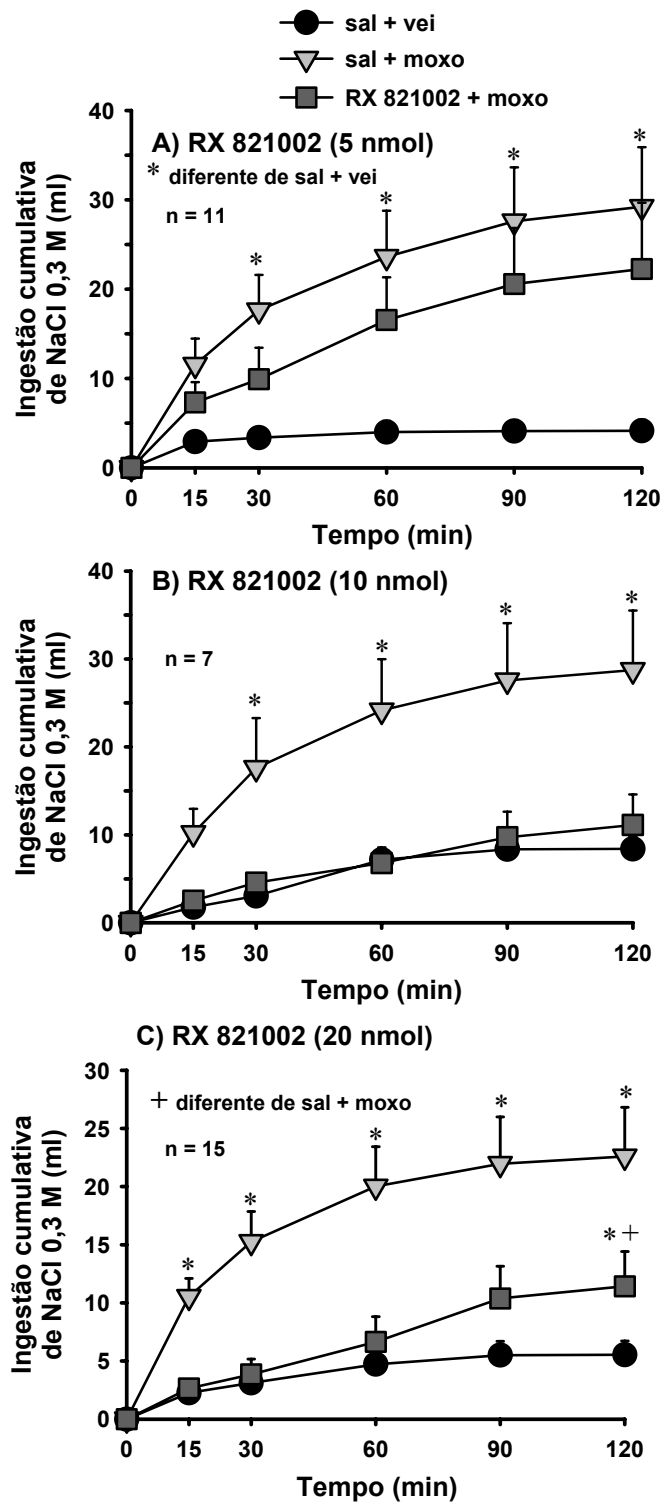


Figura 7: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP em ratos que receberam injeções bilaterais de RX 821002 nas doses de *A*: 05 nmol/0,2 μ l; *B*: 10 nmol/0,2 μ l; *C*: 20 nmol/0,2 μ l ou salina (sal) combinado com moxonidina (moxo; 0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo (veh) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

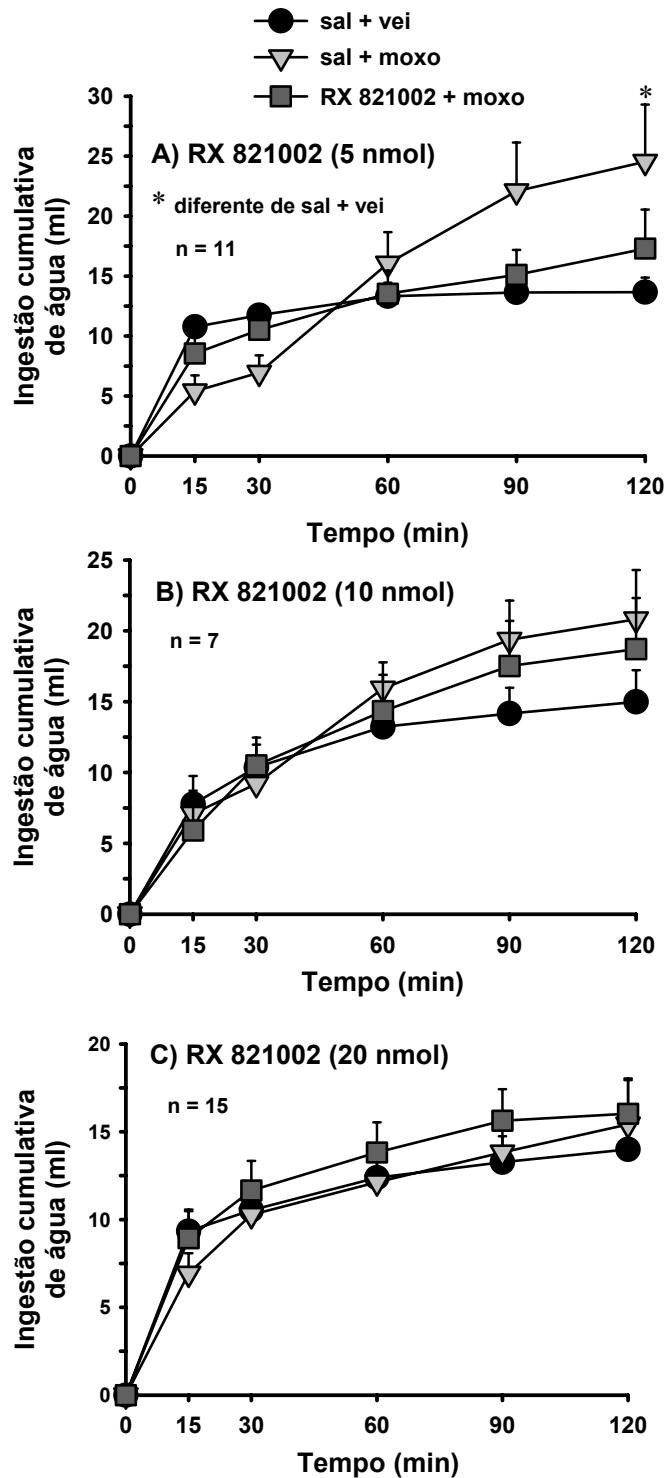


Figura 8: Ingestão cumulativa de água induzida por FURO + CAP em ratos que receberam injeções bilaterais de RX 821002 nas doses de *A*: 05 nmol/0,2 μ l; *B*: 10 nmol/0,2 μ l; *C*: 20 nmol/0,2 μ l ou salina (sal) combinado com moxonidina (moxo; 0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo (veh) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.5 - Efeitos da combinação de injeções bilaterais de antagonista adrenérgico α_2 + agonista adrenérgico α_2 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc.

Injeções prévias de RX 821002 (160 nmol/0,2 μ l) reduziram os efeitos da α -metilnoradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, [F(2,16) = 6,7; $P < 0,05$], e sobre a ingestão de água, [F(2,16) = 9,4; $P < 0,05$], nos primeiros 60 minutos do experimento (Figura 9).

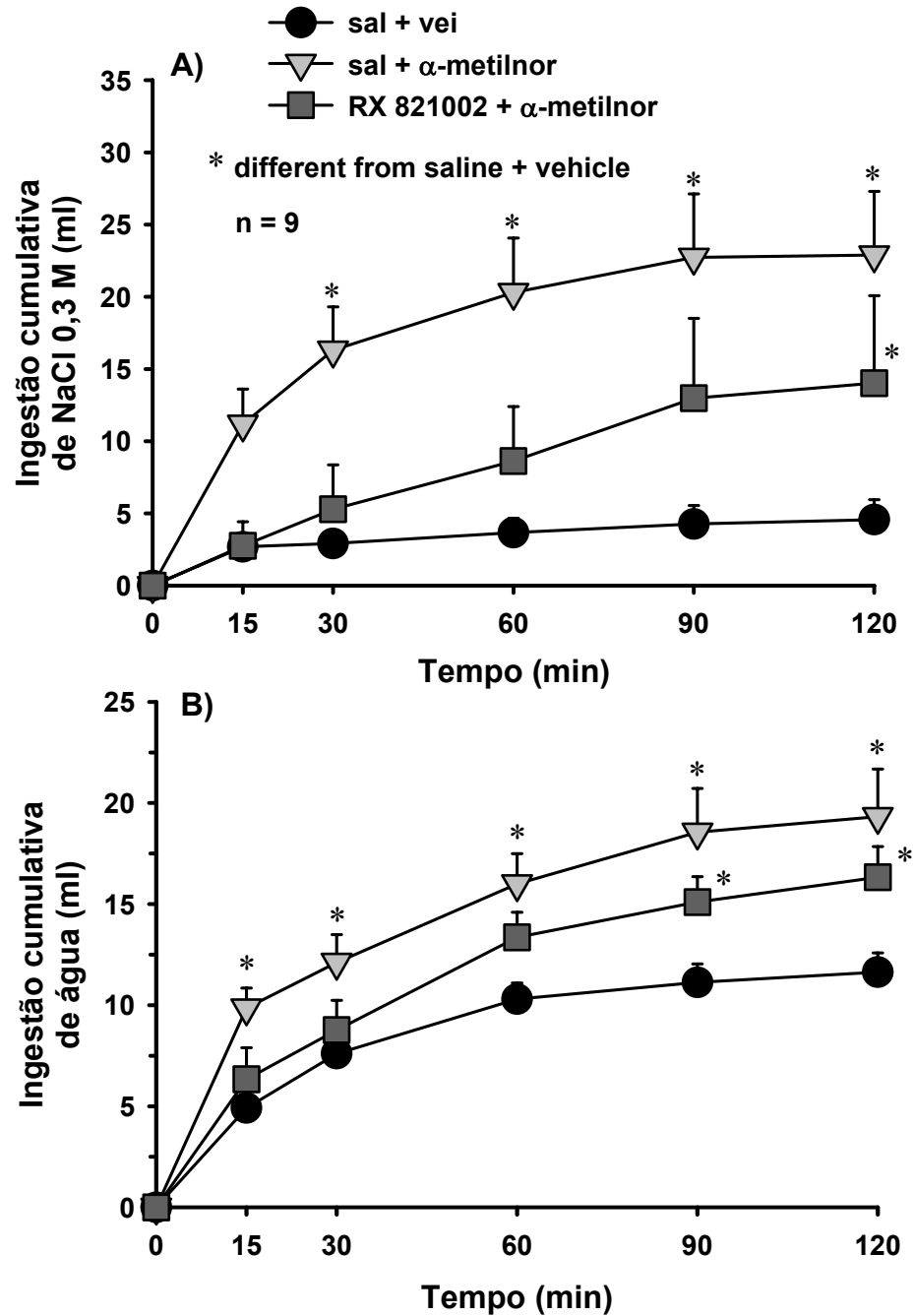


Figura 9: **A)** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; **B)** Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais RX 821002 (160 nmol/0,2 μ l) ou salina (sal) + α -metilnoradrenalina (α -metilnor, 80 nmol/0,2 μ l) ou veículo (vei) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.6 - Testes de especificidade do NPBL como local de ação da moxonidina para a ingestão de NaCl 0,3 M e água.

A especificidade do NPBL como local de ação das injeções de moxonidina que produzem os efeitos sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M foram confirmadas pelos resultados dos ratos nos quais a moxonidina foi injetada bilateralmente 1 mm dorsal ao NPBL ou dos ratos nos quais ambas as injeções não atingiram o NPBL (injeções fora do NPBL).

Injeções fora do NPBL atingiram diferentes regiões dorsais, ventrais, caudais ou mediais ao NPBL, incluindo locais como o cerebelo, locus coeruleus, núcleo vestibular superior, núcleo trigemial mesencefálico e a região ventral ao pedúnculo cerebelar superior (núcleo parabraquial medial e núcleo trigeminal motor). O espalhamento da injeção no 4º ventrículo ocorreu em alguns ratos que receberam injeções dorso mediais ao NPBL. Injeções parciais no NPBL também ocorreram em alguns ratos do grupo considerado como de injeções fora do NPBL. Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) 1 mm dorsal ao NPBL não modificou a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP, $F(1,10) = 3,63$; $P > 0,05$] nem a ingestão de água, $[F(1,10) = 0,19$; $P > 0,05]$, (Tabela 1). A ingestão de NaCl 0,3 M $[F(1,8) = 0,6$; $P > 0,05]$ e de água $[F(1,8) = 1,3$; $P > 0,05]$ induzida por FURO + CAP não foi modificada pelas injeções de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) que atingiram regiões fora do NPBL, (Tabela 1).

Injeções unilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL promoveram um pequeno aumento da ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por FURO + CAP, quando comparado com as injeções bilaterais (Tabela 1). ANOVA mostrou uma interação significativa entre tratamentos e tempos para a ingestão de NaCl 0,3 M $[F(4,28) = 3,73$; $P < 0,05]$ e ingestão de água, $[F(4,28) = 4,13$; $P < 0,05]$, (Tabela 1).

Tabela 1: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e água induzida por FURO + CAP em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) 1 mm acima do NPBL, injeções bilaterais fora do NPBL ou injeções unilaterais de moxonidina no NPBL.

Tratamento no NPBL	<i>n</i>	30 min	60 min	90 min	120 min
<i>Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)</i>					
veí (1 mm dorsal)	11	1,5 ± 0,4	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5	2,5 ± 0,5
moxo (1 mm dorsal)	11	4,5 ± 1,5	4,7 ± 1,5	5,4 ± 1,6	5,4 ± 1,6
veí (negativo)	9	6,6 ± 3,4	7,8 ± 3,5	8,4 ± 3,6	8,6 ± 3,6
moxo (negativo)	9	7,9 ± 2,5	11,7 ± 3,6	12,7 ± 3,7	13,4 ± 3,6
veí (unilateral)	8	3,5 ± 1,0	4,0 ± 1,2	4,2 ± 1,3	4,2 ± 1,3
moxo (unilateral)	8	6,6 ± 1,8	8,9 ± 1,9	10,6 ± 2,5*	10,8 ± 2,5*
<i>Ingestão de água (ml)</i>					
veí (1 mm dorsal)	11	12,6 ± 0,9	13,2 ± 1,0	13,5 ± 1,0	13,8 ± 1,0
moxo (1 mm dorsal)	11	13,1 ± 1,0	14,6 ± 1,0	14,8 ± 1,0	15,0 ± 1,0
veí (negativo)	9	7,6 ± 1,3	12,1 ± 1,6	14,1 ± 3,5	14,5 ± 3,5
moxo (negativo)	9	12,2 ± 2,5	14,9 ± 1,9	16,4 ± 2,2	16,9 ± 2,4
veí (unilateral)	8	9,9 ± 1,2	11,9 ± 1,6	12,1 ± 1,6	12,6 ± 1,7
moxo (unilateral)	8	10,2 ± 0,8	13,6 ± 1,2	15,5 ± 1,5	15,9 ± 1,7*

Valores expressos como média ± EPM; n = número de animais
veí, veículo; moxo, moxonidina; negativo, injeção fora do NPBL

* diferente de veí (unilateral)

4.7 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

Em ratos não anestesiados, as injeções bilaterais de moxonidina no NPBL não modificaram variação de PAM (4 ± 1 , vs. veículo: 2 ± 1 mmHg), [F(1,9) = 1,91; $P > 0,05$], nem a FC (-1 ± 5 , vs. veículo: 9 ± 5 bpm), [F(1,9) = 1,73; $P > 0,05$]. Os valores basais da PAM e da FC foram 120 ± 2 mmHg e 370 ± 10 bpm, respectivamente.

Moxonidina no NPBL de ratos tratados com FURO + CAP também não modificou a PAM (2 ± 2 vs. veículo: 1 ± 2 mmHg), [F(1,6) = 0,44; $P > 0,05$], nem FC (5 ± 9 , vs. veículo: 11 ± 9 bpm), [F(1,6) = 0,46; $P > 0,05$]. Os valores basais de PAM e FC desses animais foram 128 ± 5 mmHg e 412 ± 14 bpm, respectivamente, antes do tratamento FURO + CAP e 122 ± 4 mmHg e 410 ± 15 bpm, respectivamente, após o referido tratamento.

4.8 - Estudo da expressão da proteína c-Fos em algumas áreas prosencefálicas após administração de moxonidina no NPBL em ratos tratados com FURO + CAP.

O tratamento com FURO + CAP aumentou a expressão de c-Fos no órgão subfornical (SFO), [F(3,16) = 37,3; $P < 0,05$], núcleo pré-óptico mediano dorsal (dMnPO), [F(3,16) = 11,1; $P < 0,05$], núcleo paraventriclar (PVN), [F(3,16) = 4,4; $P < 0,05$] e núcleo supra-óptico (SON), [F(3,16) = 8,4; $P < 0,05$], (Figura 10). O pré tratamento com moxonidina ($0,5$ nmol/ $0,2$ μ l) injetada bilateralmente no NPBL não modificou a expressão de c-Fos induzida por FURO + CAP no SFO, dMnPO, PVN e SON, (Figura 10). Injeções bilaterais de moxonidina no NPBL de ratos não tratados com FURO + CAP também não induziram a expressão de c-Fos no SFO, dMnPO, PVN e SON, (Figura 10). O tratamento com FURO + CAP combinado ou não com moxonidina no NPBL não produziu variação alguma na expressão de Fos no OVLT, [F(3,15) = 1,58; $P > 0,05$] e vMnPO, [F(3,16) = 1,1; $P > 0,05$], (Figura 10).

Fotomicrografias representativas da imunorreatividade da proteína c-Fos nas áreas estudadas estão mostradas nas figuras 11 a 16.

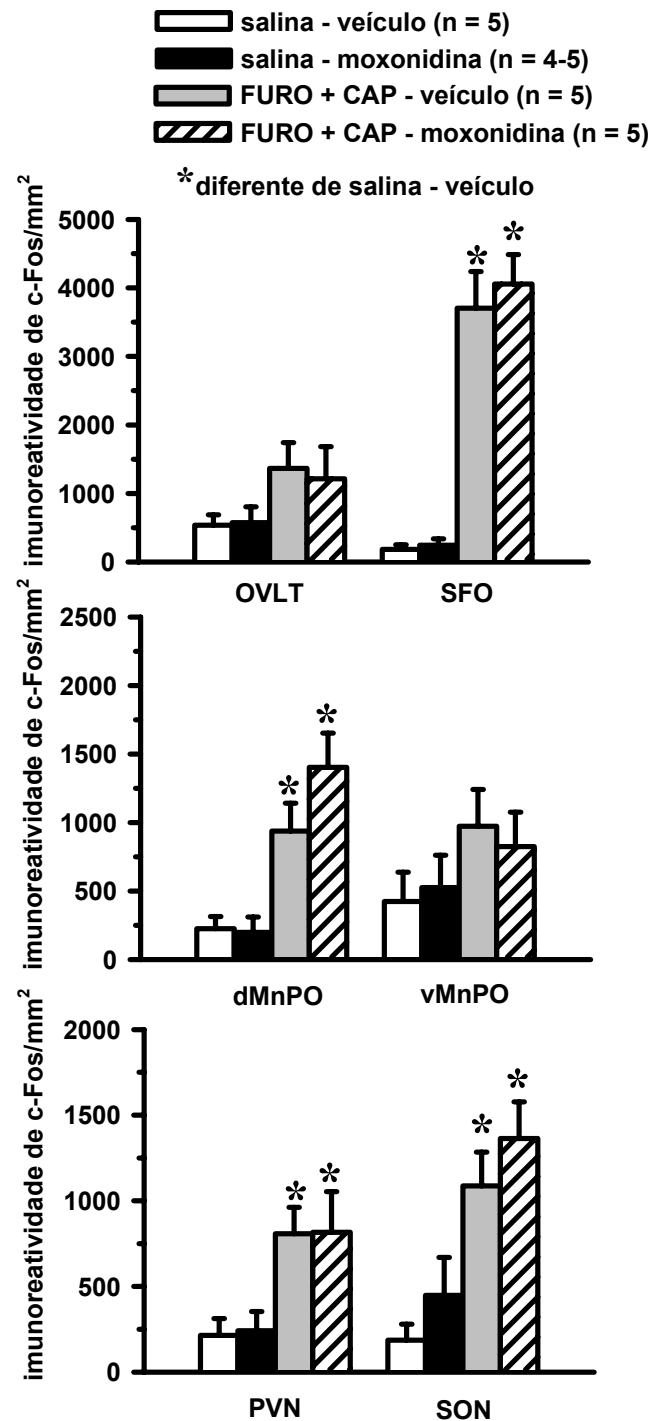


Figura 10: Imunorreatividade da proteína c-Fos em áreas prosencefálicas de ratos tratados com FURO + CAP ou salina sc que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. (n = número de animais). Abreviaturas: OVLT (órgão vasculoso da lâmina terminal), SFO (órgão subfornical), dMnPO (núcleo pré-óptico mediano dorsal), vMnPO (núcleo pré-óptico mediano ventral), PVN (núcleo paraventricular) e SON (núcleo supra-óptico).

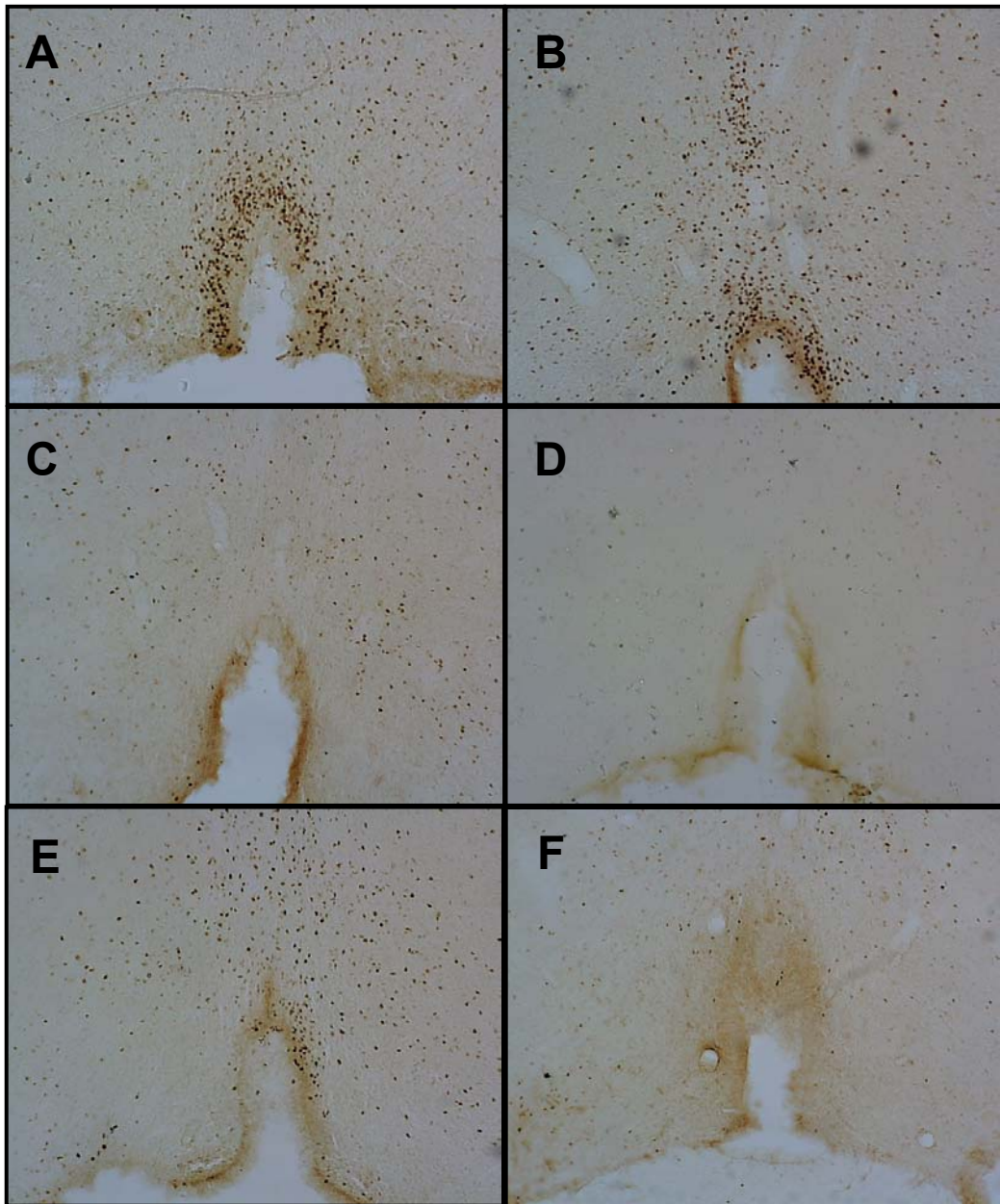


Figura 11: Fotomicrografias ($\times 40$) de cortes transversais do cérebro mostrando as marcações da imunorreatividade da proteína c-fos no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT). Tratamentos: FURO/CAP (sc) + moxonidina (NPBL) (A), FURO/CAP (sc) + veículo (NPBL) (B), salina/salina (sc) + moxonidina (NPBL) (C), salina/salina (sc) + veículo (NPBL) (D), FURO/CAP (sc) (E), nenhum tratamento (F).

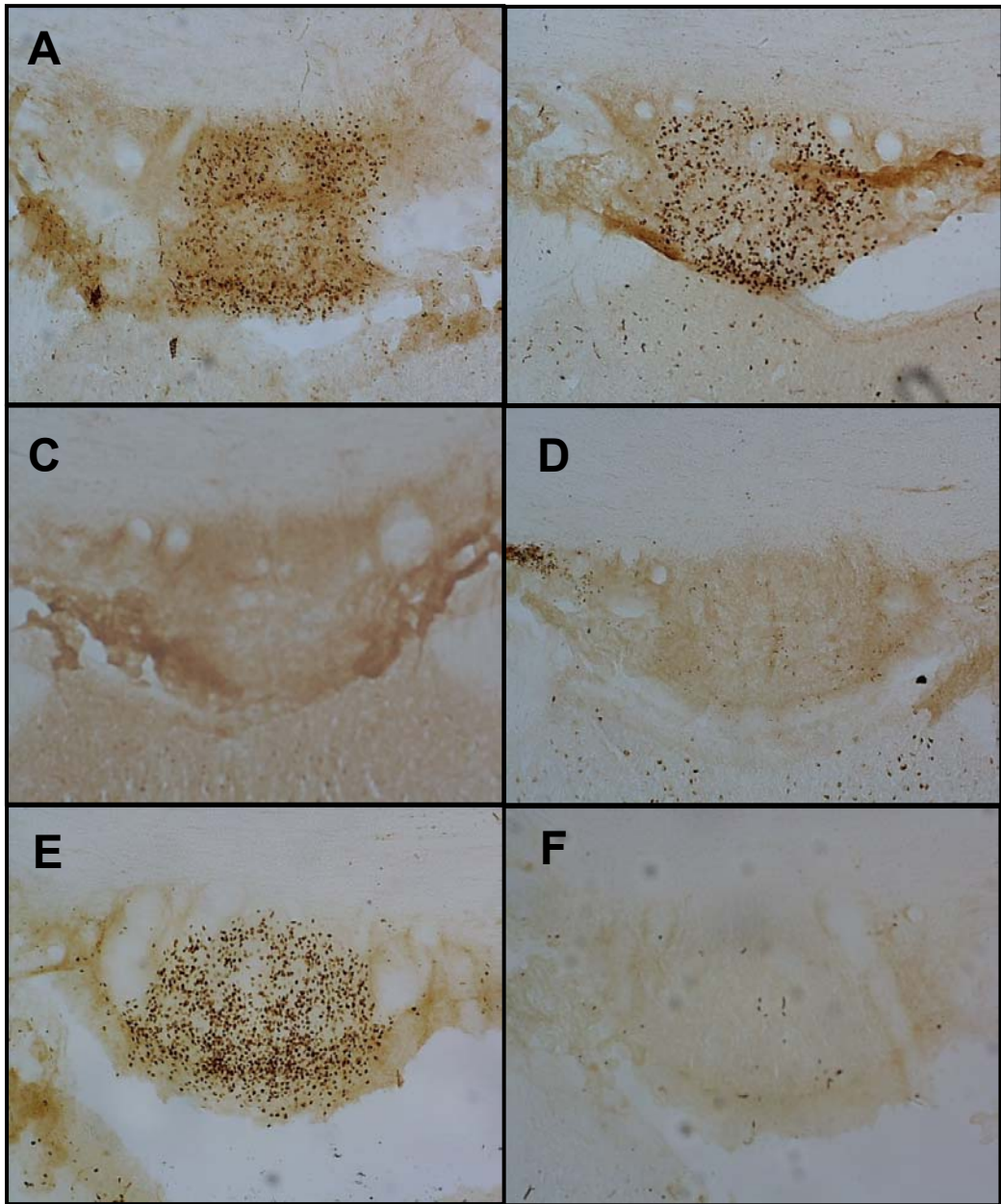


Figura 12: Fotomicrografias ($\times 40$) de cortes transversais do cérebro mostrando as marcações da imunorreatividade da proteína c-fos no órgão subfornical (SFO). Tratamentos: FURO/CAP (sc) + moxonidina (NPBL) (A), FURO/CAP (sc) + veículo (NPBL) (B), salina/salina (sc) + moxonidina (NPBL) (C), salina/salina (sc) + veículo (NPBL) (D), FURO/CAP (sc) (E), nenhum tratamento (F).

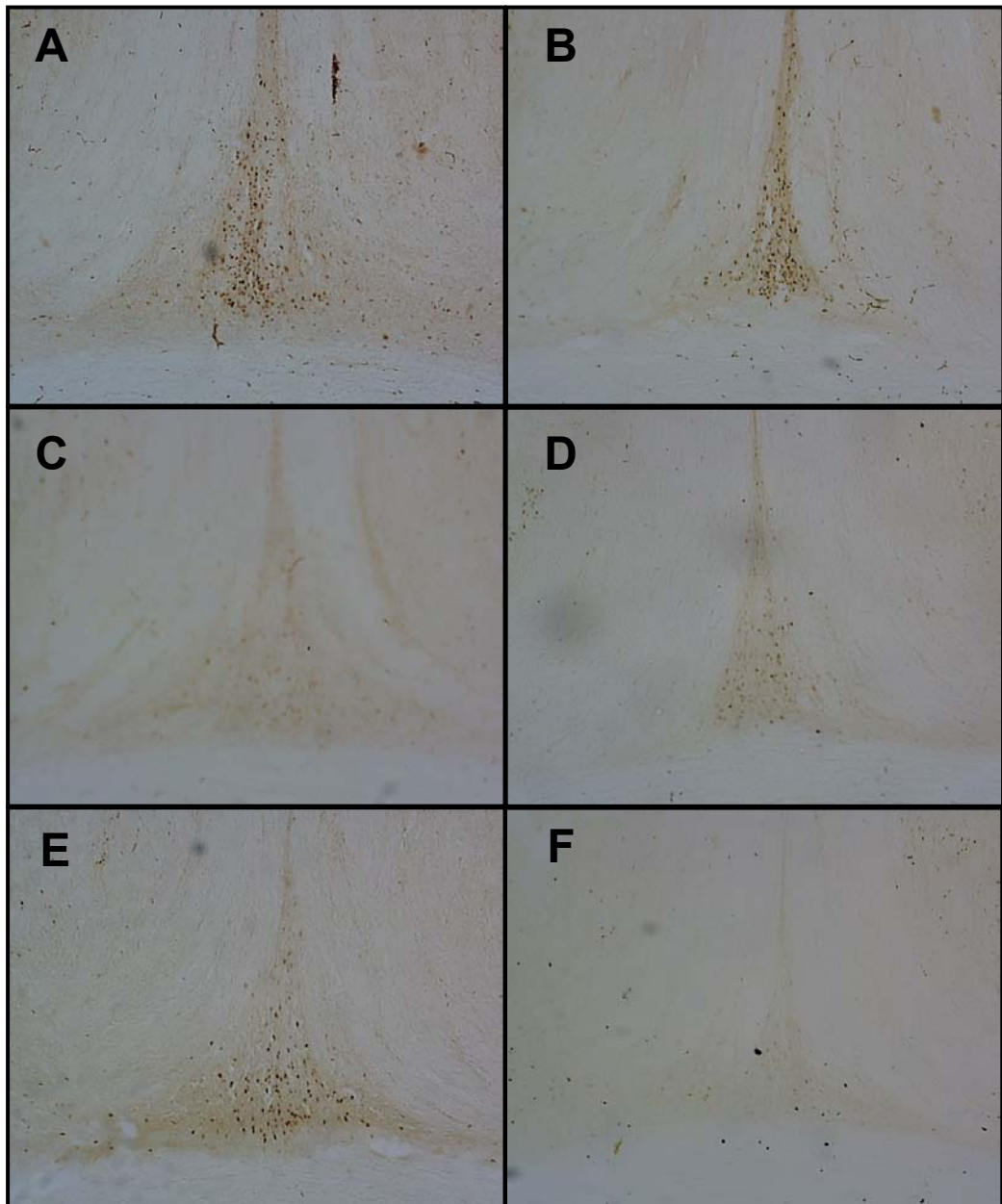


Figura 13: Fotomicrografias ($\times 40$) de cortes transversais do cérebro mostrando as marcações da imunorreatividade da proteína c-fos no núcleo pré-ótico mediano dorsal (dMnPO). Tratamentos: FURO/CAP (sc) + moxonidina (NPBL) (**A**), FURO/CAP (sc) + veículo (NPBL) (**B**), salina/salina (sc) + moxonidina (NPBL) (**C**), salina/salina (sc) + veículo (NPBL) (**D**), FURO/CAP (sc) (**E**), nenhum tratamento (**F**).

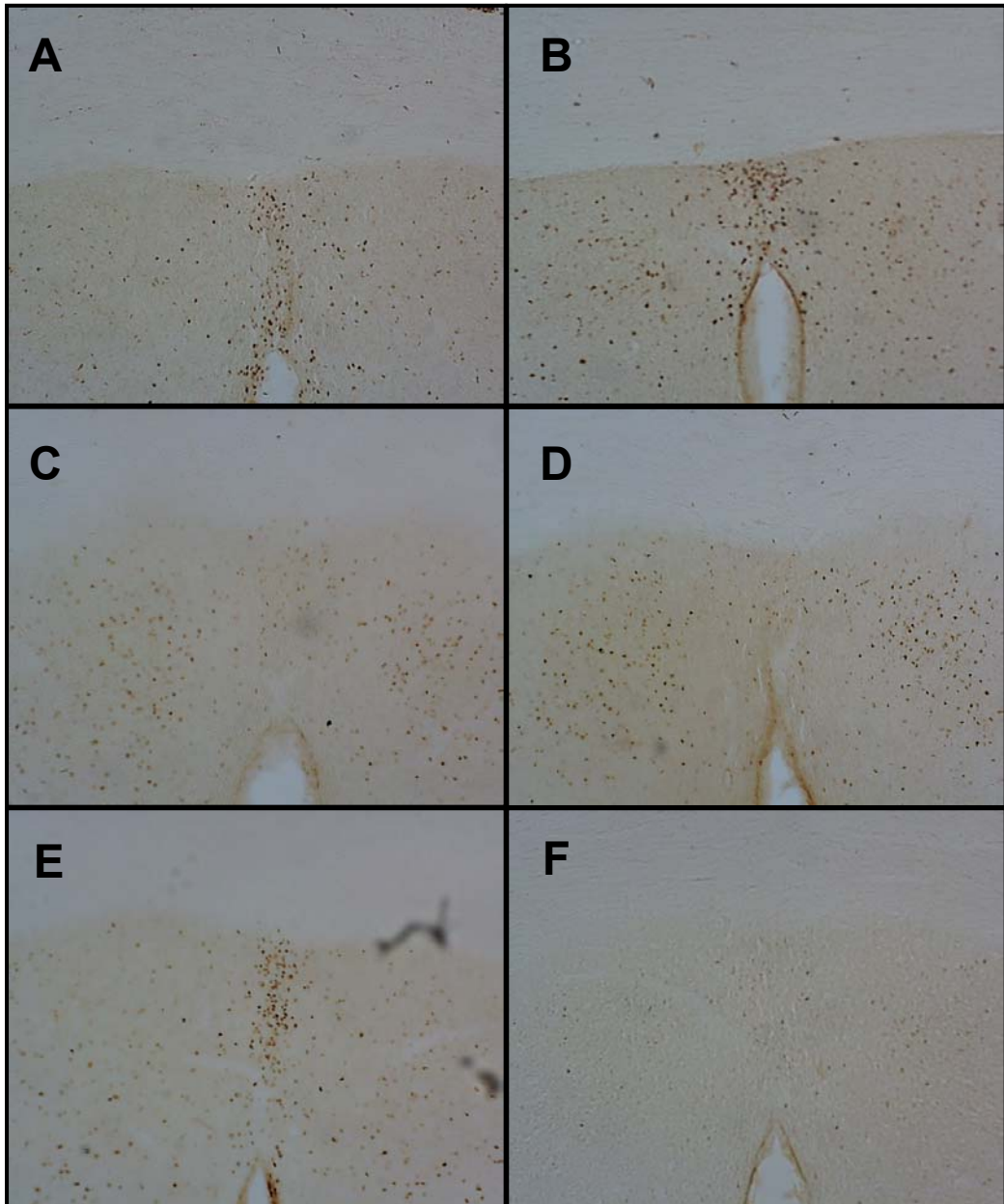


Figura 14: Fotomicrografias ($\times 40$) de cortes transversais do cérebro mostrando as marcações da imunorreatividade da proteína c-fos no núcleo pré-ótico mediano ventral (vMnPO). Tratamentos: FURO/CAP (sc) + moxonidina (NPBL) (**A**), FURO/CAP (sc) + veículo (NPBL) (**B**), salina/salina (sc) + moxonidina (NPBL) (**C**), salina/salina (sc) + veículo (NPBL) (**D**), FURO/CAP (sc) (**E**), nenhum tratamento (**F**).

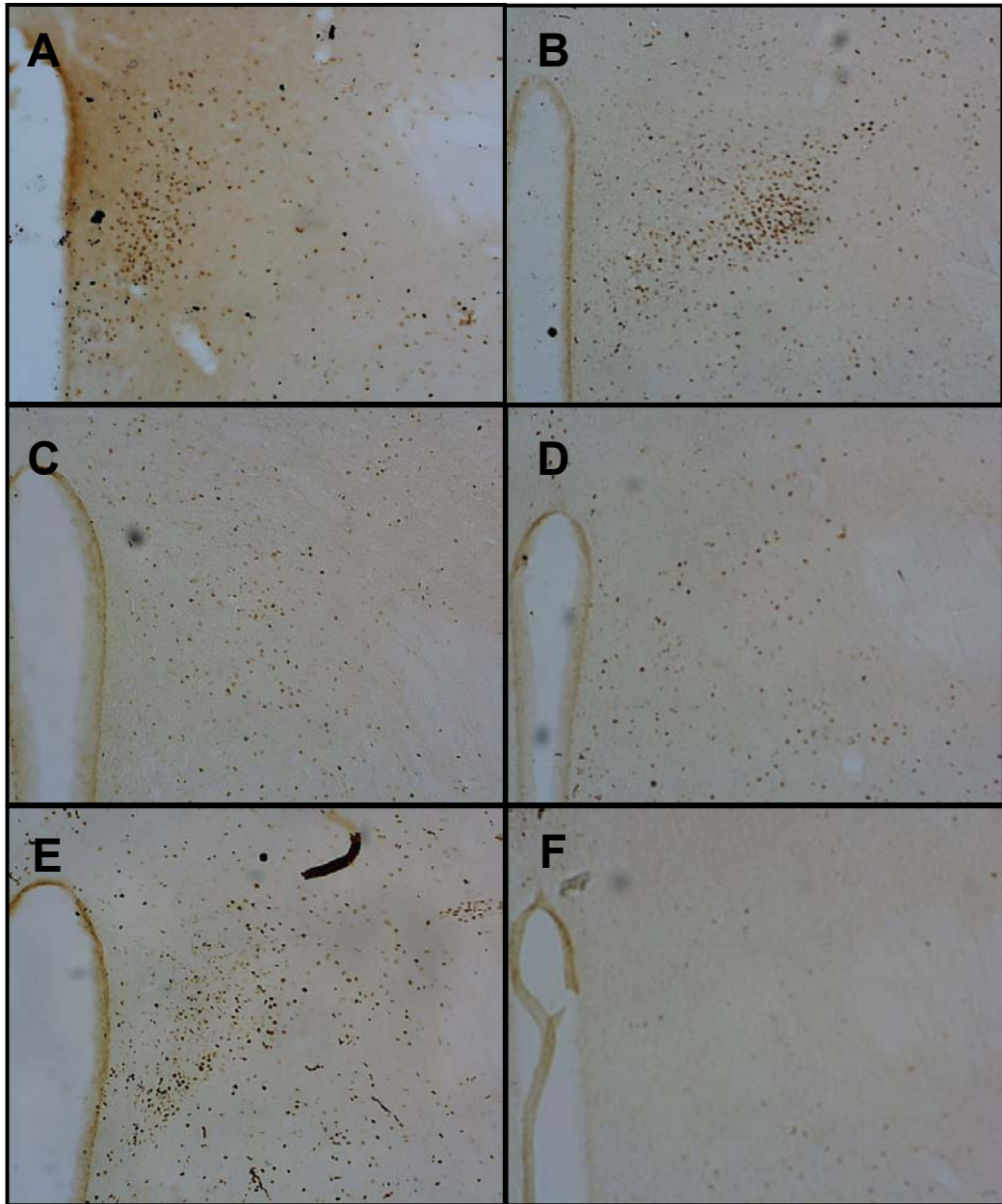


Figura 15: Fotomicrografias ($\times 40$) de cortes transversais do cérebro mostrando as marcações da imunorreatividade da proteína c-fos no núcleo paraventricular (PVN). Tratamentos: FURO/CAP (sc) + moxonidina (NPBL) (**A**), FURO/CAP (sc) + veículo (NPBL) (**B**), salina/salina (sc) + moxonidina (NPBL) (**C**), salina/salina (sc) + veículo (NPBL) (**D**), FURO/CAP (sc) (**E**), nenhum tratamento (**F**).

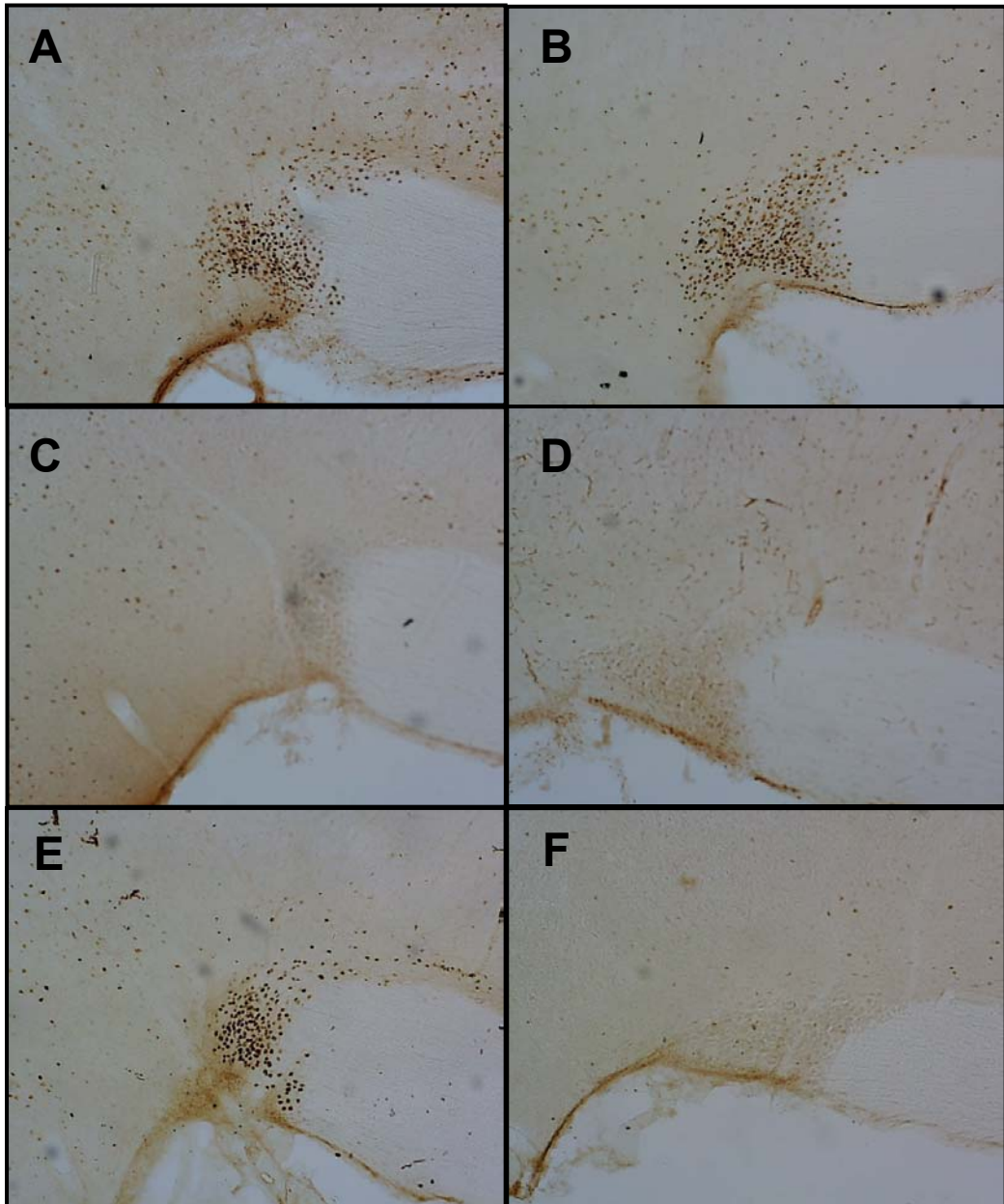


Figura 16: Fotomicrografias ($\times 40$) de cortes transversais do cérebro mostrando as marcações da imunorreatividade da proteína c-fos no núcleo supra-óptico (SON). Tratamentos: FURO/CAP (sc) + moxonidina (NPBL) (A), FURO/CAP (sc) + veículo (NPBL) (B), salina/salina (sc) + moxonidina (NPBL) (C), salina/salina (sc) + veículo (NPBL) (D), FURO/CAP (sc) (E), nenhum tratamento (F).

4.9 - Efeitos das injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de sacarose 0,06 M.

Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL não modificaram a ingestão de sacarose 0,06 M [$F(1,5) = 0,78$; $P > 0,05$], (Figura 17).

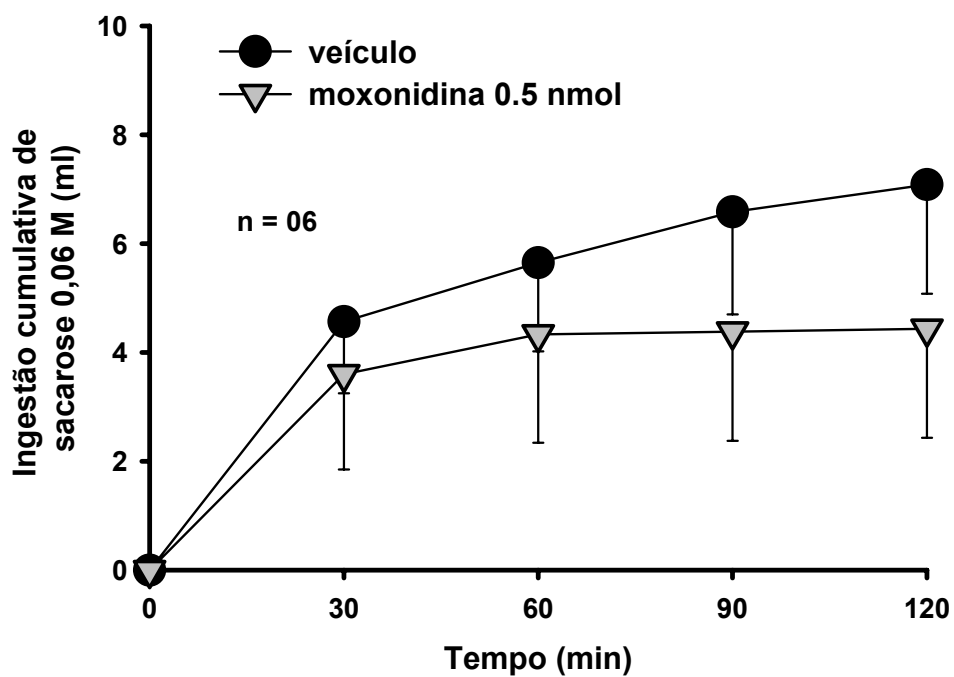


Figura 17: Ingestão cumulativa de sacarose 0,06 M após injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL em ratos treinados para ingerirem sacarose durante 2 h diariamente. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.10 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de alimento induzida por privação de alimento e ingestão de água e NaCl 0,3 M associada a ingestão de alimento.

Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol) não modificaram a ingestão de alimentar induzida por 14 horas de privação de alimento, [F(1,13) = 0,4; $P > 0.05$], (Figura 18A), mas aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M associada a ingestão de alimento, [F(1,13) = 6,0; $P < 0.05$], (Figura 18B), sem modificar a ingestão de água [F(1,13) = 2,8; $P > 0.05$], (Figura 18C).

A ingestão de alimento induzida por 24 horas de privação de alimentar também não foi modificada pelas injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol) no NPBL, [F(1,5) = 0,1; $P > 0.05$], (Figura 19A). O aumento na ingestão de NaCl 0,3 M associada a ingestão de alimento também foi observado neste grupo de animais, [F(1,5) = 8,9; $P < 0.05$], (Figura 19B), sem alterações da ingestão de água, [F(1,5) = 0,8; $P > 0.05$], (Figura 19C). Nesses mesmos animais, verificamos que não houve alteração da ingestão de NaCl 0,3 M, [F(1,5) = 1,0; $P > 0.05$], (Figura 20A), ou de água, [F(1,5) = 0,7; $P > 0.05$], (Figura 20B), quando o alimento não estava disponível durante o período experimental.

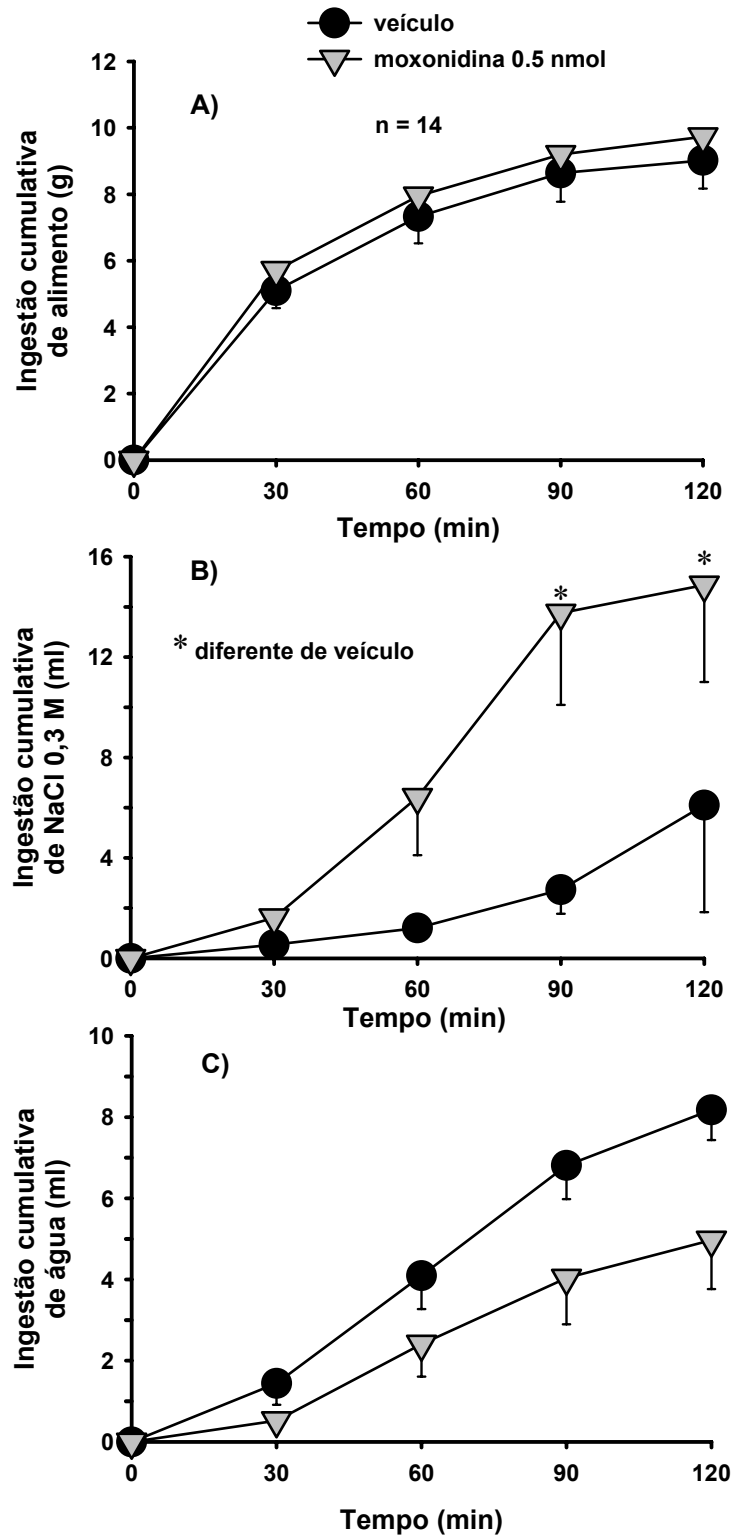


Figura 18: A) Ingestão cumulativa de alimento induzida por 14 horas de privação alimentar; B) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e C) Ingestão cumulativa de água associadas a ingestão de alimento em ratos que receberam injeções de moxonidina (0,5 mol) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

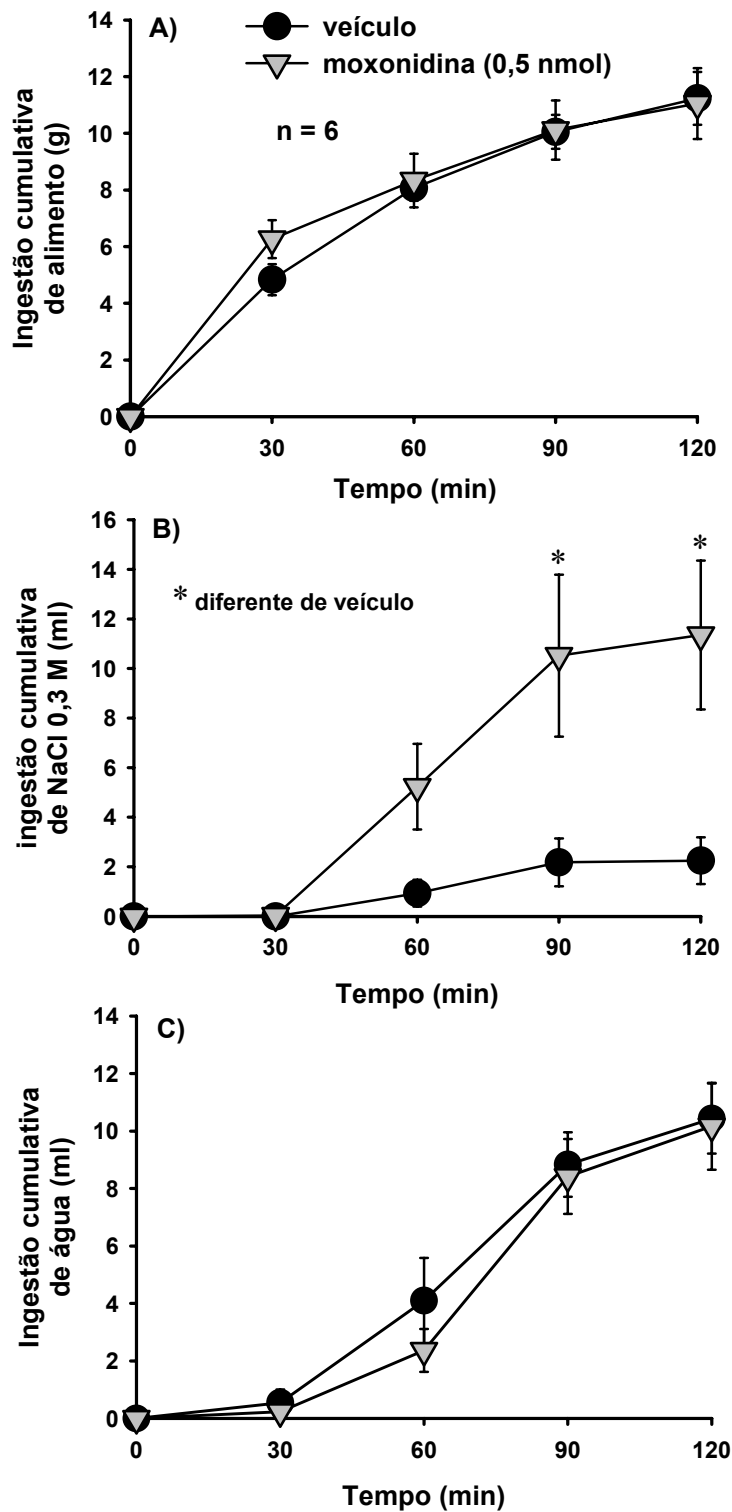


Figura 19: A) Ingestão cumulativa de alimento induzida por 24 horas de privação alimentar; B) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e C) Ingestão cumulativa de água associadas a ingestão de alimento em ratos que receberam injeções de moxonidina (0,5 mol) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

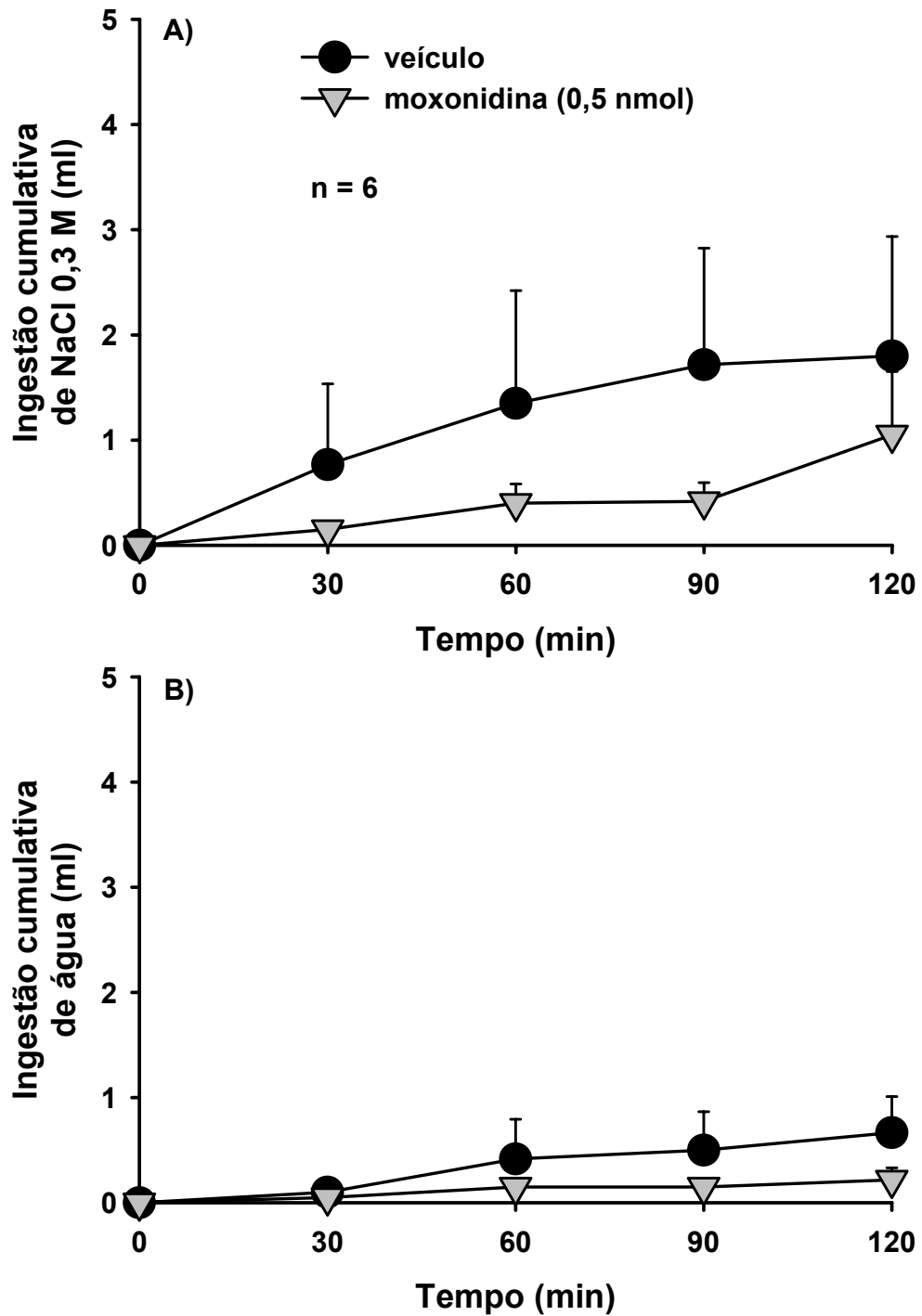


Figura 20: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M e B) Ingestão cumulativa de água em ratos com 24 horas de privação alimentar que receberam injeções de moxonidina (0,5 mol) ou veículo no NPBL sem acesso a ração durante o teste. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.11 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina sozinha ou combinada com RX 821002 no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M.

Em ratos previamente tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M (2 ml/rato), injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) induziram ingestão de NaCl 0,3 M ($19,1 \pm 5,5$ ml/2 h, vs. veículo: $1,8 \pm 0,6$ ml/2 h), [$F(1, 9) = 11,0$; $P < 0,05$], mas não alteraram a ingestão de água, [$F(1, 9) = 2,5$; $P > 0,05$], (Figura 21).

O pré tratamento com RX 821002 (10 nmol/0,2 µl) no NPBL reduziu os efeitos da moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) sobre a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos pré tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M, [$F(3, 33) = 3,9$; $P < 0,05$], (Figura 22). RX 821002 na dose de 20 nmol no NPBL quase aboliu os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, [$F(3,24) = 4,1$; $P < 0,05$], (Figura 23).

Apenas a injeção de moxonidina ou de RX 821002 ou ambos em combinação não alteraram a ingestão de água induzida pela sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M nos ratos tratados com RX 821002 (10 nmol/0,2 µl) [$F(3, 33) = 0,1$; $P > 0,05$], (Figura 22) ou RX 821002 (20 nmol/0,2 µl) [$F(3,24) = 1,4$; $P > 0,05$] (Figura 23).

Injeções de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) em locais fora do NPBL não modificaram a ingestão de NaCl 0,3 M, [$F(1, 8) = 3,4$; $P > 0,05$] nem a ingestão de água em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M, [$F(1,8) = 1,3$; $P > 0,05$], (Tabela 2).

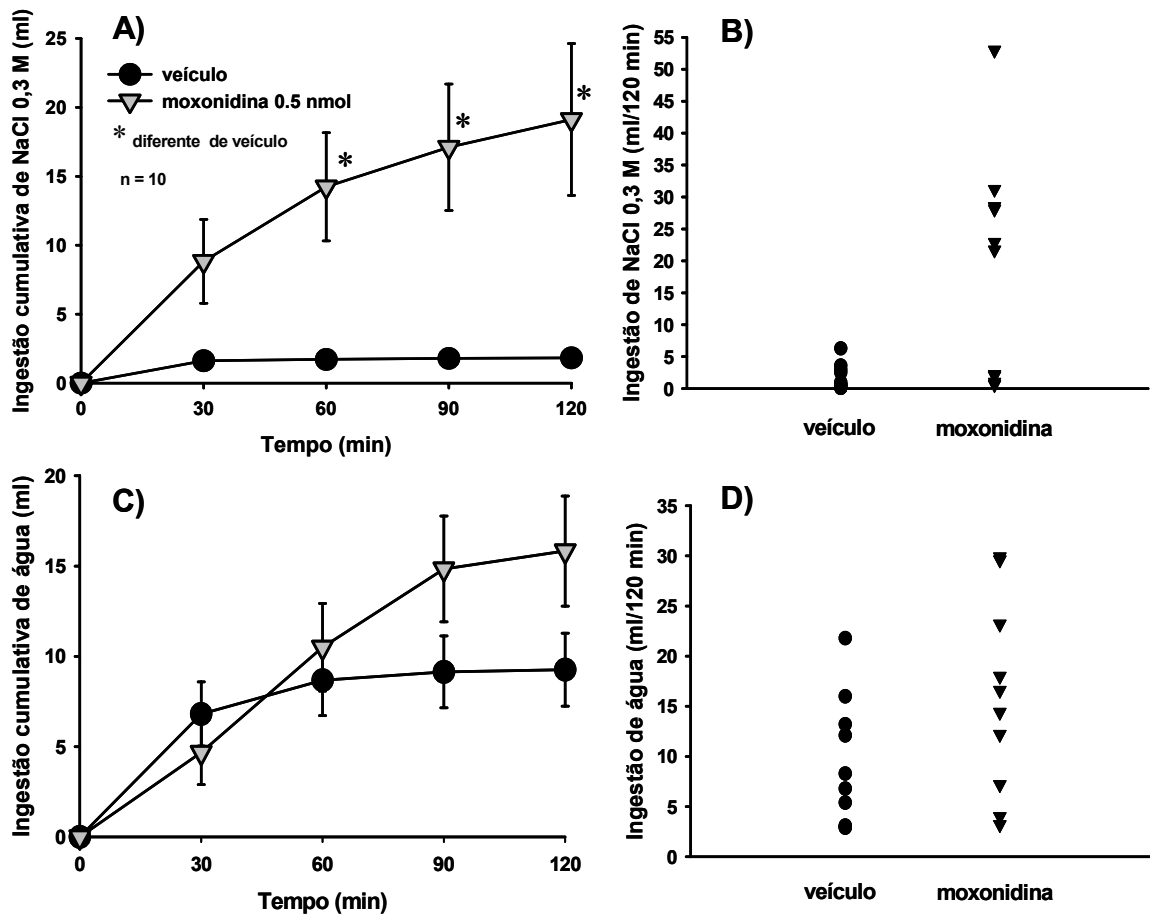


Figura 21: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; B) Valores individuais da ingestão de NaCl 0,3 M; C) Ingestão cumulativa de água; D) Valores individuais da ingestão de água em ratos tratados com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL combinados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M (2 ml). Valores de A e C expressos com média \pm EPM; n = número de ratos.

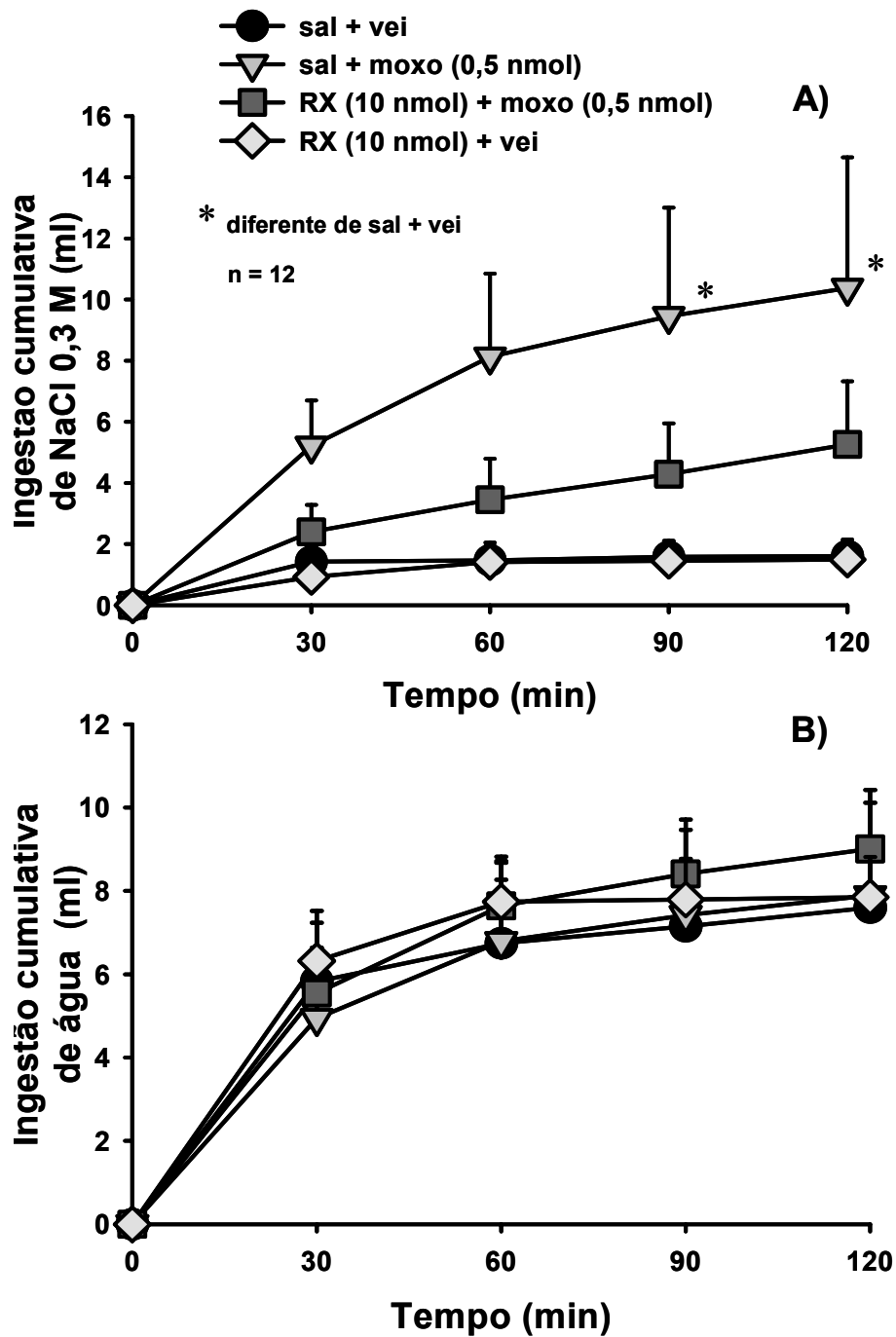


Figura 22: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; B) Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M (2 ml) seguida por injeções bilaterais de RX 821002 (RX, 10 nmol/0,2 μ l) ou salina (sal) combinado com moxonidina (moxo, 0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo (vei) no NPBL. Valores expressos com média \pm EPM. n = número de ratos.

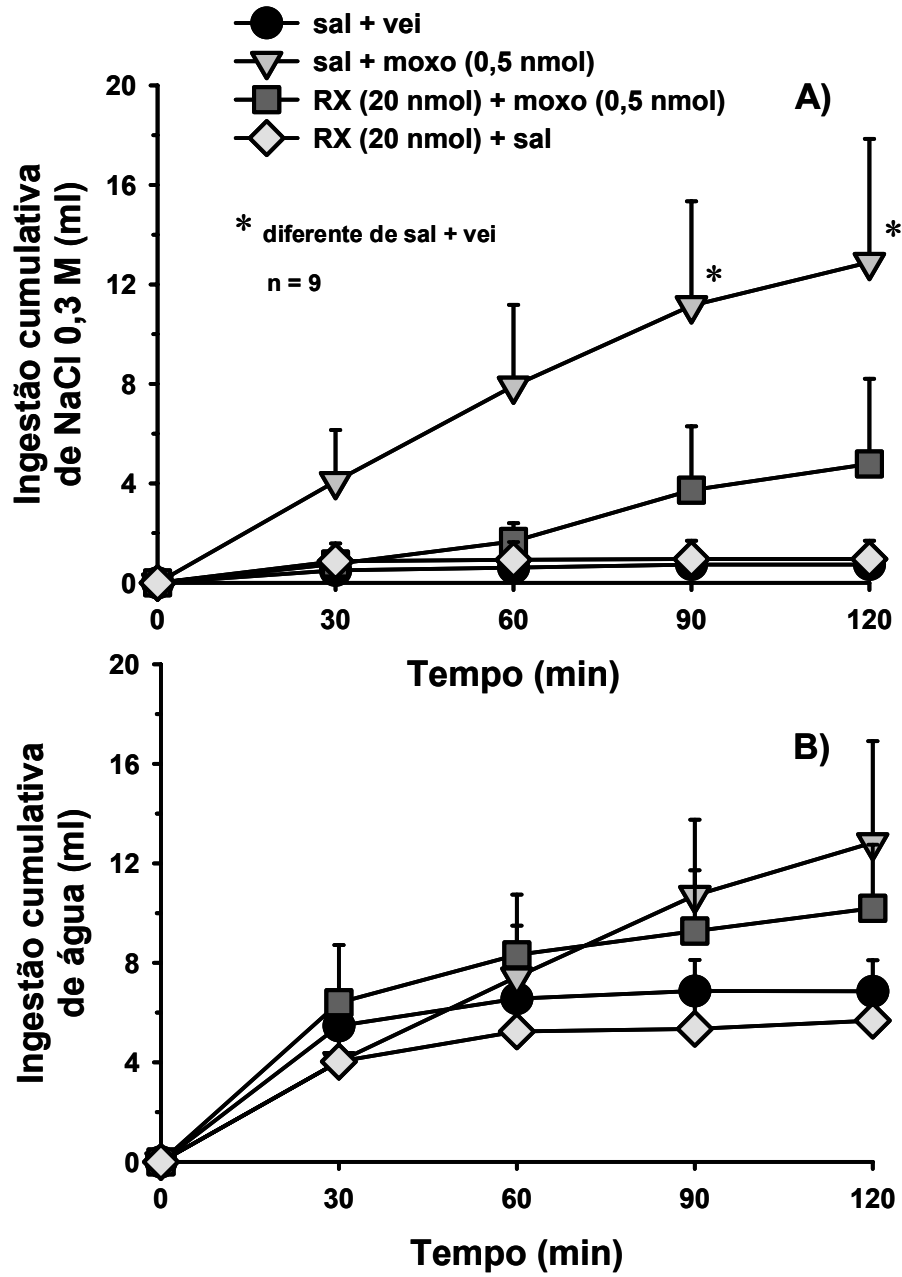


Figura 23: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; B) Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M (2 ml) seguida por injeções bilaterais de RX 821002 (RX, 20 nmol/0,2 μ l) ou salina (sal) combinado com moxonidina (moxo, 0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo (vei) no NPBL. Valores expressos com média \pm EPM. n = número de ratos.

Tabela 2: Ingestão cumulativa de água e NaCl 0,3 M em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2,0 M (2 ml) que receberam injeções de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo em locais fora do NPBL.

Tratamento no NPBL	30 min	60 min	90 min	120 min
<i>Ingestão de NaCl 0,3 M (ml)</i>				
moxonidina	2,4 ± 0,9	4,7 ± 2,3	6,0 ± 3,2	6,6 ± 3,8
veículo	1,7 ± 0,9	1,9 ± 1,0	2,4 ± 1,0	2,5 ± 1,0
<i>Ingestão de água (ml)</i>				
moxonidina	6,0 ± 1,5	8,2 ± 2,0	9,9 ± 2,1	10,0 ± 2,1
veículo	7,5 ± 1,7	11,2 ± 1,7	12,9 ± 2,3	13,4 ± 2,6

Valores expressos como média ± EPM. *n* = 09

4.12 – Efeitos de injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M induzida por 24 h de privação hídrica.

Em ratos previamente submetidos a privação hídrica de 24 h, injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M ($23,4 \pm 8,0$ ml/2 h, vs. veículo: $2,0 \pm 0,7$ ml/2 h), [F(1, 4) = 8,3; $P < 0,05$], mas não alteraram a ingestão de água, [F(1, 4) 0,6; $P > 0,05$], (Figura 24).

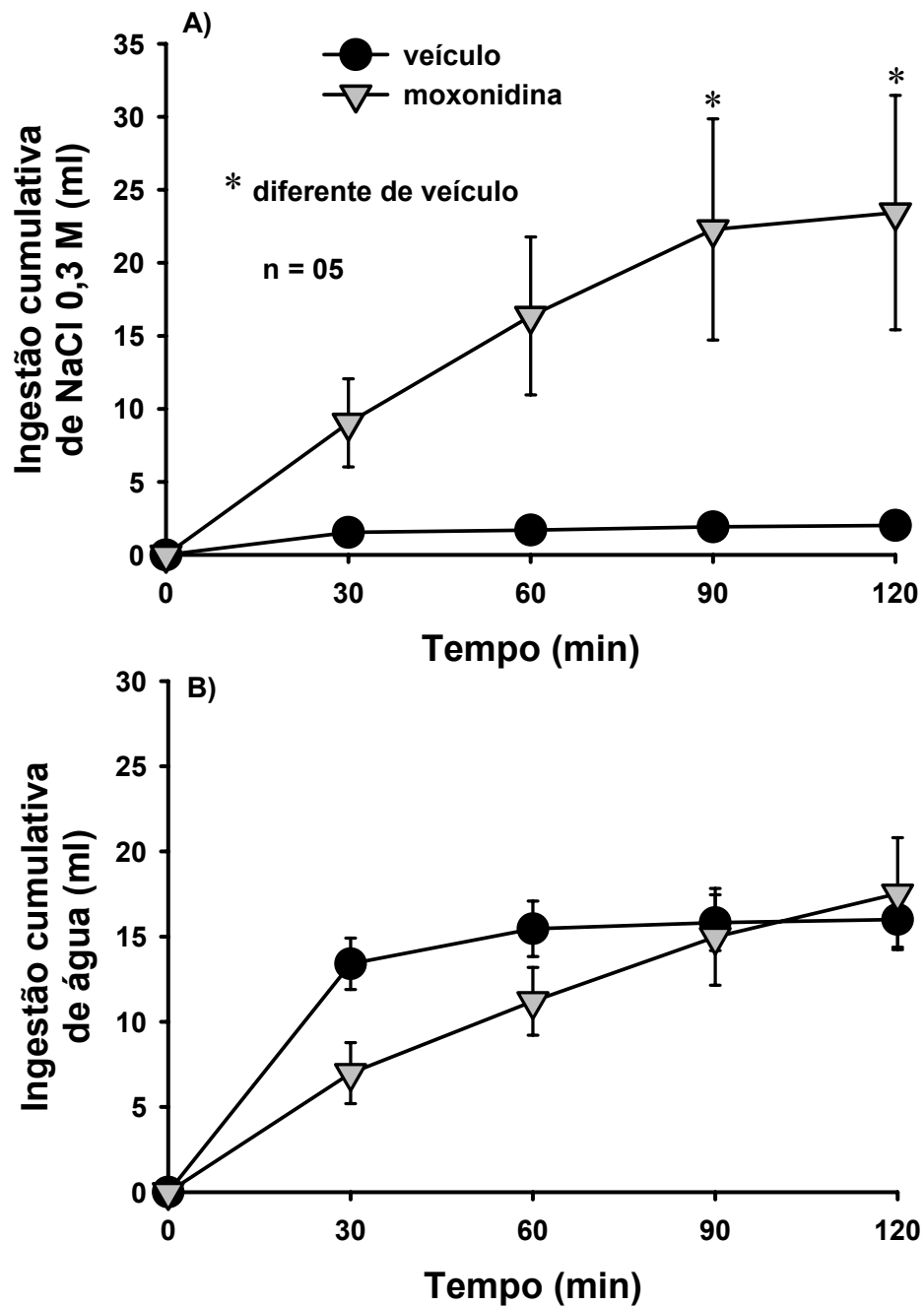


Figura 24: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; B) Ingestão cumulativa de água em ratos tratados com injeções bilaterais moxonidina (moxo, 0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo (vei) no NPBL em ratos submetidos a 24 h de privação hídrica. Valores expressos com média \pm EPM. n = número de ratos.

4.13 – Interação entre os mecanismos serotoninérgico e adrenérgico α_2 no controle da ingestão água e NaCl.

Injeções bilaterais do agonista serotoninérgico DOI (5 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) no NPBL inibiram, enquanto as injeções de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μl) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP, [F(3,21) = 12,3; $P < 0,01$], (Figura 25A). Combinando-se com moxonidina no NPBL, o efeito inibitório do DOI foi abolido e o aumento na ingestão de NaCl 0,3 M foi semelhante ao produzido apenas pelas injeções de moxonidina no NPBL, (Figura 25A).

DOI injetado no NPBL também inibiu e a moxonidina aumentou a ingestão de água induzida pelo tratamento com FURO + CAP. Com a combinação de injeções de moxonidina e DOI, o efeito do DOI sobre a ingestão de água também foi abolido e a ingestão de água foi semelhante àquela que ocorreu quando apenas moxonidina foi injetada no NPBL, [F(3,21) = 6,08; $P < 0,05$], (Figura 25B).

Injeções bilaterais de metisergida (4 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M, [F(3, 21) = 4,14; $P < 0,05$], e esse efeito da metisergida injetada no NPBL não foi modificado pela prévia injeção de RX 821002 (20 nmol/0,2 μl) no NPBL, (Figura 26A). Nesse grupo de ratos, não houve diferença significativa entre os tratamentos no NPBL em relação à ingestão de água, [F(3,21) = 0,15; $P > 0,05$], (Figura 26B).

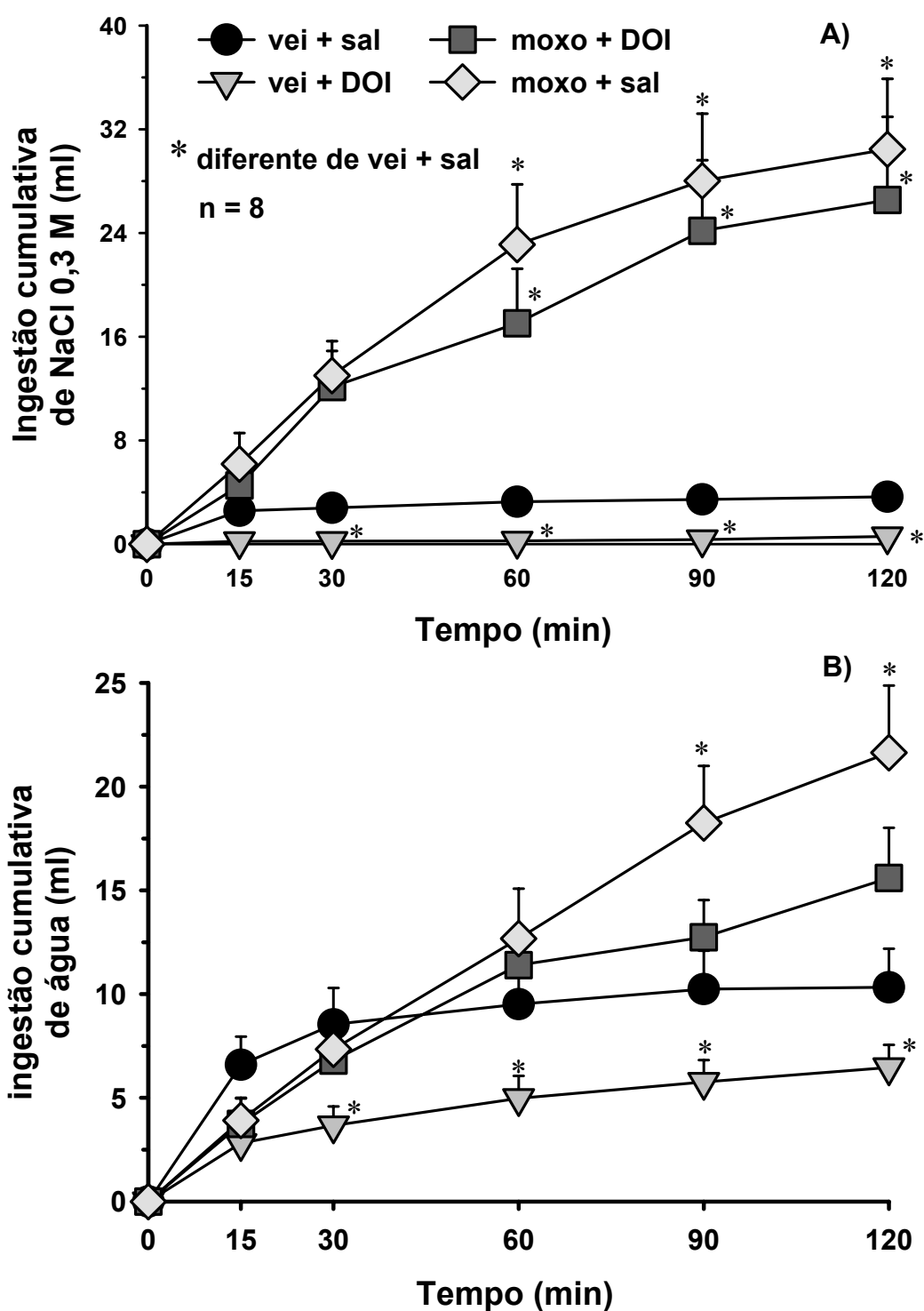


Figura 25: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; B) Ingestão cumulativa de água induzida por FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais de moxonidina (moxo, 0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo (vei) + DOI (5 μ g/0,2 μ l) ou salina (sal) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM; n = número de ratos.

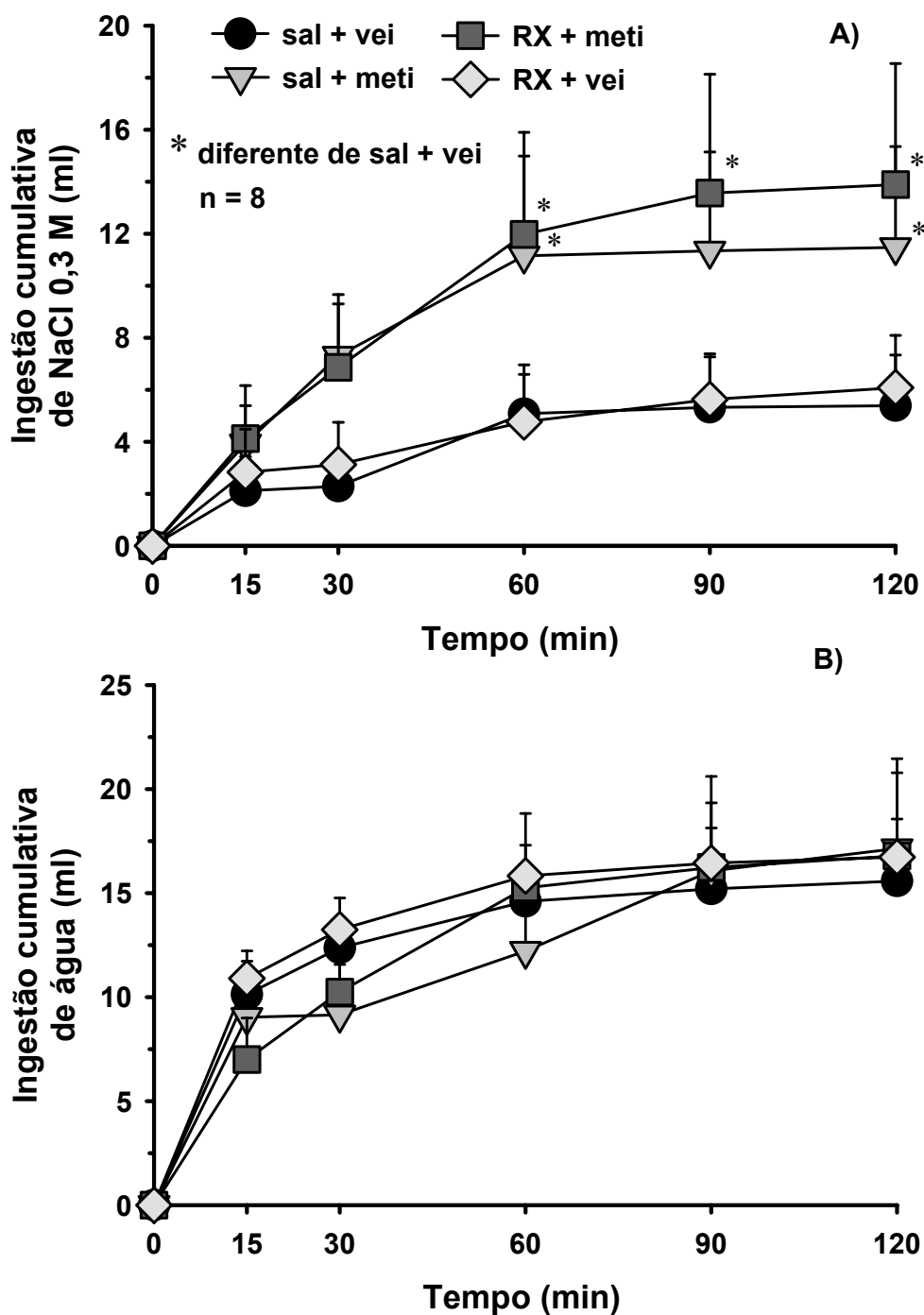


Figura 26: **A)** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; **B)** Ingestão cumulativa de água induzida por FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais de RX 821002 (RX, 20 nmol/0,2 μ l) ou salina (sal) + metisergida (meti, 4 μ g/0,2 μ l) ou veículo (vei) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM; n = número de ratos.

4.14 – Interação entre os mecanismos GABAérgico e adrenérgico α_2 do NPBL no controle da ingestão água e NaCl.

Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento FURO + CAP. O pré-tratamento com o antagonista de receptores GABA_A bicuculina (5 nmol/0,2 μ l) bilateralmente no NPBL reduziu parcialmente os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, [F(3, 24) = 22,9; $P < 0,001$], (Figura 27A). Apenas as injeções de bicuculina no NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP.

Injeções bilaterais de moxonidina no NPBL também aumentaram a ingestão de água induzida pelo tratamento FURO + CAP. O aumento da ingestão de água foi abolido pelo pré-tratamento com bicuculina (5 nmol/0,2 μ l) bilateralmente no NPBL. Apenas as injeções de bicuculina no NPBL não alteraram a ingestão água induzida por FURO + CAP. ANOVA mostrou uma interação significativa entre tempos e tratamentos para ingestão de água nesses animais, [F(12, 96) = 7,8; $P < 0,001$], (Figura 27B).

O aumento da ingestão de NaCl 0,3 M produzido pela moxonidina no NPBL em ratos tratados com FURO + CAP, [F(3,18) = 9,7; $P < 0,001$], não foi alterado pelo pré-tratamento com o antagonista GABA_B saclofen (5 nmol/0,2 μ l) bilateralmente no NPBL, (Figura 28A). Apenas as injeções de saclofen no NPBL também não alteraram a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP. Em relação à ingestão de água, não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos, [F(3,18) = 3,1; $P > 0,05$], (Figura 28B).

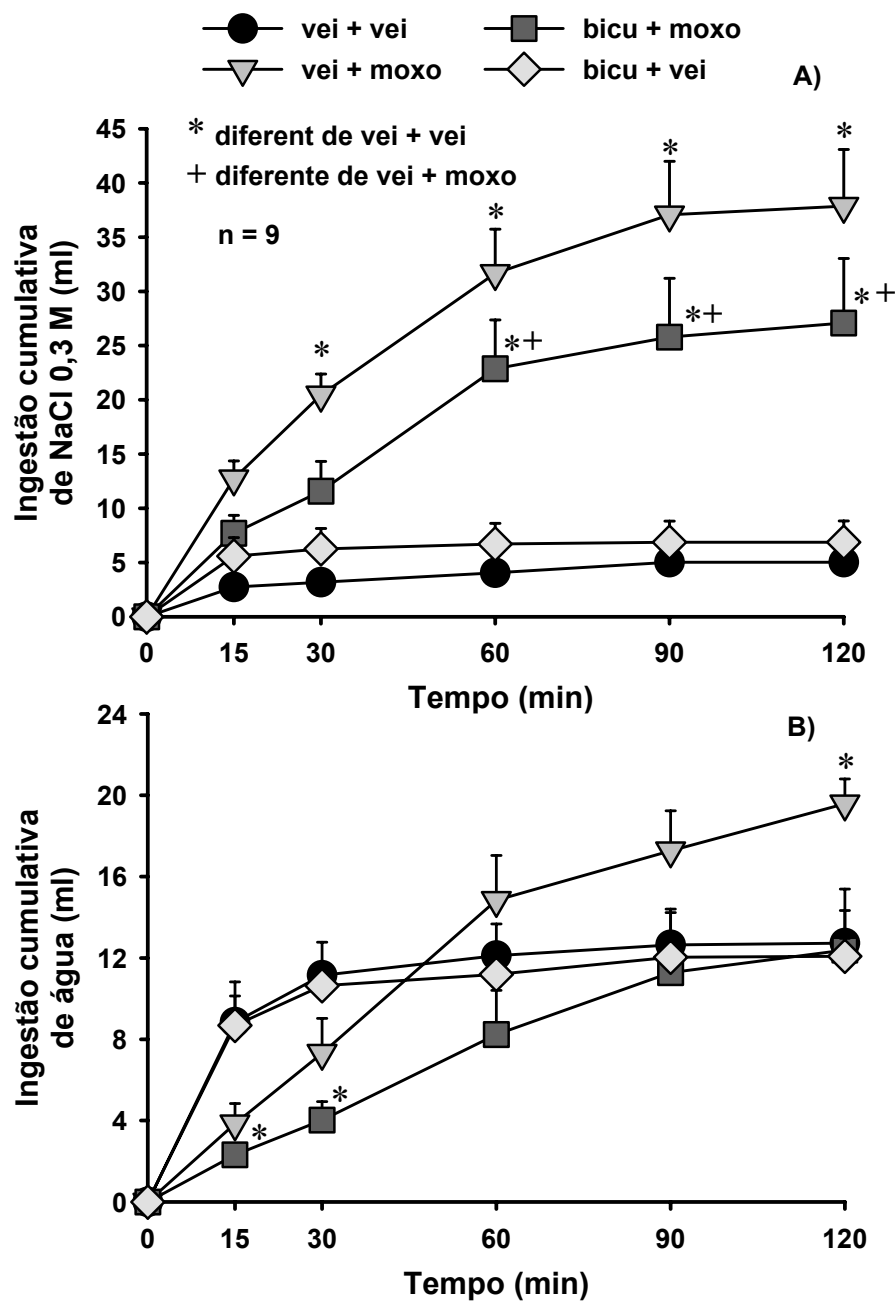


Figura 27: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; B) Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais de bicuculina (bicu, 5,0 nmol/0,2 μ l) ou veículo (vei) + moxonidina (moxo, 0,5 mol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

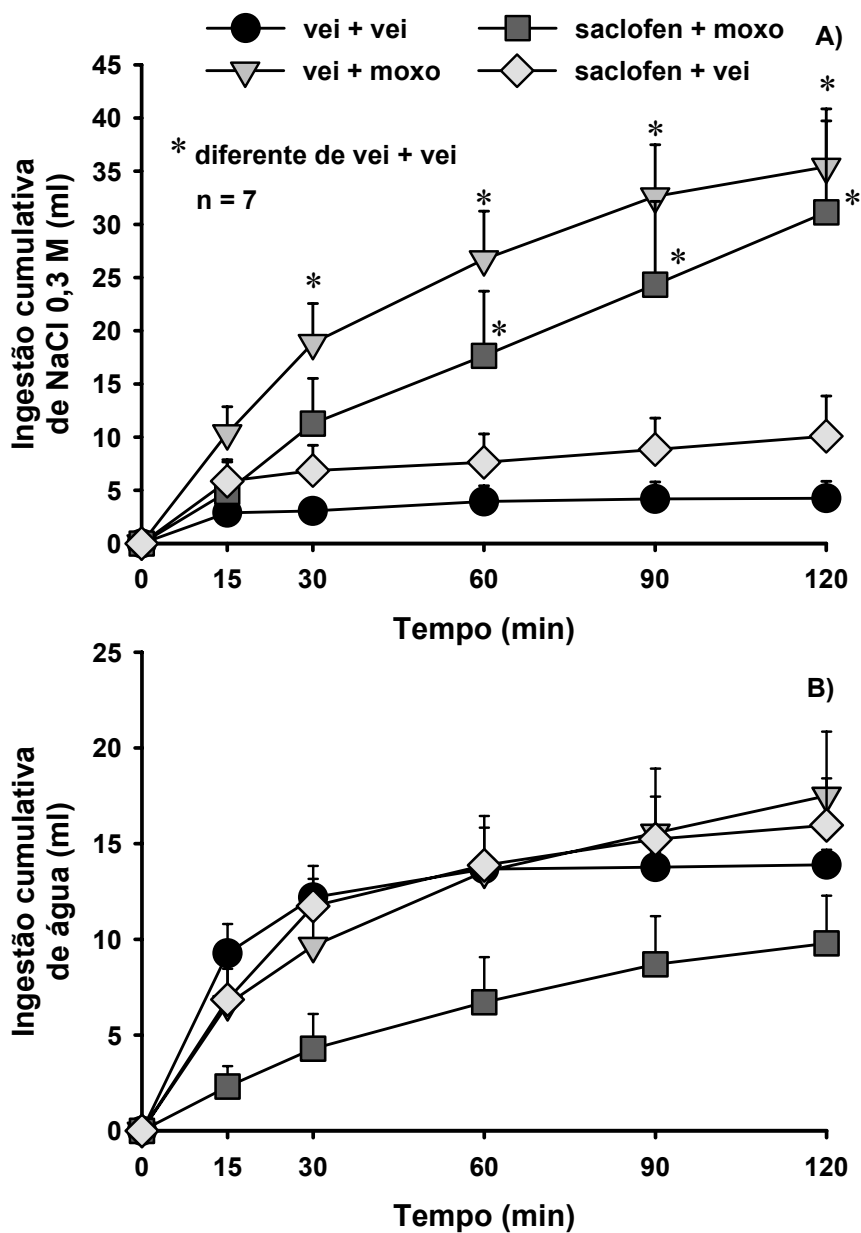


Figura 28: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M; B) Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções bilaterais de saclofen (5,0 nmol/0,2 μ l) ou veículo (veí) + moxonidina (moxo) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

4.15 – Interação entre os mecanismos opioidérgico e adrenérgico α_2 no controle da ingestão água e NaCl.

O aumento na ingestão de NaCl 0,3 M produzido pelas injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL em ratos tratados com FURO + CAP ($40,2 \pm 9,0$ ml/2 h, vs. veículo: $4,5 \pm 2,0$ ml/2 h) foi parcialmente reduzido ($23,7 \pm 8,0$ ml/2 h) pelo pré-tratamento com naloxona (40 ng/0,2 μ l) no NPBL, [F(3,12) = 10,0; $P < 0,05$]. Apenas a injeção de naloxona no NPBL não modificou a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo tratamento com FURO + CAP ($3,6 \pm 1,3$ ml/2 h), (Figura 29A). Não foram observadas diferenças significativas na ingestão de água, [F(3,12) = 1,3; $P > 0,05$], (Figura 29B).

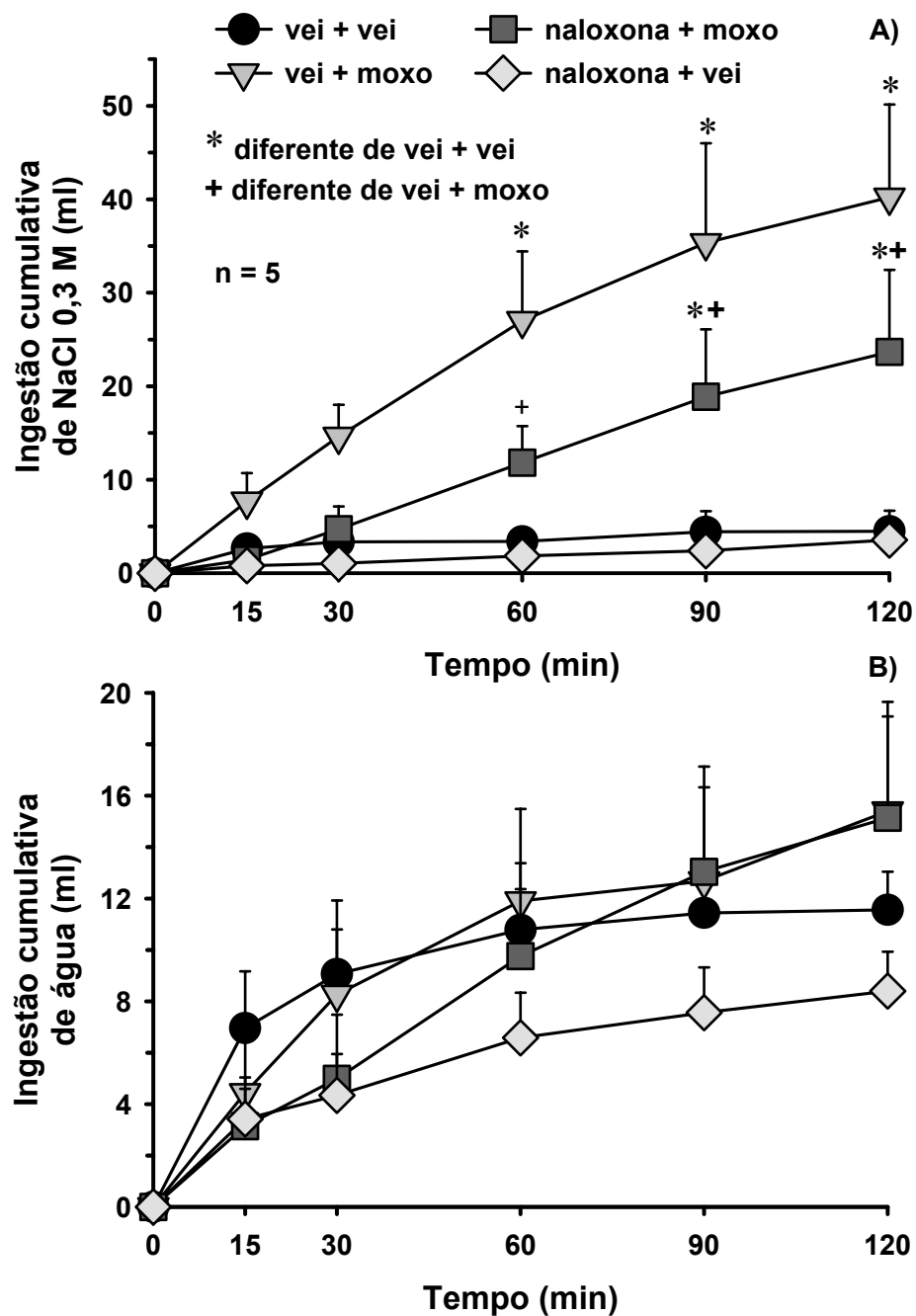


Figura 29: A) Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M, B) Ingestão cumulativa de água induzida pelo tratamento combinado com FURO + CAP sc em ratos que receberam injeções de naloxona (40 µg/0,2 µl) ou veículo (vei) + moxonidina (moxo, 0,5 nmol/0,2 µl) ou veículo no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais.

4.16 – Efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos e do bloqueio serotoninérgico no NPBL sobre o teste de reação ao sabor

Houve um aumento das respostas hedônicas no terceiro minuto de infusão intra-oral de NaCl 1,8% apenas após injeções de metisergida no NPBL, [$F(2,54) = 3,9; P < 0,05$], Figura 30.

As respostas aversivas [$F(2,54) = 0,8; P > 0,05$] e neutras [$F(2,54) = 1,3; P > 0,05$] não foram modificadas pelo tratamento com moxonidina ou metisergida no NPBL (Figuras 31 e Figura 32).

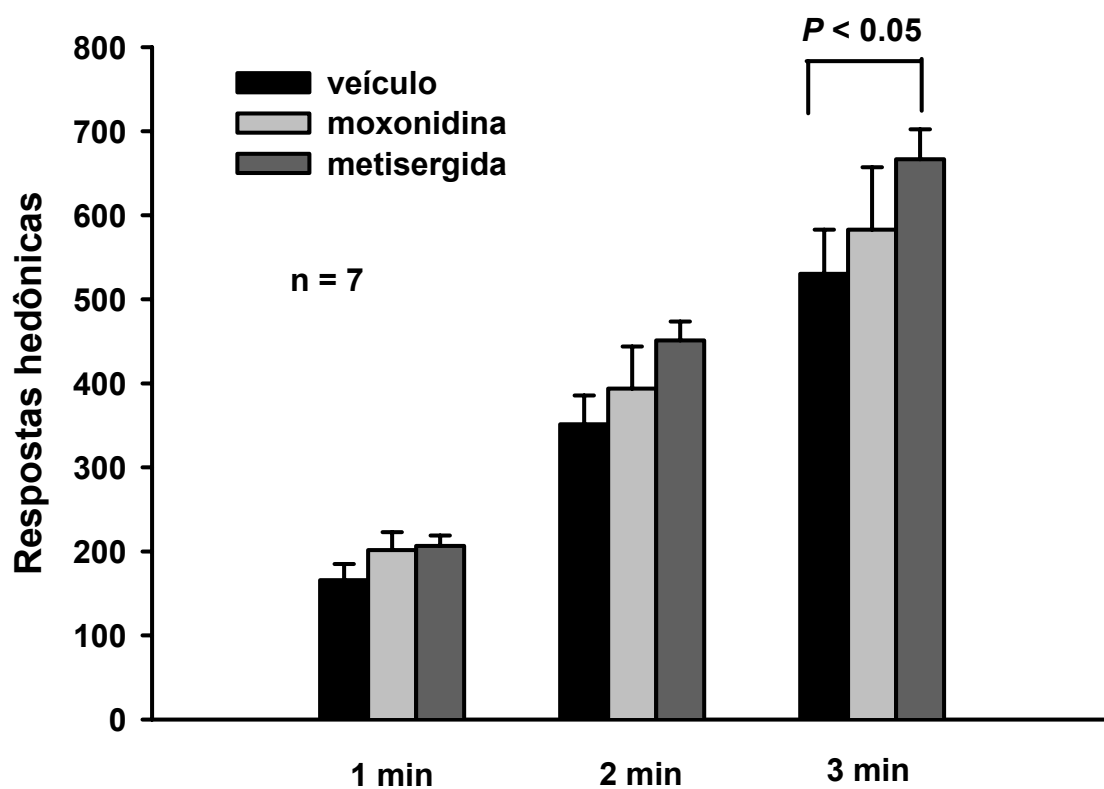


Figura 30: Respostas hedônicas à infusão intra-oral de NaCl 1,8% após injeções de veículo, moxonidina (0,5 nmol) ou metisergida (4 μ g) no NPBL em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 12%. Valores cumulativos expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

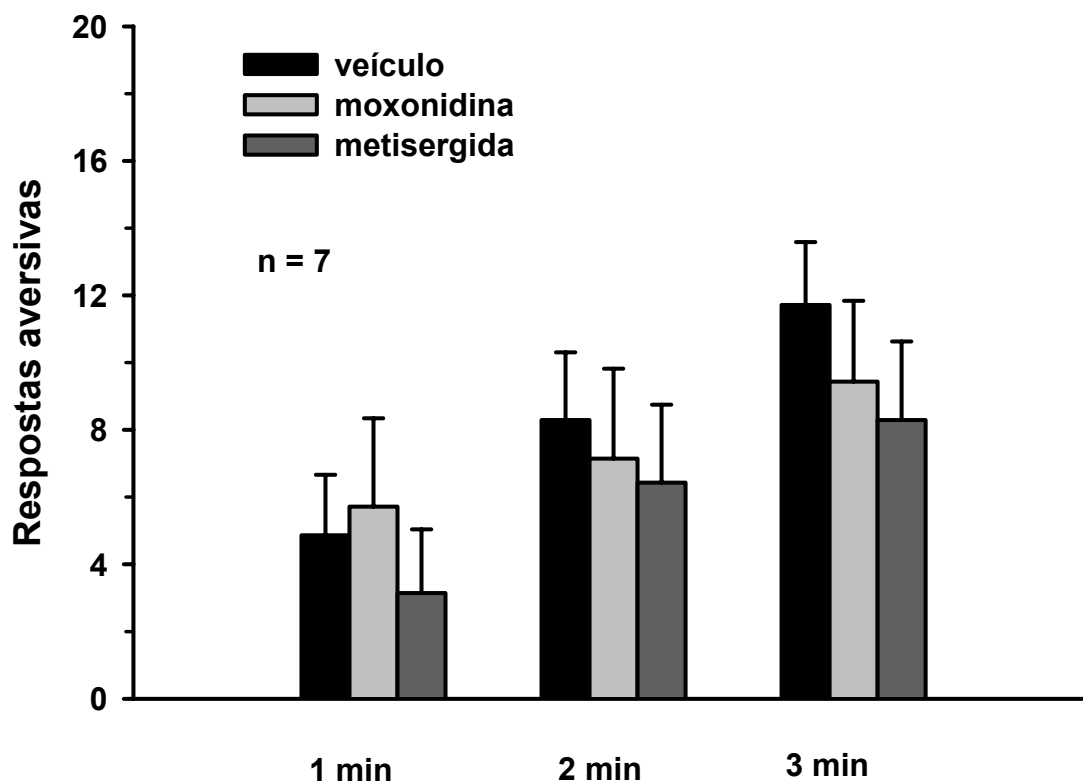


Figura 31: Respostas aversivas à infusão intra-oral de NaCl 1,8% após injeções de veículo, moxonidina (0,5 nmol) ou metisergida (4 μ g) no NPBL em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 12%. Valores cumulativos expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

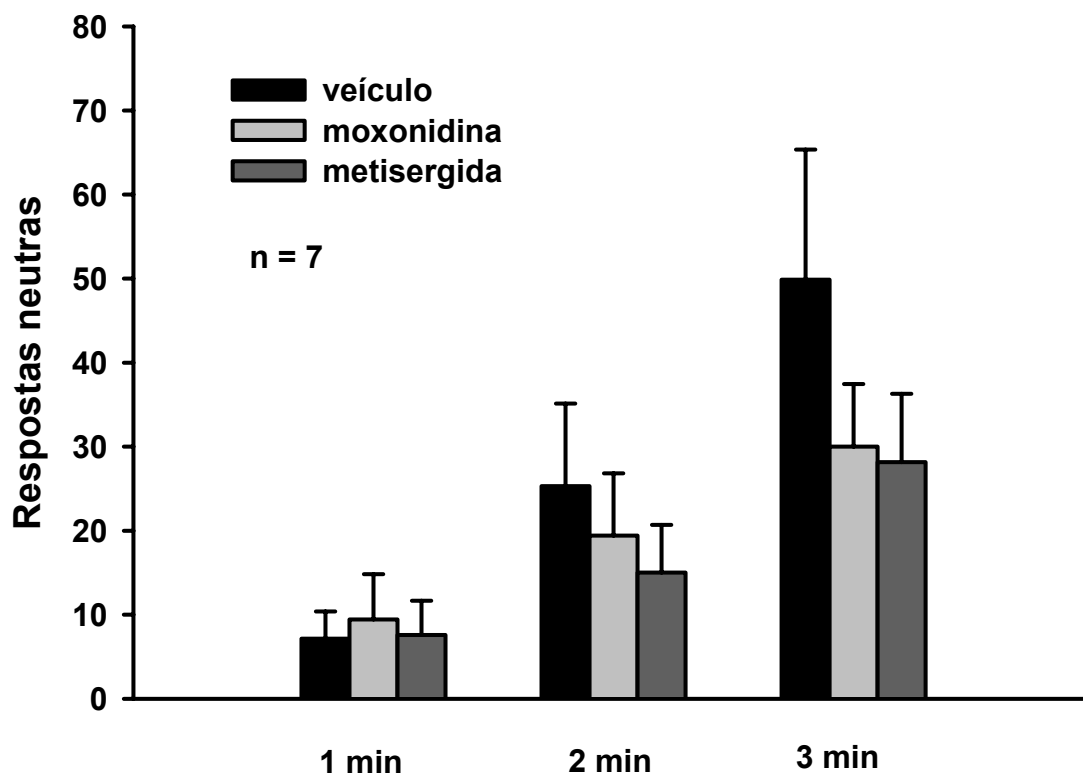


Figura 32: Respostas neutras à infusão intra-oral de NaCl 1,8% após injeções de veículo, moxonidina (0,5 nmol) ou metisergida (4 μ g) no NPBL em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 12%. Valores cumulativos expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

5 – DISCUSSÃO

5.1 - Papel dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL na ingestão de NaCl

Injeções bilaterais de moxonidina no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 0,3 M de um modo dose dependente. O aumento produzido pela moxonidina (mais que dez vezes a quantia ingerida pelos controles tratados com FURO + CAP sc e veículo no NPBL) foi completamente abolido pelo RX 821002, um antagonista de receptores adrenérgicos α_2 . Adicionalmente, verificamos que a expressão da proteína c-fos induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc em diferentes áreas prosencefálicas e a pressão arterial ou a frequência cardíaca não foram alteradas por injeções bilaterais de moxonidina no NPBL. Moxonidina injetada bilateralmente 1 mm acima do NPBL também não modificou a ingestão de sódio e água induzida por FURO + CAP.

Os presentes resultados também mostraram que, assim como a moxonidina, injeções de clonidina e de α -metilnoradrenalina no NPBL aumentam a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por FURO + CAP. Além disso, o efeito da α -metilnoradrenalina foi também revertido pelo tratamento prévio com RX 821002. Sendo a α -metilnoradrenalina uma substância sem característica imidazólica, e seu efeito revertido pela prévia injeção de RX 821002, pode-se dizer que o RX 821002 está bloqueando os receptores adrenérgicos α_2 . Portanto, podemos afirmar que um mecanismo importante envolvendo receptores adrenérgicos α_2 existe no NPBL para controlar a ingestão de sódio e água. No caso da moxonidina, não podemos excluir totalmente a participação dos receptores imidazólicos para promover seu efeito, mas, com certeza, podemos afirmar que receptores adrenérgicos α_2 do NPBL estão envolvidos no efeito da moxonidina. Assim sendo, podemos concluir que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL produz um aumento potente da ingestão de NaCl hipertônico.

Os resultados no NPBL são opostos aos efeitos inibitórios que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 em áreas prosencefálicas tem sobre a sede e apetite ao sódio (FERRARI et al., 1990; CALLERA et al., 1993; DE PAULA et al., 1996; DE LUCA JR & MENANI, 1997; YADA et al., 1997a; MENANI et al., 1999; SUGAWARA et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2003; ANDRADE et al., 2003). A moxonidina pode agir em várias áreas prosencefálicas, em doses maiores do que as doses efetivas no NPBL, para produzir uma completa inibição da ingestão de água e de sódio (MENANI et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2003; ANDRADE et al., 2003). As diferenças nos efeitos não estão relacionadas à dose, pois injeções bilaterais de moxonidina no NPBL nas doses de 5, 10 e 20 nmol produziram efeitos semelhantes aos produzidos pelas doses de 0,5 e 1 nmol desse agonista na mesma área. Até mesmo a menor dose utilizada (0,1 nmol) injetada no NPBL aumentou significativamente a ingestão de NaCl, sugerindo a alta sensibilidade do mecanismo adrenérgico α_2 presente neste núcleo para controlar a ingestão de sódio.

É importante notar que, apesar do potente aumento da ingestão de NaCl produzido pela combinação de FURO + CAP sc e moxonidina no NPBL, foi verificado apenas um aumento pequeno na ingestão de água, indicando forte preferência dos ratos pelo NaCl nessa situação. Por outro lado, considerando o provável aumento da osmolaridade plasmática produzido pela ingestão de NaCl hipertônico, um aumento na ingestão de água seria esperado. O fato de não ter ocorrido um aumento na ingestão de água em ratos que receberam moxonidina no NPBL sugere que o aumento da osmolaridade plasmática estimula fracamente a ingestão de água nesses animais. A moxonidina não alterou a ingestão de água quando o sódio não estava disponível durante o teste, sugerindo que a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL modula especificamente a ingestão de sódio.

Já foi anteriormente demonstrado o papel inibitório que a serotonina (5-HT) e a colecistocinina (CCK) têm no NPBL no controle da ingestão de água e sódio (MENANI &

JOHNSON, 1995; MENANI et al., 1996; MENANI & JOHNSON, 1998; MENANI et al., 1998b; DE GOBBI et al., 2000; MENANI J V et al., 2000; DE GOBBI et al., 2001). Nesses estudos, injeções bilaterais de metisergida ou proglumide (antagonistas de 5-HT e CCK, respectivamente) aumentaram a ingestão de sódio, e em alguns casos também a ingestão de água, induzida por diferentes protocolos como, por exemplo, FURO + CAP sc, ANG icv ou injetada no órgão subfornical, 24 horas de depleção de sódio, privação hídrica de 24 horas e tratamento com DOCA (desoxicorticosterona) sc, (MENANI & JOHNSON, 1995; MENANI et al., 1996; MENANI & JOHNSON, 1998; MENANI et al., 1998b; DE GOBBI et al., 2000; MENANI J V et al., 2000; DE GOBBI et al., 2001). Diferentemente da metisergida e proglumide, que aumentam a ingestão de NaCl apenas quando injetadas bilateralmente no NPBL, injeções unilaterais de moxonidina no NPBL produzem um aumento menos intenso (comparado às injeções bilaterais), porém significativo na ingestão de sódio induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc (ingestão total de NaCl 2,5 vezes maior do que os valores controles). Além disso, enquanto a ingestão de sódio induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc foi cerca de 8 a 10 vezes maior do que o controle em ratos tratados com moxonidina bilateralmente no NPBL, a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos com injeções bilaterais de metisergida e proglumide no NPBL foi de apenas 4 a 5 vezes maior que a ingestão controle (MENANI et al., 1996; MENANI & JOHNSON, 1998; DE GOBBI et al., 2001). Portanto, a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL produz um efeito mais forte sobre a ingestão de sódio do que o bloqueio dos mecanismos serotoninérgicos e colecistocinérgicos no NPBL, e essa diferença pode explicar porque apenas a moxonidina injetada unilateralmente no NPBL aumenta a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por FURO + CAP sc.

Apesar do grande efeito sobre a ingestão de sódio induzida pelo tratamento com FURO + CAP, a moxonidina, assim como a metisergida e proglumide (MENANI et al., 1996; MENANI & JOHNSON, 1998), não modificaram a ingestão de sódio ou de água quando

injetadas bilateralmente no NPBL de ratos saciados, não tratados com FURO + CAP. Diferente da ingestão de água, a ingestão de NaCl hipertônico requer várias horas para ser induzida por tratamentos como depleção de sódio por 24 horas ou polietilenoglicol sc (STRICKER & VERBALIS, 1990). Agudamente, apenas um pequeno aumento da ingestão de sódio é produzido por tratamentos como ANG II central ou furosemida sc (MENANI et al., 1996; MENANI J V et al., 2000). Os resultados com moxonidina no NPBL e os resultados prévios com o bloqueio dos mecanismos inibitórios serotoninérgico e colecistocinérgico do NPBL (MENANI & JOHNSON, 1998; MENANI J V et al., 2000) sugerem que a ingestão de NaCl é extremamente facilitada se a ativação de mecanismos excitatórios ocorrerem simultaneamente com a desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL. Em outras palavras, uma ingestão de NaCl significativa depende da combinação de dois fatores: a presença de um estímulo dipsogênico/natriorexigênico e a desativação de mecanismos inibitórios. Na presença de apenas um fator a ingestão de NaCl é pequena ou inexistente.

A rápida indução da ingestão de água e de NaCl pelo tratamento com FURO + CAP sc resulta da associação de uma hipotensão branda (-5 mmHg, nos ratos testados nesse estudo) e uma menor ativação dos receptores de volume, assim como um aumento da formação de ANG II central (FITTS & MASSON, 1989; THUNHORST & JOHNSON, 1994). Este tratamento também induz a expressão de c-fos na lamina terminal e núcleos hipotalâmicos relacionados com a regulação da sede, apetite ao sódio e o balanço hidromineral, (THUNHORST et al., 1998). A ativação neuronal no OSF e OVLT pela ANG II é considerada o primeiro passo nos circuitos que desencadeiam a sede e o apetite ao sódio, (OLDFIELD & MCKINLEY, 1995; JOHNSON & THUNHORST, 1997; MCKINLEY et al., 2001). Se após injeções de moxonidina no NPBL aumentasse o número de células ativadas pelo tratamento com FURO + CAP sc em áreas prosencefálicas, seria possível explicar o aumento na ingestão de água e de NaCl induzido pela moxonidina no NPBL nessa condição.

Contudo, os resultados do presente estudo mostraram que a expressão de c-fos induzida com FURO + CAP no OSF, MnPO dorsal, PVN e SON não foram alteradas pela moxonidina no NPBL.

Genes de expressão imediata, como c-Fos, estão relacionados com ativação neuronal, mas há limitações da técnica que dificultam a interpretação dos resultados, (HERBERT, 1996). Primeiro, é possível se verificar o número de células ativadas, mas nenhuma variação na intensidade ou frequência na qual cada uma é ativada. Segundo, há muitas situações nas quais a expressão de genes imediatos não acompanha os efeitos fisiológicos e comportamentais como os produzidos pela ANG II. Com essas restrições em mente, os resultados sugerem que o tratamento com FURO + CAP e a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL não compartilham a ativação de c-Fos e que esta ativação parece não estar envolvida com o aumento de NaCl hipertônico produzido pela moxonidina injetada no NPBL. Tal fato é reforçado pela falha na indução da expressão de c-Fos em ratos apenas com moxonidina, sem o tratamento com FURO + CAP. Por outro lado, devemos lembrar que os efeitos da moxonidina na expressão de c-fos induzida por FURO + CAP foram testados na ausência da ingestão de água e de sódio que poderiam ativar sinais inibitórios aferentes dos receptores de sabor, receptores de volume e/ou osmorreceptores limitando assim a ingestão. Portanto, qualquer mudança na expressão de c-fos em áreas prosencefálicas produzida pela ingestão de água e/ou sódio sozinho ou em combinação com ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL poderia não ser detectada no estudo realizado. Mais estudos serão necessários para determinar se a moxonidina no NPBL bloqueando as aferências inibitórias vindas da periferia (ativadas pela ingestão) permitiria uma elevada e mantida expressão de c-fos nas áreas prosencefálicas por um período de tempo maior, no qual poderia resultar em uma ingestão elevada.

Apesar de seu efeito anti-hipertensivo atribuído a uma redução da atividade simpática produzida pela ação central em receptores imidazólicos do bulbo ventrolateral rostral (ERNSBERGER et al., 1993; HAXHIU et al., 1994; ERNSBERGER et al., 1997), a moxonidina injetada no NPBL também não alterou a PAM e FC tanto em ratos tratados com FURO + CAP como nos animais controles. Portanto, o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M durante o tratamento com FURO + CAP não resulta de variações na pressão arterial.

A falta de efeitos sobre a ingestão de sacarose 0,06 M após injeções bilaterais de moxonidina no NPBL sugere que o aumento da ingestão de NaCl 0,3 M e água após a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL não é devido a uma facilitação não específica de todos os comportamentos de ingestão. Nesse estudo, porém, a ingestão de sacarose foi espontânea, sem a necessidade de protocolo experimental para induzir tal ingestão. Como a moxonidina não induz a ingestão de água e de sódio em animais saciados, achamos interessante investigar os efeitos da moxonidina no NPBL sobre outro padrão de ingestão. Assim sendo, foi testado então o efeito da moxonidina sobre a ingestão de alimento induzida por privação de alimento, e também a ingestão de água e NaCl associadas a ingestão de alimento. Surpreendentemente, verificamos que a moxonidina promoveu um aumento da ingestão de NaCl 0,3 M associada a ingestão de alimento, sem modificar a ingestão de água ou a ingestão de alimento. Realizando o mesmo experimento na ausência de alimento, verificamos que quando não há ingestão de alimento também não se observa o aumento da ingestão de sódio após as injeções bilaterais de moxonidina no NPBL. Esse fato sugere que o estímulo para a ingestão de sódio não seria a privação alimentar, mas sim estímulos gerados após a ingestão de alimento, possivelmente o aumento da osmolaridade plasmática. A ingestão de alimento seco aumenta a osmolaridade plasmática no rato cerca de 2 – 3% em minutos (STARBUCK & FITTS, 2001), e um aumento dessa magnitude promove a ingestão de água. Lembrando que a moxonidina não altera a ingestão de sódio em animais saciados,

esses resultados corroboram com o fato de que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL atuando especificamente sobre a ingestão de sódio não é suficiente para induzir por si só a ingestão de sódio, havendo a necessidade da ativação simultânea de mecanismos excitatórios para a ingestão de sódio e/ou de água.

Os receptores adrenérgicos α_2 são encontrados no sistema nervoso central e periférico, e têm localização tanto pré- quanto pós-sináptica, (FRENCH, 1995). No SNC, esses receptores têm importante papel na regulação da liberação de neurotransmissores através de autorreceptores localizados em terminais nervosos noradrenérgicos e de heteroreceptores localizados em outros tipos de neurônios, como a serotonina. A presença de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL foi demonstrada por estudos utilizando técnicas de imunorreatividade e radioligantes, (HERBERT & FLUGGE, 1995; TALLEY et al., 1996). A maioria dos receptores adrenérgicos α_2 estão localizados na região externa do NPBL e na região “waist” do núcleo parabraquial, (HERBERT & FLUGGE, 1995). O NPBL recebe muitas fibras vindas da AP/NTSm, (NORGREN, 1981; SHAPIRO & MISELIS, 1985) e neurônios serotoninérgicos, adrenérgicos e noradrenérgicos estão presentes nessas projeções da AP/NTSm para o NPBL, (LANÇA & VAN DER KOOY, 1985; MICELI et al., 1987; HERBERT & FLUGGE, 1995; TALLEY et al., 1996). Injeções de ioimbina (antagonista adrenérgico α_2) no NPBL resultou em uma inibição de 77% da atividade espontânea visceral de neurônios talâmicos (SALEH & CECHETTO, 1994), sugerindo que os receptores adrenérgicos α_2 no NPBL poderiam modular a informação sensorial visceral que ascende da AP/NTSm para áreas prosencefálicas envolvidas com o controle visceral. Os presentes resultados sugerem que projeções semelhantes para o NPBL envolvendo os receptores adrenérgicos α_2 podem ser ativadas para controlar a ingestão de NaCl.

Considerando os resultados anteriores mostrando a inibição da ingestão de água e sódio pelas injeções em áreas prosencefálicas e os presentes resultados mostrando o aumento

da ingestão de água e de sódio pelas injeções no NPBL, podemos concluir que os receptores adrenérgicos α_2 têm papéis opostos no controle da ingestão de sódio e água, de acordo com sua distribuição no cérebro. O papel facilitatório dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL constitui um mecanismo adicional que pode contribuir para promover a sede e apetite ao sódio em animais desidratados.

5.2 - Ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL e desidratação intracelular

Em ratos previamente tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, as injeções bilaterais de moxonidina no NPBL induziram uma forte ingestão de NaCl 0,3 M, sem alterar a ingestão de água no teste com as duas substâncias disponíveis. A ingestão de NaCl hipertônico ocorreu apesar da hiperosmolaridade, hipernatremia, redução da atividade de renina plasmática e da normovolemia presentes nos ratos que recebem a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M (PEREIRA et al., 2002).

As injeções do antagonista de receptores adrenérgicos α_2 RX 821002 no NPBL nas doses utilizadas quase aboliram os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de NaCl 0,3 M. As injeções de moxonidina fora do NPBL não modificaram a ingestão de NaCl ou de água. Além disso, vale lembrar que as injeções de moxonidina em animais saciados não altera a ingestão de água e de NaCl. Portanto, a ativação de receptores adrenérgicos α_2 pelas injeções de moxonidina especificamente no NPBL estimula a ingestão de NaCl hipertônico em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M.

O apetite ao NaCl é fortemente inibido pela desidratação celular (FITZSIMONS & WIRTH, 1976; BLACKBURN et al., 1995) ao mesmo tempo que sinais dos osmorreceptores ativam os circuitos cerebrais que desencadeiam a sede (FITZSIMONS, 1985). Porém, como indicado pelos presentes resultados, os ratos com desidratação celular podem também ingerir NaCl hipertônico além da água quando os receptores adrenérgicos α_2 do NPBL são ativados.

Esses resultados confirmam que a hiperosmolaridade plasmática ou a desidratação celular em animais normovolêmicos não é apenas um estímulo para a ingestão de água, mas também um estímulo para a ingestão de NaCl. Em um estudo anterior (DE LUCA JR et al., 2003), foi demonstrado que o bloqueio serotoninérgico com injeções de metisergida no NPBL também induzia ingestão de NaCl 0,3 M em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. Portanto, a serotonina não é o único mediador no NPBL que controla a ingestão de NaCl hipertônico durante a desidratação celular (DE LUCA JR et al., 2003), tendo os receptores adrenérgicos α_2 um papel oposto ao da serotonina. A ativação dos receptores adrenérgicos α_2 pode reduzir a inibição e, em combinação com o forte estímulo excitatório produzido pela desidratação celular, permitir a ingestão de NaCl hipertônico.

É importante ressaltar que a ingestão de NaCl 0,3 M produzida pela moxonidina nos animais desidratados é cerca de 6 mEq de sódio em 2 h, o que é 10 vezes mais do que a ingestão dos animais controles tratados com veículo no NPBL (0,6 mEq em 2 h). Alguns ratos ingeriram até mais (um rato ingeriu 15 mEq e 5 ratos ingeriram 9 mEq de sódio em 2 h), o que é uma quantidade de sódio maior do que um rato com depleção de sódio, induzida pela clássica combinação de injeção de furosemida acompanhada por uma dieta deficiente de sódio por 24 h, ingere no mesmo período de tempo no teste de apetite ao sódio (MENANI et al., 1998b; SUGAWARA et al., 1999; DE OLIVEIRA et al., 2003). A comparação é ainda mais dramática quando lembramos que um rato com depleção de sódio apresenta a ativação de todos os mecanismos facilitatórios importantes que induzem o apetite ao sódio (angiotensina II, aldosterona, desativação dos receptores de volume), (DE LUCA JR et al., 1992; FITZSIMONS, 1998), uma situação bem diferente daquela de um rato que recebe uma sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico e que obviamente não necessita de mais sódio.

No modelo de privação hídrica, ocorre desidratação absoluta, ou seja, desidratação intracelular e extracelular. Nessa situação, a moxonidina injetada bilateralmente no NPBL

também aumenta a ingestão de sódio hipertônico, sem alterar a ingestão de água. Note que a quantidade de NaCl 0,3 M ingerida após as injeções de moxonidina no NPBL pelos ratos privados de água é semelhante àquela ingerida durante a desidratação intra (após a sobrecarga de NaCl 2 M) ou extracelular (após o tratamento com FURO + CAP sc) separadamente. Lembrando que a moxonidina injetada no NPBL não modifica a ingestão de sódio em ratos saciados, os resultados sugerem que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL promove a ingestão de sódio hipertônico independente do tipo do estímulo presente para a ingestão de água e/ou sódio.

Os resultados mostrando a ingestão de NaCl hipertônico por ratos tratados com metisergida no NPBL e doses dipsogênicas do agonista colinérgico carbacol icv também sugerem que a hiperosmolaridade pode estimular a ingestão de sódio (MENANI J V et al., 2002). A sede induzida pela injeção icv de carbacol seria consequência da ativação de circuitos prosencefálicos relacionados à desidratação celular, (FITTS & SIMPSON, 1986) e, além de induzir a ingestão de água, o carbacol inibiria a ingestão de sódio (FITTS et al., 1985; FITTS & SIMPSON, 1986). Portanto, o efeito da combinação de carbacol icv com metisergida no NPBL sugere que a desidratação celular também ativa os mecanismos centrais que estimulam também a ingestão de sódio, além da ingestão de água.

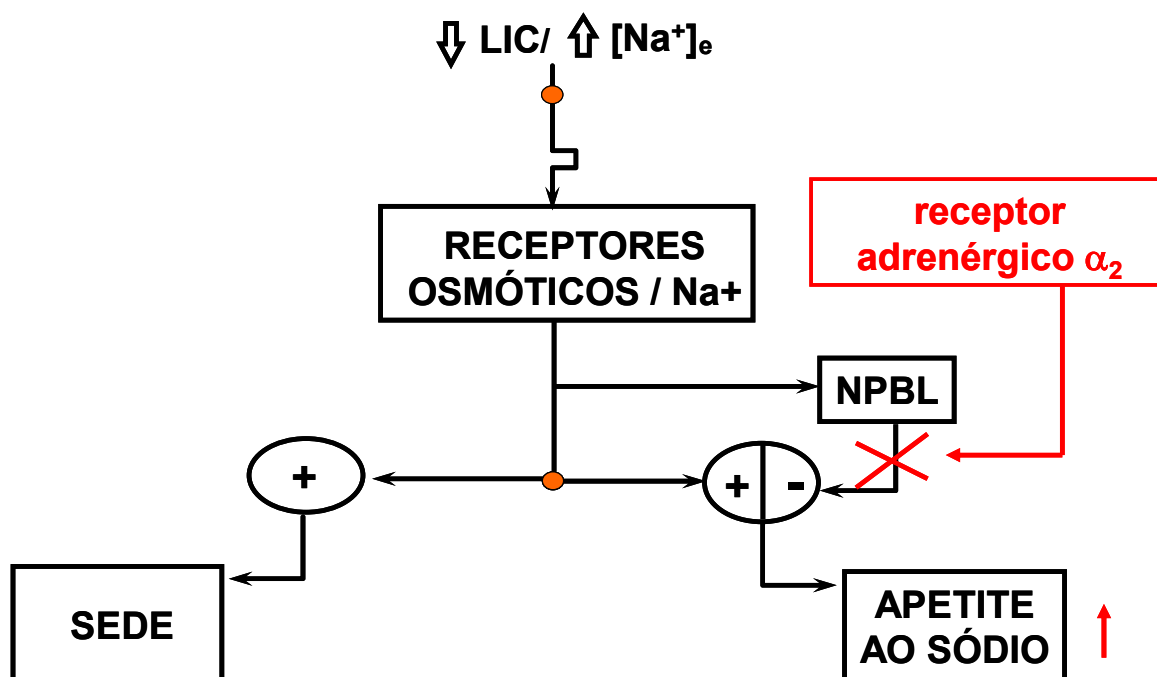
O NPBL está conectado reciprocamente as áreas prosencefálicas que controlam a ingestão de líquidos e o equilíbrio hidroeletrólítico, tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo, o núcleo central da amígdala e o núcleo pré-óptico mediano, e também as regiões bulbares, tais como a AP/NTSm que recebem informações viscerais e informações de sabor, (NORGREN, 1981; FULWILER & SAPER, 1984; CIRIELLO et al., 1984; LANÇA & VAN DER KOOY, 1985; SHAPIRO & MISELIS, 1985; HERBERT et al., 1990; JHAMANDAS et al., 1992; KRUKOFF et al., 1993; SPECTOR, 1995; JHAMANDAS et al., 1996). As células do NPBL são ativadas após a ingestão de soluções de sódio em ratos desidratados

(YAMAMOTO et al., 1993; FRANCHINI & VIVAS, 1999), e também em ratos que receberam sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico (KOBASHI et al., 1993) sugerindo que as células do NPBL poderiam ser ativadas por sinais viscerais ou talvez sinais de sabor. Assim, as aferências osmóticas viscerais e as informações do sabor de sódio vindas da AP/NTS que chegam ao NPBL são processadas e integradas, de onde partem para possivelmente inibir os circuitos neurais que desencadeiam o apetite ao sódio.

As informações ascendentes dos osmorreceptores poderiam ativar os circuitos que desencadeiam a ingestão de sódio paralelamente a sede, mas um mecanismo dependente do NPBL poderia simultaneamente inibir esses circuitos e, portanto restringir a ingestão de sódio, pelo menos a de sódio hipertônico, prevenindo assim o agravamento da desidratação celular. Essas conclusões apresentam um paralelo importante com os estudos prévios que mostraram a participação do peptídeo natriurético atrial (ANP) e da ocitocina (OT) nos mecanismos inibitórios para a ingestão de sódio (BLACKBURN et al., 1992; BLACKBURN et al., 1995). Nesses estudos, os ratos foram tratados centralmente com a cadeia A da citocina ricina conjugada a OT (rAOT) ou ao ANP (rAANP) para inativar seletivamente as células que apresentavam esses respectivos receptores. Nos animais hipovolêmicos, o manitol hipertônico sistêmico inibiu a ingestão de NaCl hipertônico nos ratos controles, mas aumentou a ingestão nos animais tratados com rAOT e rAANP, enquanto que o NaCl hipertônico sistêmico aumentou a ingestão de NaCl hipertônico nos ratos tratados com rAANP. Os ratos hiponatrêmicos que receberam apenas o manitol hipertônico sistemicamente também ingeriram NaCl hipertônico além da ingestão de água quando eles receberam injeções icv do antagonista de OT. Os autores propuseram que soluções hiperosmóticas e hipernatrêmicas podem ter dois efeitos opostos sobre a ingestão de sódio: inibição e estimulação. Geralmente a inibição é o efeito predominante, enquanto a estimulação é apenas observada quando os mecanismos inibitórios são desativados (BLACKBURN et al., 1995).

A ausência de efeitos de metisergida, proglumide ou moxonidina no NPBL em animais saciados e normohidratados sugerem que apenas a desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL não é suficiente para induzir a ingestão de sódio ou de água. Portanto, a ingestão de NaCl (e eventualmente de água) é fortemente facilitada se mecanismos natriorexigênicos ou dipsogênicos excitatórios forem ativados simultaneamente com a desativação dos mecanismos inibitórios do NPBL (MENANI et al., 1996; COLOMBARI et al., 1996; MENANI et al., 1998a; MENANI et al., 1998b; MENANI J V et al., 2000).

De acordo com os presentes resultados, o aumento da osmolaridade plasmática pode ser também um estímulo excitatório para a ingestão de sódio, sugerindo que os circuitos cerebrais que controlam o apetite ao sódio, como aqueles que desencadeiam a sede, são ativados não apenas pela desidratação extracelular, mas também pela desidratação intracelular. Portanto, a ativação desse comportamento depende da modulação exercida pelos mecanismos envolvendo o NPBL que inibe fortemente o apetite ao sódio. A ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL desativa o mecanismo inibitório e permite esse comportamento se a osmolaridade estiver elevada (Figura 33).



Adaptado de De Luca Jr. et al. , 2003.

Figura 33: Diagrama representando o envolvimento do NPBL no controle da sede e apetite ao sódio durante a desidratação celular. Os osmorreceptores ou receptores de sódio ativam circuitos que desencadeiam a sede e o apetite ao sódio, e um circuito paralelo inibitório para o apetite ao sódio envolve o NPBL. A ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL remove a inibição, permitindo a ingestão de sódio e água. Líquido intracelular, LIC; concentração extracelular de sódio, $[Na^+]_e$. Adaptado de De Luca Jr et al., 2003.

5.3 - Interação entre os mecanismos adrenérgico α_2 e os mecanismos serotoninérgico, GABAérgico e opioidérgico do NPBL

Já foi demonstrado que injeções o agonista de receptores serotoninérgicos 5HT_{2A/2C} hidrocloreto de dimetoxi-4-iodoanfetamina (DOI) bilateralmente no NPBL inibem, enquanto as injeções de metisergida (antagonista de receptores serotoninérgicos) no NPBL aumentam a ingestão de sódio e de água, sugerindo a existência de um importante mecanismo serotoninérgico inibitório controlando a ingestão de NaCl 0,3 M e água, (MENANI et al., 1996). Recentes resultados mostraram que ativação de receptores GABA_A no NPBL induz ingestão de NaCl 0,3 M em ratos saciados (CALLERA et al., 2005). Foi verificado também que injeções do agonista opióide β -endorfina no NPBL induzem ingestão de NaCl 0,3 M em ratos saciados, sendo que o pré-tratamento com o antagonista opióide naloxona abole esse efeito, (OLIVEIRA et al., 2005).

A ativação dos receptores adrenérgicos α_2 no NPBL aboliu completamente a inibição da ingestão de água e NaCl 0,3 M produzida pela ativação do mecanismo serotoninérgico com DOI no NPBL. Por outro lado, o bloqueio dos receptores adrenérgicos α_2 no NPBL não altera os efeitos do bloqueio do mecanismo serotoninérgico da mesma área. Portanto, a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL inibe os efeitos da ativação do mecanismo serotoninérgico do NPBL, ou seja, o mecanismo inibitório ativado pela serotonina no NPBL é desativado pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 nessa mesma área. Uma possibilidade é que os receptores adrenérgicos α_2 e os receptores serotoninérgicos tenham localização pós-sináptica nos mesmos neurônios no NPBL, cada um produzindo efeitos opostos na atividade desses neurônios. Por outro lado não é possível excluir que os receptores serotoninérgicos e os receptores adrenérgicos α_2 estejam localizados em diferentes neurônios, mas nesse caso os neurônios com os receptores adrenérgicos α_2 devem estar distais aos neurônios que apresentam os receptores serotoninérgicos.

Os presentes resultados também mostram que a prévia injeção de bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) reduziu parcialmente e aboliu, respectivamente, os efeitos da moxonidina sobre a ingestão de sódio e água induzida por FURO + CAP. Por outro lado, injeções prévias de saclofen (antagonista de receptores GABA_B) não modificaram os efeitos da moxonidina, sugerindo que esse subtipo de receptor GABAérgico não participa nesse mecanismo. Outro resultado interessante mostrou que o aumento na ingestão de NaCl 0,3 M produzido pelas injeções bilaterais de moxonidina no NPBL foi parcialmente reduzido pelo pré-tratamento com naloxona (antagonista opióide) no NPBL. Assim, esses resultados sugerem que o aumento na ingestão de NaCl 0,3 M e água produzido pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL é parcialmente dependente de mecanismos GABAérgicos (receptores GABA_A) e de mecanismos opioidérgicos desta área.

O bloqueio dos receptores adrenérgicos α_2 pelas injeções de RX 821002 no NPBL não altera a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida por FURO + CAP. Isso sugere que a ativação do mecanismo adrenérgico α_2 no NPBL não é necessária para a ingestão de líquidos nessa situação mas, dada a força desse mecanismo, este é possivelmente recrutado para atenuar o mecanismo serotoninérgico e produzir intenso apetite ao sódio em uma situação mais crítica.

Recente estudo mostrou que aproximadamente 20% dos neurônios do NTS que se projeta para o NPBL contém catecolaminas (HERMES et al., 2006). Já foi anteriormente demonstrado que essa população de projeções neuronais também contém uma grande variedade de neuropeptídeos (MILNER et al., 1984; MANTYH & HUNT, 1984; HERBERT et al., 1990). Essa heterogeneidade de mediadores químicos das projeções ascendentes do NTS para o NPBL e a ausência de um único neurotransmissor sugere uma grande variedade de aferências e um papel integrativo para esse núcleo. Assim sendo, o NPBL desempenha um papel importante no controle da ingestão de sódio e a serotonina é um dos principais neurotransmissores dessa área envolvidos na inibição da ingestão de sódio, (MENANI et al.,

1996; MENANI et al., 1998a; MENANI et al., 1998b; DE GOBBI et al., 2000; MENANI J V et al., 2000). Embora ainda de modo não completamente esclarecido, parece que a moxonidina agindo no NPBL poderia bloquear o mecanismo serotoninérgico inibitório do NPBL, permitindo assim a ingestão de NaCl hipertônico.

O GABA é um neurotransmissor inibitório amplamente distribuído no SNC, (CHRISTIE & NORTH, 1988; ARAKI et al., 1992). Os receptores adrenérgicos α_2 fazem parte da grande família de receptores acoplados à proteína G_i/G_o , negativamente acoplados a adenilato ciclase, e medeiam seus efeitos inibitórios através da inibição da produção de AMP cíclico, (BYLUND, 1995). Segundo Goodman e Gilman (1996) a ativação de receptores opióides parece exercer uma inibição modulatória na transmissão sináptica no sistema nervoso central, sendo que a ativação de receptores mu e delta podem promover hiperpolarização de membrana por ativar canais de potássio ou podem inibir a adenil ciclase, por outro lado, ativação dos receptores kappa parece influenciar os canais de cálcio e promove uma inibição dependente de voltagem. A β endorfina (derivada do pro-opiomelanocortina) pode se ligar tanto em receptores do tipo mu quanto delta, isto tanto periférica quanto centralmente.

Em suma, verificamos que os mecanismos adrenérgicos interagem com os serotoninérgicos, GABAérgicos e opioidérgicos do NPBL para o controle da ingestão de sódio e água. A compreensão detalhada de como ocorre a interação entre esses diferentes mecanismos presentes no NPBL envolvidos no controle da ingestão de sódio ainda é objeto de estudo. Considerando que o bloqueio GABAérgico ou opioidérgico reduz parcialmente os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 , podemos sugerir que, além de uma inibição direta exercida pelos receptores adrenérgicos α_2 sobre o mecanismo inibitório do NPBL, é possível que ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL promova a liberação de GABA e opióides, possivelmente através de uma via contendo um interneurônio inibitório. Por sua

vez, o GABA e o opióide liberados agem em receptores GABA_A e μ , respectivamente, também a inibindo o mecanismo inibitório. Por outro lado, a serotonina e a CCK liberadas no NPBL inibem tonicamente a ingestão de sódio e água, por ativarem o mecanismo inibitório para esse comportamento. A figura 34 mostra um diagrama esquemático da hipótese da interação entre os mecanismos adrenérgico, serotoninérgico, GABAérgico e opioidérgico presentes no NPBL.

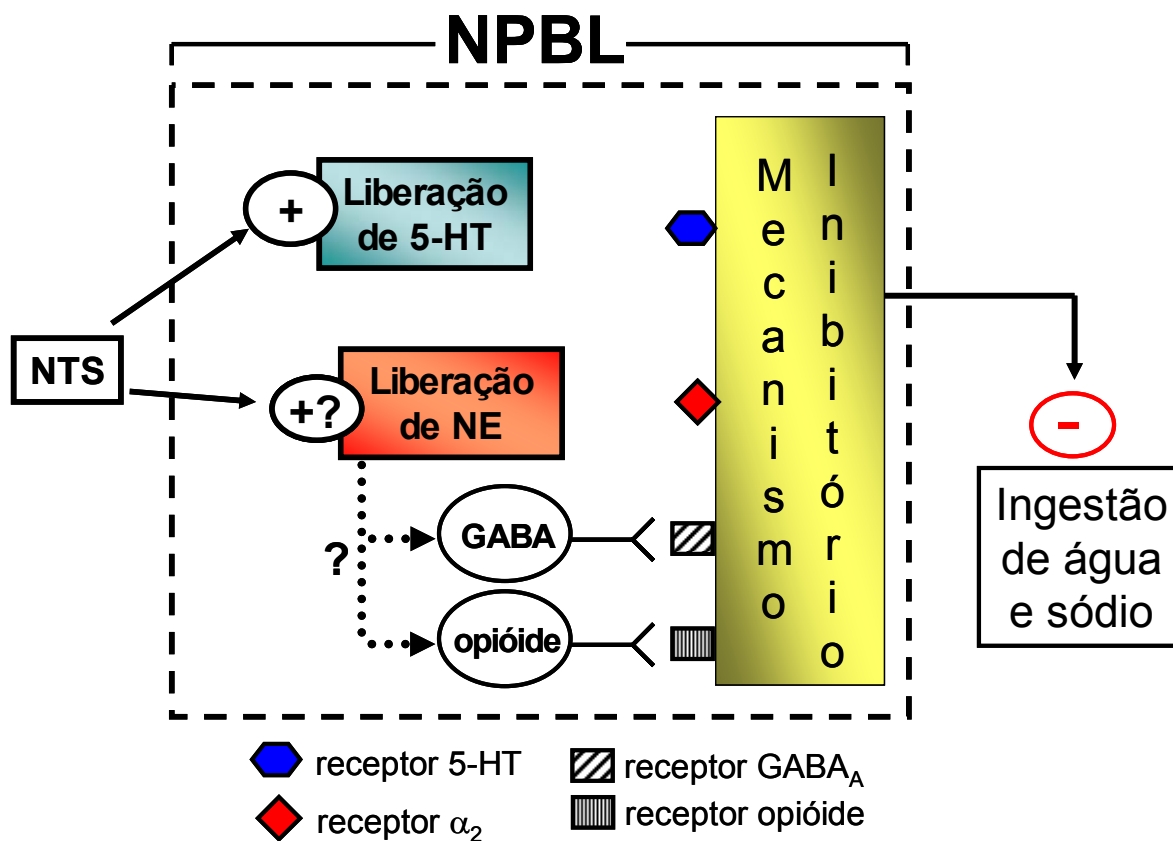


Figura 34: Modelo esquemático mostrando o mecanismo serotoninérgico inibitório do NPBL para o controle da ingestão de água e sódio e a possível interação com os mecanismos adrenérgicos α_2 , GABAérgicos e opioidérgicos presentes nessa área. A ativação dos receptores adrenérgicos α_2 pode inibir diretamente o mecanismo inibitório ou promover uma ativação GABAérgica e opioidérgica. Serotonina, 5-HT; noradrenalina, NE.

5.4 - Efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 e do bloqueio serotoninérgico no teste de reação ao sabor do NaCl hipertônico

Os presentes resultados mostram que as injeções de metisergida no NPBL aumentaram a resposta hedônica a infusão intra-oral de NaCl 0,3 M, sem alterar as respostas neutras e aversivas no teste de reação ao sabor, enquanto a moxonidina injetada no NPBL não modificou nenhum dos parâmetros analisados.

Um estudo anterior envolvendo essa técnica de reação ao sabor avaliou os efeitos das injeções bilaterais de benzodiazepínicos no NPBL sobre a ingestão de alimento e a palatabilidade (SÖDERPALM & BERRIDGE, 2000). Considerando que os benzodiazepínicos induzem ingestão de alimento e aumentam a resposta hedônica ao sabor quando injetados no tronco cerebral (quarto ventrículo), esses autores utilizaram a técnica de reação ao sabor para medir as reações hedônicas e aversivas desencadeadas pela infusão intra-oral de soluções doce e amarga (sacarose 7% e quinina 0,01%) após injeções bilaterais de midazolam (benzodiazepínico) no NPBL. Midazolam aumentou a ingestão alimentar e seletivamente aumentou as respostas hedônicas ao sabor quando injetado no NPBL, sugerindo que essa área pode mediar o impacto hedônico ao sabor assim como o aumento do comportamento de ingestão de alimento induzido pelos benzodiazepínicos, (SÖDERPALM & BERRIDGE, 2000).

Em relação ao teste de reação ao sabor do NaCl, estudos prévios foram realizados em ratos depletados de sódio (GRILL & BERNSTEIN, 1988; SORGE et al., 2002). Ratos pré-tratados com furosemida 21 horas antes da infusão intra-oral de NaCl 0,12 M mostraram um aumento das respostas hedônicas quando comparados aos animais que receberam salina, (SORGE et al., 2002). O aumento da palatabilidade pela furosemida ao NaCl já tinha sido reportada por outros estudos usando o teste de reação ao sabor, (GRILL & BERNSTEIN, 1988) ou ingestão (JALOWIEC, 1974; ROWLAND & FREGLY, 1988). Grill e Bernstein,

1988 desenvolvendo testes de reação ao sabor mostraram que durante a deficiência de sódio as linhagens de ratos F-344 e Wistar mudaram o perfil de respostas motoras orais ao sódio, e que não houve diferença na quantificação das respostas hedônicas e aversivas entre as linhagens durante a deficiência de sódio.

O presente estudo foi o primeiro a avaliar a reação ao sabor do NaCl em animais desidratados. Os resultados mostram que injeções metisergida no NPBL aumentam as respostas hedônicas ao sódio hipertônico infundido diretamente na cavidade oral do rato submetido a uma prévia sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico. Isso sugere que o bloqueio de receptores serotoninérgicos do NPBL promove um aumento da palatabilidade ao sódio hipertônico, em animais desidratados. Considerando que esses animais foram submetidos a uma desidratação celular, era de se esperar um padrão aversivo mais acentuado nos animais tratados com veículo no NPBL. É importante ressaltar que a infusão intra-oral de solução de sódio hipertônico foi feita a uma fração constante de 0,5 ml/min, ao passo que a técnica originalmente descreve 1 ml/min. Esse fato poderia explicar um reduzido número de respostas aversivas em comparação ao de respostas hedônicas. Outro fator a ser considerado é o modo de quantificação dos comportamentos: as respostas foram quantificadas de maneira contínua, enquanto que a técnica original considera os comportamentos rítmicos, tais como protusões da língua e lambidas das patas, como apenas um evento caso persista por um intervalo mínimo de 5 segundos. Além dos fatores já mencionados, vale lembrar que o erro padrão da média das respostas obtidas é grande em todos os tratamentos realizados. Um maior número de animais talvez ajudasse a evidenciar melhor o efeito da metisergida e até mesmo confirmar ou excluir a tendência de aumento das respostas hedônicas pela moxonidina.

Os presentes resultados corroboram com os resultados anteriores mostrando o aumento da ingestão de NaCl hipertônico após injeções de metisergida no NPBL em animais depletados de sódio ou com desidratação celular, (MENANI et al., 1998b; DE LUCA JR et

al., 2003). Por outro lado, o aumento das respostas hedônicas ao sódio hipertônico foi pequeno quando comparado ao aumento da ingestão de sódio em ratos submetidos ao mesmo tratamento. Isso sugere que outros fatores, além da palatabilidade, podem contribuir para o aumento da ingestão de sódio em animais desidratados com bloqueio serotoninérgico do NPBL. De qualquer modo, os presentes resultados mostrando que a metisergida no NPBL altera a percepção ao sabor do sódio hipertônico em animais desidratados sugerem que os receptores serotoninérgicos do NPBL podem exercer efeito inibitório na ingestão de sódio, pelo menos em parte, alterando a palatabilidade ao sódio hipertônico.

6 – CONCLUSÕES

- A ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL promove um potente aumento da ingestão de NaCl hipertônico induzida pelo tratamento com FURO + CAP sc, sem alterações cardiovasculares, da expressão de c-fos em áreas prosencefálicas ou de outros comportamentos de ingestão. Esses resultados são contrários aos efeitos inibitórios anteriormente descritos, ou seja, que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 em áreas prosencefálicas inibe a ingestão de água e NaCl hipertônico. Isso indica papéis opostos para receptores adrenérgicos α_2 na regulação da ingestão de sódio e água de acordo com sua distribuição no cérebro.
- Em ratos previamente tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M, as injeções bilaterais de moxonidina no NPBL induziram uma forte ingestão de NaCl 0,3 M, sem alterar a ingestão de água. Injeções de moxonidina no NPBL não alteram a ingestão de sódio e de água em animais saciados. Esses resultados sugerem que a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 no NPBL bloqueia mecanismos inibitórios, permitindo assim a ingestão de NaCl hipertônico sob condições de hiperosmolaridade. Podemos sugerir que durante a desidratação celular, os circuitos que desencadeiam o apetite ao sódio são ativados, mas ao mesmo tempo fortemente inibidos pelo NPBL.
- Os receptores adrenérgicos α_2 podem interagir com outros mecanismos presentes no NPBL, atenuando o mecanismo serotoninérgico inibitório para controlar a ingestão de sódio hipertônico.
- As injeções de metisergida no NPBL alteram a percepção ao sabor do sódio hipertônico em animais desidratados, sugerindo que os receptores serotoninérgicos do NPBL podem exercer efeito inibitório na ingestão de sódio, pelo menos em parte, alterando a palatabilidade ao sódio hipertônico.

7 – REFERÊNCIAS

ALLEN, A. M., MCKINLEY, M. J., MENDELSON, F. A. O. Comparative neuroanatomy of angiotensin receptor localization in the mammalian hypothalamus. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.**, v. 15, p. 137-145, 1988.

ANDERSSON, B. Regulation of water intake. **Physiol Rev**, v. 58, p. 582-603, 1978.

ANDRADE, C. A. F., OLIVEIRA, L. B., MARTINEZ, G., SILVA, D. C. F., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. Involvement of forebrain imidazoline and α_2 -adrenergic receptors in the antidipsogenic response to moxonidine. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v. 1009, p. 262-264, 2003.

ANTUNES-RODRIGUES, J., DE CASTRO, M., ELIAS, L. L. K., VALENÇA, M. M., MCCANN, S. M. Neuroendocrine Control of Body Fluid Metabolism. **Physiol Rev**, v. 84, p. 169-208, 2004.

ANTUNES-RODRIGUES, J., MCCANN, S. M., ROGERS, L. C., SAMSON, W. K. Atrial natriuretic factor inhibits water intake in conscious rats. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, v. 82, p. 8720-8724, 1985.

ANTUNES-RODRIGUES, J., MCCANN, S. M., SAMSON, W. K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits salt intake in the rat. **Endocrinology**, v. 118, p. 1726-1729, 1986.

ARAKI, T., KIYAMA, H., TOHYAMA, M. The GABAA receptor gamma 1 subunit is expressed by distinct neuronal populations. **Mol Brain Res**, v. 15, n. 1-2, p. 121-132, 1992.

BARBOSA, S. P., DE GOBBI, J. I., ZILIOLI, L., CAMARGO, L. A., SAAD, W. A., RENZI, A. et al. Role of cholinergic and adrenergic pathways of the medial septal area in the water intake and pressor response to central angiotensin II and carbachol in rats. **Brain Res.Bull.**, v. 37, p. 463-466, 1995.

BAXTER, J. D., LEWICKI, J. A., GARDNER, D. G. Atrial Natriuretic peptide. **Biological Technology**, v. 295, p. 529-546, 1988.

BEAUCHAMP, G. K., BERTINO, M., BURKE, D., ENGELMAN, K. Experimental sodium depletion and salt taste in normal human volunteers. **Am.J.Clin.Nutr.**, v. 51, p. 881-889, 1990.

BLACKBURN, R. E., DEMKO, A. D., HOFFMAN, G. E., STRICKER, E. M., VERBALIS, J. G. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 263, p. R1347-R1353, 1992.

BLACKBURN, R. E., SAMSON, W. K., FULTON, R. J., SRICKER, E. M., VERBALIS, J. G. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 269, p. R245-R251, 1995.

BLAIR, M. L., JAWORSKI, R. L., WANT, A., PIEKUT, D. T. Parabrachial nucleus modulates cardiovascular responses to blood loss. **Am J Physiol**, v. 280, p. R1141-R1148, 2001.

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

BOUSQUET, P., FELDMAN, J., TIBIRIÇA, E., BRICCA, G., GRENEY, H., DONTENWILL, M. et al. Imidazoline receptors. A new concept in central regulation of the arterial blood pressure. **Am.J.Hypertens.**, v. 5, p. 47S-50S, 1992.

BOUSQUET, P., GRENEY, H., BRUBAN, V., SCHANN, S., EHRHARDT, J. D., MONASSIER, L. et al. I(1) imidazoline receptors involved in cardiovascular regulation: where are we and where are we going? **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v. 1009, p. 228-233, 2003.

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

BYLUND, D. B. Pharmacological characteristics of alpha-2 adrenergic receptor subtypes. **Ann N Y Acad Sci**, v. 763, p. 1-7, 1995.

CALLERA, J. C., CAMARGO, L. A. A., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V., RENZI, A., SAAD, W. A. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral preoptic area reduce water intake in dehydrated rats. **Pharmacol.Biochem.Behav.**, v. 46, p. 39-43., 1993.

CALLERA, J. C., OLIVEIRA, L. B., BARBOSA, S. P., COLOMBARI, D. S. A., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, p. 725-735, 2005.

CHRISTIE, M. J. & NORTH, R. A. Agonists at mu-opioid, M₂-muscarinic and GABA_B receptors increase the same potassium conductance in rat lateral parabrachial neurones. **Br J Pharmacol**, v. 95, n. 3, p. 896-902, 1988.

CIRIELLO, J., LAWRENCE, D., PITTMAN, Q. J. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. **Brain Res**, v. 322, p. 388-392, 1984.

CLARKE, R. W. & HARRIS, J. RX 821002 as a tool for physiological investigation of alpha(2)-adrenoceptors. **CNS Drug Rev**, v. 8, p. 177-192, 2002.

COLOMBARI, D. S. A., MENANI, J. V., JOHNSON, A. K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **Am.J.Physiol.**, v. 271, n. R1470, p. R14761996.

COVIAN, M. R.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; GENTIL, C. G.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A. A.; SILVA NETO, C. R. Central control of salt balance. In: MOGENSEN, G.J. ; CALARESU, F. R. (Eds.). **Neural Integration of Physiological Mechanisms and Behaviour**. Toronto: University of Toronto Press, 1975. p. 267-282.

DE BOLD, A. J., BOVEINSTEIN, H. B., VERESS, A. T., SONERBERG, H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. **Life Sciences**, v. 28, p. 98-94, 1981.

DE CASTRO E SILVA, E., FREGONEZE, J. B., JOHNSON, A. K. Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. **Am.J.Physiol.**, v. 290, p. R1136-R1141, 2005.

DE GOBBI, J. I. F., DE LUCA JR, L. A., JOHNSON, A. K., MENANI, J. V. Interaction of serotonin and cholecystikinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **Am.J.Physiol.**, v. 280, p. R1301-R1307, 2001.

DE GOBBI, J. I. F., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Research**, v. 880, p. 131-138, 2000.

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

DE LUCA JR, L. A., CAMARGO, L. A., MENANI, J. V., RENZI, A., SAAD, W. A. On a possible dual role for central noradrenaline in the control of hydromineral fluid intake. **Braz J Med Biol Res.**, v. 27, n. 4, p. 905-914, 1994.

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

DE LUCA JR, L. A. & MENANI, J. V. Multifactorial control of water and saline intake: role of α_2 -adrenoceptors. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 30, p. 497-502, 1997.

DE LUCA JR, L. A.; VIVAS, L.; MENANI, J. V. Controle neuroendócrino da ingestão de água e sal. In: ANTUNES-RODRIGUES, J.; MOREIRA, A. C.; ELIAS, L. L. K.; CASTRO, M. (Eds.). **Neuroendocrinologia Básica e Aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap. 10, p. 116-131.

DE OLIVEIRA, L. B., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. Moxonidine and central α_2 adrenergic receptors in sodium intake. **Brain Res.**, v. 993, p. 177-182, 2003.

DE PAULA, P. M., SATO, M. A., MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A. Effects of central α -adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. **Neurosci.Lett.**, v. 214, n. 155, p. 158-1996.

DUFFY, V. B., BARTOSHUK, L. M., S.-M. R., RODIN, J. Taste changes across pregnancy. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v. 855, p. 805-809, 1998.

EDWARDS, G. L. & JOHNSON, A. K. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **Am.J.Physiol.**, v. 261, p. R1039-R1044, 1991.

ERNSBERGER, P., DAMON, T. H., GRAFF, L. M., SCHAFER, S. G., CHRISTEN, M. O. Moxonidine, a centrally acting antihypertensive agent, is selective ligand for I_1 -imidazoline sites. **J.Pharmacol.Exper.Therap.**, v. 264, p. 172-264, 1993.

ERNSBERGER, P., FRIEDMAN, J. E., KOLETSKI, R. J. The I_1 -imidazoline receptor: from binding site to therapeutic target in cardiovascular disease. **Hypertension**, v. 15, p. S9-S23, 1997.

ERNSBERGER, P., GRAVES, M. E., GRAFF, L. M., ZAKIEH, N., NGUYEN, P., COLLINS, L. A. et al. I_1 -imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling. **Ann.N.Y.Acad Sci.**, v. 763, p. 22-42, 1995.

ERNSBERGER, P. & HAXHIU, M. A. The I_1 -imidazoline-binding site is a functional receptor mediating vasodepression via the ventral medulla. **Am.J.Physiol.**, v. 273, p. R1572-R1579, 1997.

EZURE, K. Respiration-related afferents to parabrachial pontine regions. **Respiratory Physiology & Neurobiology**, v. 143, p. 167-175, 2004.

FERRARI, A. C., CAMARGO, L. A. A., SAAD, W. A., RENZI, A., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibit water intake in rats. **Brain Res.**, v. 522, p. 125-130, 1990.

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

FITTS, D. A. & SIMPSON, J. B. Drinking and natriuresis during volume expansion and intracranial angiotensin or carbachol. **Am J Physiol**, v. 251, p. R381-R387, 1986.

FITTS, D. A., THUNHORST, R. L., SIMPSON, J. B. Modulation of salt appetite by lateral ventricular infusions of angiotensin II and carbachol during sodium depletion. **Brain Res**, v. 346, p. 273-280, 1985.

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

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

FITZSIMONS, J. T. ; WIRTH, J. B. The neuroendocrinology of thirst and sodium appetite. In: KAUFMAN, W. ; , K. D. K. (Eds.). **Central nervous control of Na⁺ balance: relations to the renin-angiotensin system**. Stuttgart: George Thieme Publishers, 1976. p. 80-93.

FLYNN, F. W., GRILL, H. J., SCHULKIN, J., NORGREN, R. Central gustatory lesions: II. Effects on sodium appetite, taste aversion learning, and feeding behaviors. **Behav Neurosci**, v. 105, p. 944-954, 1991.

FRANCHINI, L. F. & VIVAS, L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. **Am J Physiol.**, v. 276, n. 4 Pt 2, p. R1180-R1187, 1999.

FRANK, M. E., CONTRERAS, R. J., HETTINGER, T. P. Nerve fibers sensitive to ionic taste stimuli in chorda tympani of the rat. **J Neurophysiol**, v. 50, p. 941-960, 1983.

FREGLY, M. J., KELLEHER, D. L., GREENLEAF, J. E. Antidipsogenic effect of clonidine on angiotensin II-, hypertonic saline-, pilocarpine- and dehydration-induced water intake. **Brain Res.Bull.**, v. 7, n. 661, p. 664-1981.

FREGLY, M. J., ROWLAND, N., GREENLEAF, J. E. A role for presynaptic α_2 -adrenoceptors in angiotensin II-induced drinking in rats. **Brain Res.Bull.**, v. 12, p. 393-398, 1984a.

FREGLY, M. J., ROWLAND, N., GREENLEAF, J. E. Clonidine antagonism of angiotensin-related drinking: a central site of action. **Brain Res.**, v. 298, p. 321-327, 1984b.

FRENCH, N. α_2 -adrenoceptors and I_2 sites in the mammalian central nervous system. **Pharmacol. Ther.**, v. 68, p. 175-208, 1995.

FULWILER, C. E. & SAPER, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res.**, v. 7, n. 229, p. 259-1984.

GALAVARNA, O., DE LUCA JR, L. A., SCHULKIN, J., YAO, S. Z., EPSTEIN, A. K. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res. Bull.**, v. 28, n. 1, p. 89-98, 1991.

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

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

HADE, J. S., MIFFLIN, S. W., DONTA, T. S., FELDER, R. B. Stimulation of parabrachial neurons elicits a sympathetically mediated pressor response in cats. **Am J Physiol**, v. 255, n. 6 Pt 2, p. H1349-H1358., 1988.

HAIBARA, A. S., TAMASHIRO, E., OLIVAN, M. V., BONAGAMBA, L. G., MACHADO, B. H. Involvement of the parabrachial nucleus in the pressor response to chemoreflex activation in awake rats. **Auton Neurosci.**, v. 101, n. 1-2, p. 60-67, 2002.

HAMILTON, R. B. & NORGREN, R. Central projections of gustatory nerves in the rat. **J Comp Neurol**, v. 222, p. 560-577, 1984.

HAXHIU, M. A., DRESHAJ, I., SCHAFFER, S. G., ENSBERGER, P. Selective antihypertensive action of moxonidine is mediated mainly by I_1 -imidazoline receptors in the rostral ventrolateral medulla. **J. Cardiovasc. Pharmacol.**, v. 24, n. 1, p. S1-S8, 1994.

HERBERT, H. Studying the central actions of the angiotensin using the expression of immediate-early genes: expectations and limitations. **Regulatory Peptides**, v. 66, p. 13-18, 1996.

HERBERT, H. & FLUGGE, G. Distribution of α_2 -adrenergic binding sites in the parabrachial complex of the rat. **Anat. Embryol. (Berl)**, v. 192, n. 6, p. 507-516, 1995.

HERBERT, H., MOGA, M. M., SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J Comp Neurol**, v. 293, p. 540-580, 1990.

HERMES, S. M., MITCHELL, J. L., AICHER, S. A. Most neurons in the nucleus tractus solitarius do not send collateral projections to multiple autonomic targets in the rat brain. **Exp Neurol.**, v. 198, n. 2, p. 539-551, 2006.

HIEBLE, J. P. & RUFFOLO JR, R. R. Possible structural and functional relationships between imidazoline receptors and α_2 -adrenoceptors. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**, v. 763, p. 8-21, 1995.

JALOWIEC, J. E. Sodium appetite elicited by furosemide: effects of differential dietary maintenance. **Behav Biol**, v. 10, p. 313-327, 1974.

JHAMANDAS, J. H., HARRIS, K. H., PETROV, T., KRUKOFF, T. L. Characterization of the parabrachial nucleus input to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **J Neuroendocrinology**, v. 4, p. 461-471, 1992.

JHAMANDAS, J. H., PETROV, T., HARRIS, K. H., VU, T., KRUKOFF, T. L. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat. Electrophysiological and anatomical observations. **Brain Res.Bull.**, v. 39, p. 115-126, 1996.

JOHNSON, A. K., CUNNINGHAM, J. T., THUNHORST, R. L. Integrative role of the lamina terminalis in the regulation of cardiovascular and body fluid homeostasis. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 23, p. 183-191, 1996.

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

JOHNSON, A. K. & THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, v. 18, p. 292-353, 1997.

KOBASHI, M., ICHIKAWA, H., SUGIMOTO, T., ADACHI, A. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. **Neurosci Lett**, v. 158, p. 47--50, 1993.

KRUKOFF, T. L., HARRIS, K. H., JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Brain Res.Bull.**, v. 30, p. 163-172, 1993.

LANÇA, A. J. & VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 14, p. 1117-1126, 1985.

LE DOUAREC, J. C., SCHMITT, H., LUCET, B. Influence de la clonidine et des substances alfa-sympathomimetiques sur la prise d'eau chez le rat assoiffé. **J.Pharmacol.(Paris)**, v. 2, p. 435-444, 1971.

LEITE, D. F., CAMARGO, L. A., SAAD, W. A., RENZI, A., FOGLIA, S., DE LUCA JUNIOR, L. A. et al. Role of cholinergic and adrenergic pathways of the medial septal area in the control of water intake and renal excretion in rats. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 42, n. 1, p. 1-8, 1992.

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

LEWIS, S. J., ALLEN, A. M., VERBERNE, A. J. M., FIGDOR, R., JARROT, B., MENDELSON, F. A. O. Angiotensin II receptor binding in the rat nucleus solitarius is reduced after unilateral nodose ganglionectomy or vagotomy. **Eur.J.Pharmacol.**, v. 125, p. 305-307, 1986.

MANTYH, P. W. & HUNT, S. P. Neuropeptides are present in projection neurones at all levels in visceral and taste pathways: from periphery to sensory cortex. **Brain Res.**, v. 299, p. 297-312, 1984.

MARGATHO, L. O., BARBOSA, S. P., DE LUCA JR, L. A., MENANI, J. V. Central serotonergic and adrenergic/imidazoline inhibitory mechanisms on sodium and water intake. **Brain Res.**, v. 956, p. 103-109, 2002.

MCCANN, S. M., FRANCI, C., GUTKOWSKA, J., FAVARETTO, A. L., ANTUNES-RODRIGUES, J. Neural control of atrial natriuretic peptide actions on fluid intake and excretion. **Proc.Soc.Exp.Biol.Med.**, v. 213, p. 117-127, 1996.

MCCANN, S. M., GUTKOWSKA, J., ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Braz.J.Med.Biol.Res.**, v. 36, p. 165-181, 2003.

MCKINLEY, M. J., ALLEN, A. M., CLEVERS, J., PAXINOS, G., MENDELSON, F. A. O. Angiotensin receptor binding in the human hypothalamus: autoradiographic localization. **Brain Res.**, v. 420, n. 2, p. 375-379, 1987.

MCKINLEY, M. J., ALLEN, A. M., MAY, C. N., MCALLEN, R. M., OLDFIELD, B. J., SLY, D. et al. Neural pathways from the lamina terminalis influencing cardiovascular e body fluid homeostasis. **Clin.Exp.Pharmacol.Physiol.**, v. 28, p. 990-992, 2001.

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

MCKINLEY, M. J., MATHAI, M. L., PENNINGTON, G. L., RUNDGREN, M., VIVAS, L. The effect of individual or combined ablation of the nuclear groups of the lamina terminalis on water drinking in sheep. **Am J Physiol**, v. 276, p. R673-R683, 1999.

MENANI J V, BARBOSA S P, DE LUCA JR.L A, DE GOBBI J I F, JOHNSON A K. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. **Am J Physiol**, v. 282, p. R837-R841, 2002.

MENANI J V, DE LUCA JR.L A, THUNHORST R L, JOHNSON A K. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. **Am.J.Physiol.**, v. 279, p. R126-R131, 2000.

MENANI, J. V., COLOMBARI, D. S. A., BELTZ, T. G., THUNHORST, R. L., JOHNSON, A. K. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res.**, v. 801, p. 29-35, 1998a.

MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A., JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am.J.Physiol.**, v. 274, p. R555-R560, 1998b.

MENANI, J. V. & JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am.J.Physiol.**, v. 269, p. R1044-R1049, 1995.

MENANI, J. V. & JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst e salt appetite. **Am J Physiol**, v. 275, p. R1431-R1437, 1998.

MENANI, J. V., SATO, M. A., HAIKEL, L., VIEIRA, A. A., ANDRADE, C. A. F., SILVA, D. C. F. et al. Central moxonidine on water and NaCl intake. **Brain Res.Bull.**, v. 49, p. 273-279, 1999.

MENANI, J. V., THUNHORST, R. L., JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am.J.Physiol.**, v. 270, p. R162-R168, 1996.

MICELI, M. O., POST, C. A., VAN DER KOOY, D. Catecholamine and serotonin colocalization in projection neurons of the area postrema. **Brain Res.**, v. 412, p. 381-385, 1987.

MILNER, T. A., JOH, T. H., MILLER, R. J., PICKEL, V. M. Substance P, neurotensin, enkephalin, and catecholamine-synthesizing enzymes: light microscopic localizations compared with autoradiographic label in solitary efferents to the rat parabrachial region. **J.Comp.Neurol.**, v. 226, p. 434-447, 1984.

MOGENSON, G. J. Electrophysiological studies of the mechanisms that initiate ingestive behaviours with special emphasis on water intake. In: MOGENSON, G.J.C.F.R. **Neural Integration of Physiological Mechanisms and Behaviour**. Toronto: University of Toronto Press, 1975. p. 248-266.

MOREIRA, T. S., TAKAKURA, A. C. T., MENANI, J. V., SATO, M. A., COLOMBARI, E. Central blockade of nitric oxide synthesis reduces moxonidine-induced hypotension. **British J.Pharmacol**, v. 142, p. 765-771, 2004.

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

_____. Gustatory system. In: PAXINOS G. **The rat nervous system**. Australia: Academic Press, 1995. p. 751-771.

NURMINEN, M. L., CULMAN, J., HAASS, M., CHUNG, O., UNGER, T. Effect of moxonidine on blood pressure and sympathetic tone in conscious spontaneously hypertensive rats. **Eur.J.Pharmacol.**, v. 362, p. 61-67, 1998.

OHMAN, L. E. & JOHNSON, A. K. Lesions in the lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. **Am.J.Physiol.**, v. 251, p. R504-R509, 1986.

OHMAN, L. E. & JOHNSON, A. K. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. **Am.J.Physiol.**, v. 256, p. R264-R269, 1989.

OLDFIELD, B. J. ; MCKINLEY, M. J. Circunventricular organs. In: PAXINOS G. **The Rat Nervous System**. San Diego: Academic Press, 1995. p. 391-403.

Oliveira, L. B., De Luca, L. A., Colombari, D. S. A., Colombari, E., & Menani, J. V. (2005). **Opioidergic activation into the lateral parabrachial nucleus induces sodium and water intake**. Program No.991.5 2005 Abstract Viewer/Itinerary Planner. Washington, DC: Society for Neuroscience.

PASTUSKOVAS, C. V. & VIVAS, L. Effect of intravenous captopril on c-fos expression induced by sodium depletion in neurons of the lamina terminalis. **Brain Res.Bull.**, v. 44, p. 233-236, 1997.

PECIÑA, S. & BERRIDGE, K. C. Brainstem mediates diazepam enhancement of palatability of feeding: microinjections into fourth ventricle versus lateral ventricle. **Brain Res.**, v. 727, p. 22-30, 1996.

PECINÃ, S. & BERRIDGE, K. C. Hedonic hot spot in nucleus accumbens shell: where do μ -opioids cause increased hedonic impact of sweetness? **J.Neurosci.**, v. 25, n. 50, p. 11777-11786, 2005.

PENNER, S. B. & SMYTH, D. D. Central and renal I₁-imidazoline preferring receptors: two unique sites mediating natriuresis in the rat. **Cardiovasc.Drug Ther.**, v. 8, p. 43-48, 1994a.

PENNER, S. B. & SMYTH, D. D. Sodium excretion following central administration of an I₁ imidazoline receptor agonist, moxonidine. **Br.J.Pharmacol.**, v. 112, p. 1089-1094, 1994b.

PENNER, S. B. & SMYTH, D. D. Rilmenidine alters renal function when administered intracerebroventricularly or intrarenally. **Ann.New York Acad.Sci.**, v. 763, p. 353-356, 1995.

PEREIRA, D. T. B., VENDRAMINI, R. C., DAVID, R. B., NOZAKI, P. N., MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. **Physiol Behav**, v. 76, p. 501-505, 2002.

REIS, D. J. & PILETZ, J. E. The imidazoline receptor in control of blood pressure by clonidine and allied drugs. **Am.J.Physiol.**, v. 273, p. R1569-R1571, 1997.

ROWLAND, N. E. & FREGLY, M. J. Induction of an appetite for sodium in rats that show no spontaneous preference for sodium chloride solution – the Fischer 344 strain. **Behav Neurosci**, v. 102, p. 961-968, 1988.

RUGGIERO, D. A., REGUNATHAN, S., WANG, H., MILNER, T. A., REIS, D. J. Immunocytochemical localization of an imidazoline receptor protein in the central nervous system. **Brain Res.**, v. 780, p. 270-293, 1998.

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

SALEH, T. M. & CECHETTO, D. F. Neurotransmitters in the parabrachial nucleus mediating visceral input to the thalamus in the rat. **Am.J.Physiol.**, v. 266, p. R1287-R1296, 1994.

SATO, M. A., SUGAWARA, A. M., MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A. Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. **Regul.Pept.**, v. 69, p. 137-142, 1997.

SHAPIRO, R. E. & MISELIS, R. R. The central neural connections of the area postrema of the rat. **J.Comp.Neurol.**, v. 234, p. 344-364, 1985.

SMITH, K. S. & BERRIDGE, K. C. The Ventral Pallidum and Hedonic Reward: Neurochemical Maps of Sucrose "Liking" and Food Intake. **J.Neurosci.**, v. 25, n. 38, p. 8637-8649, 2005.

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

SORGE, R. E., FUDGE, M. A., PARKER, L. A. Effect of sodium deprivation on morphine- and lithium-induced conditioned salt avoidance and taste reactivity. **Psychopharmacology**, v. 160, p. 84-91, 2002.

SPECTOR, A. C. Gustatory function in the parabrachial nuclei: implications from lesion studies in rats. **Rev Neurosc**, v. 6, p. 143-175, 1995.

STARBUCK, E. M. & FITTS, D. A. Influence of the subfornical organ on meal-associated drinking in rats. **Am J Physiol**, v. 280, p. R669-R677, 2001.

STRICKER, E. M. ; VERBALIS, J. G. Sodium appetite. In: STRICKER EM. **Handbook of Behavioral Neurobiology, Vol. 10, Neurobiology of Food and Fluid Intake**. New York: Plenum Press, 1990. p. 387-419.

SUGAWARA, A. M., MIGUEL, T. T., DE OLIVEIRA, L. B., MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A. Noradrenaline and mixed α_2 -adrenoceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. **Brain Res**, v. 839, p. 227-234, 1999.

SUGAWARA, A. M., MIGUEL, T. T., PEREIRA, D. T. B., MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A. Effects of central imidazolinergic and alpha2-adrenergic activation on water intake. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, p. 1185-1190, 2001.

TAKAMATA, A., MACK, G. W., GILLEN, C. M., NADEL, E. R. Sodium appetite, thirst, and body fluid regulation in humans during rehydration without sodium replacement. **Am.J.Physiol.**, v. 266, p. R1493-R1502, 1994.

TALLEY, E. M., ROCIN, D. L., LEE, A., GUYENET, P. G., LYNCH, K. R. Distribution of alpha 2A-adrenergic receptor-like immunoreactivity in the rat central nervous system. **J.Comp.Neurol.**, v. 372, n. 1, p. 111-134, 1996.

TANAKA, J., HAYASHIB, Y., YAMATOA, K., MIYAKUBOA, H., NOMURAC, M. Involvement of serotonergic systems in the lateral parabrachial nucleus in sodium and water intake: a microdialysis study in the rat. **Neuroscience Letters**, n. 357, p. 41-44, 2004.

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

THUNHORST, R. L., XU, Z., CICHA, M. Z., ZARDETTO-SMITH, A. M., JOHNSON, A. K. Fos expression in rat brain during depletion-induced thirst and salt appetite. **Am.J.Physiol.**, v. 274, p. R1807-R1814, 1998.

VERBALIS, J. G., BLACKBURN, R. E., HOFFMAN, G. E., STRICKER, E. M. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. **Adv.Exp.Med.Biol.**, v. 395, p. 209-225, 1995.

VERNEY, E. B. The antidiuretic hormone and the factors which determine its release. **Proc.Royal Soc., London**, v. 135, p. 25-106, 1947.

VIVAS, L., CHIARAVIGLIO, E., CARRER, H. F. Rat organum vasculosum laminae terminalis in vitro: responses to changes in sodium concentration. **Brain Res.**, v. 519, p. 294-300, 1990.

VIVAS, L., PASTUSKOVAS, C. V., TONELLI, L. Sodium depletion induces Fos immunoreactivity in circumventricular organs of the lamina terminalis. **Brain Res.**, v. 679, p. 34-41, 1995.

WARD, D. G. Stimulation of the parabrachial nuclei with monosodium glutamate increases arterial pressure. **Brain Res.**, v. 462, n. 2, p. 383-390, 1988.

Xu, J., Woodworth, C. H., & Johnson, A. K. (1997). **Glutamate and the role of the lateral parabrachial nucleus in the control of water and salt intake in rats.** Soc Neurosci Abstr 23: 1348.

YADA, M. M., DE PAULA, P. M., MENANI, J. V., DE LUCA JR, L. A. Central α -adrenergic agonists e need-induced 3% NaCl e water intake. **Pharmacol.Biochem.Behav.**, v. 57, p. 137-143, 1997a.

YADA, M. M., DE PAULA, P. M., MENANI, J. V., RENZI, A., CAMARGO, L. A., SAAD, W. A. et al. Receptor-mediated effects of clonidine on need-induced 3% NaCl and water intake. **Brain Res Bull.**, v. 42, n. 3, p. 205-209, 1997b.

YAMAMOTO, T., SHIMURA, T., SAKO, N., SAKAI, N., TANIMIZU, T., WAKISAKA, S. c-Fos expression in the parabrachial nucleus after ingestion of sodium chloride in the rat. **Neuroreport.**, v. 4, n. 11, p. 1223-1226, 1993.