
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**"Mecanismos gabaérgicos e opióides
do núcleo parabraquial lateral
envolvidos no controle da ingestão de sódio"**

Lisandra Brandino de Oliveira

São Carlos
2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS - UFSCAR
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

**"Mecanismos gabaérgicos e opióides
do núcleo parabraquial lateral
envolvidos no controle da ingestão de sódio"**

Lisandra Brandino de Oliveira

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

São Carlos
2007

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

O48mg

Oliveira, Lisandra Brandino de.

Mecanismos gabaérgicos e opióides do núcleo parabraquial lateral envolvidos no controle da ingestão de sódio / Lisandra Brandino de Oliveira. -- São Carlos : UFSCar, 2007.

212 f.


Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2007.

1. Neurofisiologia. 2. Ingestão de sódio. 3. Núcleo parabraquial lateral. 4. GABA (Ácido Gama Aminobutírico). 5. Opióide. 6. Imunoistoquímica. I. Título.

CDD: 574.1 (20^a)

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

Defesa de Tese de LISANDRA BRANDINO DE OLIVEIRA

Prof. Dr. José Vanderlei Menani.....

Profa. Dra. Patrícia Maria de Paula.....*Patrícia m. de Paula*

Profa. Dra. Débora Simões de Almeida Colombari.....*Débora S. Colombari*

Prof. Dr. Gerhardus Hermanus Maria Schoorlemmer.....*G.H. Schoorlemmer*

Profa. Dra. Lucila Leico Kagohara Elias.....*Lucila L. K. E.*

Agradecimentos

Aos meus pais, Osvaldo e Antonia, e em memória de minha querida irmã Fabiana, a vocês, agradeço por todo amor, carinho, amizade e confiança, e acima de tudo por sempre terem estado ao meu lado.

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. José Vanderlei Menani, pela sua orientação e dedicação na realização deste trabalho.

Aos professores do Departamento de Fisiologia da Unesp – Araraquara e do Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, expresso meu respeito e gratidão.

Agradeço a todas as pessoas do laboratório, aos estagiários, e em especial aos funcionários, Silas, Ana, Reginaldo, Sílvia, Silvana.

Agradeço a todos os meus amigos que sempre estiveram ao meu lado.

À funcionária do Departamento de Ciências Fisiológicas, Selma, obrigada pela atenção.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPq por tornarem possível a realização deste trabalho. Especialmente agradeço à FAPESP, pela concessão da bolsa.

*“Seria melhor você viver o máximo,
agir dentro do seu máximo
e pensar o máximo no dia de hoje,
pois hoje é o preparo certo para amanhã
e todos os amanhãs que virão.”*

Harriet Martineau

RESUMO

O núcleo parabraquial lateral (NPBL) é uma estrutura pontina, localizada dorsalmente ao pedúnculo cerebelar superior, que recebe projeções aferentes da área postrema (AP) e da porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm) e que faz conexões com áreas prosencefálicas envolvidas no controle do balanço hidroeletrólítico, como núcleos específicos do hipotálamo e amígdala. Assim, um papel importante do NPBL seria integrar as informações ascendentes do NTSm e AP que por sua vez poderiam influenciar a atividade das áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico. Ademais, estudos anteriores mostraram a presença de mecanismos serotoninérgicos, colecistocinérgicos e adrenérgicos α_2 para o controle da ingestão de água e de sódio no NPBL. O aminoácido inibitório GABA (ácido γ -aminobutírico) é um neurotransmissor inibitório distribuído por todo o sistema nervoso central, se ligando basicamente em dois subtipos de receptores: os receptores GABA_A e os receptores GABA_B e estudos anteriores mostraram uma participação de mecanismos gabaérgicos no controle da ingestão de água, sódio e alimento, sendo que estudos do nosso laboratório mostraram que a ativação de receptores do aminoácido inibitório GABA no NPBL através de injeções bilaterais de muscimol ou baclofen (agonistas de receptores GABA_A e GABA_B, respectivamente) induz intensa ingestão de solução hipertônica de cloreto de sódio (NaCl 0,3 M) num período relativamente curto de tempo (3 h) em ratos saciados e normovolêmicos. Além disso, já foi também verificada a presença de receptores opióides no NPBL e a participação de mecanismos opióides no controle do comportamento ingestivo. Assim sendo, foram objetivos da presente tese:

- a) investigar a participação dos receptores GABA_A e GABA_B na ingestão de NaCl 0,3 M e água decorrente da ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio;
- b) estudar os efeitos da ativação gabaérgica no NPBL na expressão da proteína c-fos em ratos saciados ou depletados de sódio, com e sem acesso à solução de NaCl 0,3 M;
- c) verificar os efeitos da lesão aguda do núcleo do trato solitário comissural (NTSc - área que apresentou maior expressão da proteína c-fos em ratos saciados sem acesso ao sódio e água e tratados com muscimol e baclofen no

- NPBL) e da região AV3V (importante área envolvida no controle do equilíbrio hidroeletrólítico) sobre o efeito natriorexigênico e a ingestão de água induzidos pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados;
- d) estudar, em ratos saciados, os efeitos da inibição de receptores adrenérgicos α_2 e opióides, bem como a ativação de mecanismos serotoninérgicos, no NPBL sobre os efeitos da ativação gabaérgica na mesma área sobre ingestão de NaCl e água em ratos saciados;
 - e) investigar a participação de mecanismos opióides do NPBL sobre a ingestão de sódio e água em ratos saciados ou depletados de sódio;
 - f) verificar os efeitos da ativação gabaérgica do NPBL sobre a pressão arterial e excreção urinária.

Para tanto, foram utilizados ratos Holtzman ou Sprague Dawley com cânulas de aço inoxidável implantadas bilateralmente no NPBL (volume de injeção de 0,2 μ l em cada lado do NPBL). Outros grupos de ratos, além do implante de cânulas no NPBL também foram submetidos à lesão eletrólítica do NTS_c e região AV3V.

Em ratos saciados, injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol) e baclofen (0,5 nmol) no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M acompanhada de um aumento na ingestão de água, sendo que os efeitos do muscimol foram reduzidos pelo tratamento prévio com bicuculina (1,6 nmol – antagonista de receptores GABA_A), mas não pelo tratamento com CGP 35348 (50 nmol – antagonista de receptores GABA_B). Já os efeitos do baclofen foram abolidos pelas injeções prévias de CGP 35348 e também pela bicuculina. Em ratos depletados de sódio por 24 h (tratamento sc com o diurético furosemide + dieta deficiente de sódio e água por 24 h), muscimol e baclofen injetados bilateralmente no NPBL, promoveram uma redução inicial e uma facilitação tardia da ingestão de NaCl 0,3 M. Bicuculina, mas não CGP 35348, aboliu tanto o efeito inibitório quanto facilitatório do muscimol injetado no NPBL sobre a ingestão de sódio. Em relação aos animais depletados tratados com baclofen, o CGP 35348 aboliu o efeito inibitório, enquanto que a bicuculina aboliu o efeito facilitatório do baclofen sobre a ingestão de sódio. Estes resultados sugerem que tanto o efeito natriorexigênico em ratos saciados quanto o efeito dual sobre a ingestão de sódio em ratos depletados de sódio, do muscimol injetado no NPBL dependem da ativação de receptores GABA_A. Em relação ao baclofen, em ratos saciados o efeito natriorexigênico do baclofen depende da ativação tanto de receptores GABA_A quanto receptores GABA_B, já em animais depletados, a inibição

inicial da ingestão de sódio depende da ativação de receptores GABA_B, enquanto que a facilitação tardia depende dos receptores GABA_A.

Interessantemente, embora a ativação gabaérgica no NPBL promova uma facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M, talvez não haja uma participação tônica de mecanismos gabaérgicos nessa ingestão induzida pela depleção de sódio por 24 h, uma vez que a inibição de receptores GABA_A (bicuculina) e GABA_B (CGP 35348) não alterou a ingestão de NaCl 0,3 M nem tampouco a de água em animais depletados. Todavia, em animais que foram treinados a ingerirem solução hipertônica de NaCl 0,3 M, por apenas 2 h por dia, injeções bilaterais de CGP 35348, mas não bicuculina, no NPBL, reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M, sugerindo uma participação tônica dos receptores GABA_B, mas não GABA_A, no NPBL sobre o controle da ingestão de sódio no protocolo estudado.

Investigando-se a especificidade da ativação gabaérgica no NPBL para a ingestão de solução hipertônica de NaCl observou-se que: 1) em relação à ingestão de água: a) em ratos saciados quando os animais tinham apenas buretas de água disponíveis, muscimol, mas não baclofen, injetado bilateralmente no NPBL, induziu uma pequena ingestão de água; b) já em animais privados de água por 24 h, tanto muscimol quanto baclofen injetado no NPBL aumentaram a ingestão de água no final do experimento; 2) em relação à ingestão de alimento: a) em animais saciados, injeções de muscimol no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M e água; e baclofen induziu apenas ingestão de sódio, sendo que a de alimento permaneceu inalterada após ativação gabaérgica; b) em animais privados de alimento por 24 h, muscimol e baclofen induziram ingestão de sódio, porém muscimol não alterou as ingestões de alimento e água, enquanto que baclofen reduziu tanto as ingestões de alimento quanto de água; 3) em relação à ingestão de sacarose 2%: quando animais depletados de sódio tiveram além das buretas de água e NaCl 0,3 M também buretas de sacarose 2% disponíveis, observou-se apenas o efeito facilitatório do muscimol sobre a ingestão de sódio e água, sendo que tanto os efeitos inibitório quanto facilitatório do baclofen desapareceram. Em nenhum dos tratamentos verificou-se alteração na ingestão de sacarose 2%. Estes resultados sugerem que a ativação gabaérgica no NPBL não promoveria uma ativação generalizada do comportamento ingestivo, sendo que os efeitos do muscimol parecem ser mais específicos para o sódio, enquanto que o baclofen, dependendo do protocolo e da substância ingerida estudados, pode promover uma facilitação ou inibição do

comportamento ingestivo. Além disso, os resultados, em relação à ingestão de água, sugerem que em ratos saciados a grande ingestão de água que se observa, parece ser decorrente da intensa ingestão de solução hipertônica de NaCl.

A ingestão de NaCl 0,3 M e água promovida pela ativação gabaérgica no NPBL poderia ser secundária a outros possíveis efeitos do muscimol ou baclofen, como por exemplo, redução da PAM ou aumento da excreção urinária. Todavia, observou-se que injeções de muscimol no NPBL promoveram um aumento dependente de ativação simpática, enquanto baclofen não alterou, a PAM. Não foram observadas alterações na frequência cardíaca (FC) em animais tratados com muscimol ou baclofen no NPBL. Estes resultados sugerem que a ingestão de sódio e água decorrentes da ativação gabaérgica no NPBL não são secundárias a uma redução da PAM que poderia simular uma situação de hipovolemia.

Em relação à análise das respostas renais, observou-se que muscimol injetado bilateralmente no NPBL induziu apenas um pequeno aumento no volume urinário, que poderia ser secundário ao aumento da PAM, sem alterações na excreção urinária de sódio e potássio; enquanto que o baclofen injetado no NPBL não alterou nenhum dos parâmetros renais analisados. Estes resultados sugerem que a ingestão de sódio em ratos saciados induzida pela ativação gabaérgica no NPBL não é secundária a alterações na excreção urinária. Quando foi permitido aos animais ingerirem sódio, verificou-se um aumento do volume urinário e na excreção urinária de sódio e potássio, tanto para os animais que receberam muscimol quanto para os animais que receberam baclofen no NPBL. Os mesmos animais foram submetidos a um outro tratamento no qual não foram feitas injeções centrais, mas sim, sobrecarga intragástrica de NaCl 0,3 M e água na mesma quantidade que os animais ingeriram quando receberam as injeções de muscimol ou baclofen no NPBL, e observou-se que os animais que receberam muscimol no NPBL apresentaram uma maior excreção de potássio, sem diferenças em relação ao volume urinário e excreção de sódio, quando comparados ao experimento em que receberam sobrecarga intragástrica de NaCl, sugerindo que o volume ingerido decorrente da injeção de muscimol no NPBL estaria sendo excretado, ou seja, o muscimol no NPBL não estaria afetando os parâmetros renais. Já em relação ao baclofen, observou-se que embora o volume ingerido seja semelhante entre os animais que receberam baclofen no NPBL e os animais que receberam sobrecarga intragástrica, houve uma redução no volume urinário excretado e na excreção urinária de sódio

quando os animais receberam baclofen em comparação ao experimento no qual os animais receberam sobrecarga, sugerindo que ao mesmo tempo em que o baclofen injetado no NPBL induziria ingestão de sódio, poderia estar reduzindo a excreção urinária.

Sabendo-se que a ativação gabaérgica no NPBL induz ingestão de água e sódio, é possível que esse tratamento ative algumas das áreas prosencefálicas, do tronco e do bulbo que já se sabe estarem envolvidas com o controle da ingestão de água e/ou sódio. Portanto, utilizando-se da técnica de imunoistoquímica para a marcação da proteína c-fos, foi investigado se alguma dessas áreas poderia estar sendo ativada após injeções bilaterais de muscimol ou baclofen no NPBL. Neurônios serotoninérgicos em núcleos do sistema da rafe assim como neurônios ocitocinérgicos no núcleo paraventricular (NPV) e núcleo supra-óptico (NSO) parecem também estarem envolvidos no controle da ingestão de água e sódio e eles também foram analisados, porém apenas em ratos que tiveram livre acesso ao NaCl 0,3 M e água durante o experimento, utilizando a técnica de dupla marcação para c-fos e neurônios serotoninérgicos ou ocitocinérgicos. Apenas a depleção de sódio por 24 h levou a uma redução na expressão da proteína c-fos no NSO, rafe dorsal anterior (RDa), núcleo mediano da rafe anterior (RMna), núcleo pontino da rafe (RPn) e rafe pallidus (RPa); bem como um aumento na atividade do órgão subfornicial (OSF), sugerindo uma possível participação destas áreas no desencadeamento da ingestão de sódio nos animais depletados. Por outro lado, quando os animais, depletados de sódio por 24 h, tiveram acesso ao NaCl 0,3 M e água, foi observado um aumento na expressão da proteína c-fos no NPV, NSO, núcleo medial da amígdala (NMA) e núcleo parabraquial medial (NPBM), bem como na atividade de neurônios ocitocinérgicos no NPV e NSO; e serotoninérgicos na RPa. Estes resultados sugerem que estas áreas poderiam estar sendo ativadas ou pelo aumento da osmolaridade decorrente da ingestão de NaCl hipertônico ou pela expansão de volume ou ainda talvez elas poderiam participar da limitação do processo ingestivo, impedindo uma ingestão excessiva de sódio e/ou água. Ratos saciados que não tiveram acesso ao sódio e tratados com muscimol e baclofen no NPBL apresentaram alteração de atividade apenas em duas áreas cerebrais, um aumento na expressão da proteína c-fos no NTSc e uma redução no núcleo préóptico mediano ventral (NPOMv); porém quando os animais tiveram acesso ao sódio, várias outras áreas apresentaram um aumento de atividade como o núcleo

preóptico mediano dorsal (NPOMd), amígdala (Amg), AP e NTSc (considerando-se apenas as áreas que foram analisadas em comum nas duas situações), além do fato de que desapareceu a redução observada na atividade do NPOMv. Já se comparados ratos tratados com muscimol no NPBL que tiveram ou não acesso ao sódio, observou-se que os animais com acesso ao sódio apresentaram maior expressão da proteína c-fos no NPOMd, OVLT, NPV, NSO, Amg e AP, sugerindo que a ativação dessas áreas possivelmente seja devido a ingestão de solução hipertônica de NaCl. Além disso, apesar de ingerirem sódio, o grupo de animais saciados tratados com muscimol não apresentou o aumento esperado na atividade de neurônios ocitocinérgicos e de neurônios serotoninérgicos na RPa, o que poderia ser um efeito do muscimol, que ao retardar a ativação dos mecanismos inibitórios ocitocinérgico e serotoninérgico poderia estar contribuindo para a ingestão de sódio.

O grupo de ratos depletados tratados com muscimol apresentou um aumento da atividade no NSO (mas não em neurônios ocitocinérgicos), NPOMd, NPBL, NTSc e NTScI (NTSc lateral) quando comparado ao grupo de animais depletados tratados com salina no NPBL, sugerindo que alterações na atividade dessas áreas possam estar envolvidas no efeito natriorexigênico do muscimol injetado no NPBL. Porém, é importante mencionar, que a ingestão do grupo de animais depletados tratados com muscimol é maior que do grupo de animais depletados tratados com salina, e o efeito na expressão da proteína c-fos também poderia estar sendo decorrente da maior ingestão de solução hipertônica de sódio e água.

Em resumo considerando-se os resultados obtidos em animais saciados que tiveram ou não acesso ao sódio, pode-se considerar que o aumento na atividade do NTSc independe do animal ingerir ou não sódio, embora este aumento possa estar sendo influenciado pelo aumento da PAM basal. Todavia não houve mais uma redução na atividade do NPOMv quando os animais tiveram acesso ao sódio, sugerindo que uma redução na atividade do NPOMv poderia ser importante para induzir a ingestão de sódio, porém se os animais ingerissem sódio, a atividade dessa área voltaria aos níveis basais, talvez com o intuito de limitar a ingestão.

Os estudos imunohistoquímicos com injeções bilaterais de muscimol e baclofen no NPBL mostraram um aumento de atividade no NTSc, sugerindo uma possível participação deste núcleo nos efeitos decorrentes da ativação gabaérgica no NPBL, portanto foi investigado se a lesão aguda do NTSc poderia afetar a

ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela ativação gabaérgica no NPBL. Os resultados mostraram que lesão do NTSc aumentou a ingestão de sódio induzida pelas injeções de baclofen (1º dia após lesão) e muscimol (3º dia após lesão) no NPBL de ratos saciados. Em relação à ingestão de água, a lesão promoveu um aumento e uma redução da ingestão de água que acompanha a ingestão de sódio induzida, respectivamente, pelo baclofen e muscimol. Estes resultados sugerem que o NTSc teria um papel inibitório importante sobre o efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL.

A região anteroventral do 3º ventrículo (AV3V) é uma região importante para o controle do equilíbrio hidroeletrólítico, por isso, foram estudados os efeitos da lesão aguda da região AV3V sobre o efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL. Os resultados mostraram que lesão aguda da região AV3V aboliu tanto a ingestão de NaCl 0,3 M quanto a de água promovidos por injeções bilaterais de baclofen (1º dia de lesão) e muscimol (3º dia de lesão) no NPBL, sugerindo que a integridade da região AV3V seria importante para a completa expressão do comportamento ingestivo desencadeado pela ativação gabaérgica no NPBL.

Vários mecanismos neuronais (por exemplo: gabaérgicos, opióides, serotoninérgicos, adrenérgicos α_2 , entre outros) estão envolvidos no controle da ingestão de NaCl e água, sendo que eles poderiam interagir entre si para desencadear o comportamento ingestivo final. Assim, foi investigada uma possível interação entre a ativação gabaérgica no NPBL com mecanismos adrenérgicos α_2 , serotoninérgicos e opióides também no NPBL sobre a ingestão de sódio e água em ratos saciados.

Em relação à interação de mecanismos gabaérgicos com mecanismos adrenérgicos α_2 , observou-se que a administração prévia de RX 821002 (10 nmol - antagonista de receptores adrenérgicos α_2), que promoveria uma inibição dos mecanismos adrenérgicos α_2 , reduziu parcialmente o efeito natriorexigênico do muscimol (últimos 90 min de experimento) e do baclofen (últimos 30 min de experimento). Em relação à ingestão de água, RX 82110 aboliu a ingestão de água em animais tratados com muscimol e não afetou a ingestão de água em animais tratados com baclofen. Assim sendo, parece que a ativação de mecanismos adrenérgicos α_2 no NPBL participa do efeito natriorexigênico desencadeado pela

ativação gabaérgica no NPBL, sendo mais evidente esta participação nos animais tratados com muscimol em comparação aos tratados com baclofen.

Já para a possível interação entre mecanismos gabaérgicos e serotoninérgicos no NPBL, observou-se que a ativação de mecanismos serotoninérgicos através das injeções bilaterais no NPBL do agonista de receptores serotoninérgicos 5HT_{2A/2C}, (DOI - 5 µg), inibiu as ingestões de NaCl 0,3 M e água induzidas pelas injeções de muscimol no NPBL, sugerindo que a ativação gabaérgica poderia estar inibindo o mecanismo serotoninérgico do NPBL, cuja atividade seria restabelecida pelas injeções de DOI no NPBL. Todavia, a administração do agonista serotoninérgico não alterou o efeito natriorexigênico e a ingestão de água, observados após a administração de baclofen no NPBL; o que sugere dois mecanismos diferentes para a indução da ingestão de água e sódio pela ação do muscimol e baclofen no NPBL.

Os resultados mostraram que injeções bilaterais de naloxona (antagonista de receptores opióides) no NPBL reduziu de forma dose dependente, a ingestão NaCl 0,3 M e água induzida pelo muscimol ou baclofen no NPBL, sendo que a maior dose da naloxona (60 µg) aboliu tanto o efeito natriorexigênico quanto a ingestão de água, observados após as injeções de baclofen e muscimol no NPBL, confirmando o envolvimento de mecanismos opióides na ingestão de sódio e água desencadeada pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados.

Seria possível que injeções de muscimol ou baclofen no NPBL promovessem uma liberação de opióides que atuando em seus receptores induziriam a ingestão de sódio. Os resultados mostraram que a administração bilateral de β-endorfina (agonista opióide) no NPBL de ratos saciados induziu ingestão de solução hipertônica de NaCl e de água de uma maneira temporalmente semelhante às ingestões promovidas pela ativação gabaérgica no NPBL, sendo estes efeitos abolidos após a administração do antagonista opióide (naloxona), sugerindo que tanto a ingestão de NaCl 0,3 M quanto a de água induzida pelas injeções bilaterais de β endorfina no NPBL, se deve à ativação de receptores opióides. Além disso, naloxona injetada bilateralmente no NPBL foi capaz de reduzir a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio de 24 h, sugerindo a presença de um mecanismo opióide tônico no NPBL no controle da ingestão de sódio na condição experimental estudada. Os

efeitos da β -endorfina injetada no NPBL parecem ser específicos para a ingestão de NaCl, uma vez que não foram observadas alterações na ingestão de sacarose 2%. Além disso, a ingestão de água observada quando os animais ingerem NaCl 0,3 M parece ser secundária à ingestão de sódio, uma vez que em animais saciados que não tiveram acesso ao sódio, não se observou alterações na ingestão de água.

ABSTRACT

The lateral parabrachial nucleus (LPBN) is a pontine structure located in the dorsal portion of the cerebellar superior peduncle. LPBN receives afferent projections from the area postrema (AP) and the medial portion of the nucleus of tractus solitarius (mNTS) and connects to prosencephalic areas related to hidroelectrolytic control, such as specific nuclei of the hypothalamus and amygdala. So, an important role of the LPBN could be integrating ascending information from AP and mNTS that could affect the activity of prosencephalic areas involved in the hidroelectrolytic control. Previous studies showed the presence of serotonergic, cholecystokinergic and α_2 -adrenergic mechanisms in the LPBN to control water and sodium intake. The γ -aminobutyric acid (GABA) is an inhibitory neurotransmitter present in the whole central nervous system and binding to two subtypes of receptors: GABA_A and GABA_B receptors. Previously, it was shown the participation of gabaergic mechanisms to control water, sodium and food intake. Gabaergic activation into the LPBN using bilateral injections of muscimol (GABA_A receptor agonist) and baclofen (GABA_B receptor agonist) induced a strong ingestion of sodium chloride (NaCl 0.3 M) in a short period of time (3 h) in satiated and normovolemic rats. Besides the presence of gabaergic mechanisms into the LPBN, it was already shown the presence of opioid receptors into the LPBN and the involvement of opioid mechanisms in the control of ingestive behavior. Therefore, the goals of this thesis were:

- a) to investigate the participation of GABA_A and GABA_B receptors on NaCl and water intake induced by gabaergic activation in the LPBN in satiated and sodium depleted rats;
- b) to study the effects of gabaergic activation into the LPBN on c-fos protein expression in satiated and sodium depleted rats, with or without access to NaCl 0.3 M;
- c) to test if acute lesion of the commissural NTS (cNTS – area with the greatest c-fos protein expression in satiated rats not allowed to drink sodium or water and treated with muscimol and baclofen into the LPBN) and anteroventral 3^o ventricle region (AV3V – an important area involved in the hidroelectrolytic control) could affect the natriorexigenic and water intake induced by gabaergic activation into the LPBN in satiated rats;

- d) to study the effects of inhibition of α_2 -adrenergic and opioid mechanisms and activation of serotonergic mechanisms into the LPBN on NaCl and water intake-induced by gabaergic activation in the same area in satiated rats;
- e) to investigate the participation of opioid mechanisms in the LPBN on sodium and water intake in satiated and sodium depleted rats;
- f) to verify the effects of gabaergic activation in the LPBN on arterial pressure and urinary excretion.

Male Holtzman or Sprague Dawley rats with bilateral stainless steel guide-cannulas implanted into the LPBN (volume of injection: 0.2 μ l) were used. Other groups of rats, besides the cannulas implanted into the LPBN, they were also submitted to electrolytic lesion in the cNTS or AV3V region.

In satiated rats, bilateral injections of muscimol (0.5 nmol) and baclofen (0.5 nmol) into the LPBN induced 0.3 M NaCl intake followed by an increase in water intake. The effects on sodium and water intake produced by muscimol injected into the LPBN were reduced by previous treatment with bicuculline (GABA_A receptor antagonist - 1.6 nmol), but not CGP 35348 (GABA_B receptor antagonist - 50 nmol). Pre treatment with bicuculline or CGP 35348 into the LPBN abolished the effects of baclofen on sodium and water intake. In 24 h sodium depleted rats (treatment with sc furosemide + sodium deficient diet and water for 24 h), muscimol and baclofen bilaterally injected into the LPBN, produced an early inhibition and a late facilitation of 0.3 M NaCl. Bicuculline, but not CGP 35348, abolished the inhibitory and facilitatory effects of muscimol injected into LPBN on sodium intake. In relation to sodium depleted rats treated with baclofen into the LPBN, CGP 35348 abolished the inhibitory effect, while bicuculline abolished the facilitatory effect of baclofen on sodium intake. These results suggest that the natriorexigenic effect in satiated rats and the dual effects on sodium intake in sodium depleted rats produced by muscimol injected into the LPBN depend on GABA_A receptors activation. In relation to baclofen, in satiated rats the natriorexigenic effect of baclofen depends on activation of GABA_A and GABA_B receptors, but in sodium depleted rats, the early inhibition of sodium intake depends on GABA_B receptors activation while the late facilitation depends on activation of GABA_A receptors.

Interestingly, although gabaergic activation promotes a facilitation of sodium intake, maybe there is not tonic gabaergic participation on sodium depletion-induced sodium intake, since inhibition of GABA_A (bicuculline) and GABA_B (CGP 35348)

receptors into the LPBN did not affect 0.3 M NaCl and water intake in sodium depleted rats. Otherwise, in rats trained to drink 0.3 M NaCl only 2 h per day, CGP 35348, but not bicuculline, injected into the LPBN reduced 0.3 M NaCl, suggesting a tonic participation of GABA_B, but not GABA_A, receptors on sodium intake control in the protocol studied.

When it was investigated the specificity of gabaergic activation into the LPBN to sodium intake, it was observed the following results: 1) in relation to water intake: a) in satiated rats, when the animals had only water burettes available, muscimol, but not baclofen, bilaterally injected into LPBN, induced a slight water intake; b) in 24 h water deprived rats, muscimol and baclofen injected into the LPBN increased water intake at the end of the experiment; 2) in relation to food intake: a) in satiated rats, neither muscimol nor baclofen injected into the LPBN affected food intake, but muscimol induced sodium and water intake, while baclofen induced sodium, but not water intake; b) in 24 h food deprived rats, muscimol induced sodium intake, with no effects on water or food intake, on the other hand, while baclofen induced sodium intake it also reduced water and food intake; 3) in relation to 2% sucrose intake: when sodium depleted rats had 3 burettes available: water, 0.3 M NaCl and 2% sucrose, it only remained the facilitatory effect of muscimol on sodium intake, while both effects of baclofen (inhibition and facilitation) on sodium intake disappeared. Muscimol or baclofen injected into the LPBN did not affect 2% sucrose intake in sodium depleted rats. These results suggest that gabaergic activation into the LPBN did not promote a non-specific activation of ingestive behavior. The effects of muscimol seem to be specific to sodium intake, while, baclofen, depending on the protocol or what is being ingested, it could facilitate or inhibit the ingestive behavior. Besides, the results related to water intake, suggest that the great amount of water that was ingested seems to be secondary to the strong hypertonic NaCl solution intake.

One question that arouse was if water and 0.3 M NaCl intake induced by gabaergic activation could be secondary to other possible effects of muscimol or baclofen, such as, reduction on mean arterial pressure (MAP) or increased urinary excretion. While muscimol injected into the LPBN promoted an increase on MAP dependent of sympathetic activity, baclofen did not affect MAP. Muscimol or baclofen injected into the LPBN did not change heart rate. These results suggest that sodium

and water intake induced by gabaergic activation in the LPBN is not secondary to a decrease in MAP that could simulate a hypovolemia situation.

In relation to urinary excretion, muscimol injected into the LPBN induced a slight increase in urinary volume, which could be secondary to the increase on MAP, with no effects on sodium and potassium excretion. Baclofen injected into the LPBN did not affect any of the renal parameters analyzed. These results suggest that sodium and water intake induced by gabaergic activation into the LPBN is not secondary to changes in renal excretion. When the animals had 0.3 M NaCl and water available, it was noted an increase on urinary volume and sodium and potassium urinary excretion in animals treated with muscimol or baclofen into the LPBN. The same animals were submitted to another treatment with no injections into the LPBN, but they received intragastric loading of 0.3 M NaCl and water in a similar amount that they ingested when they were treated with muscimol or baclofen into the LPBN. The animals that received muscimol into the LPBN and were allowed to drink had a greater potassium excretion, with no differences in urinary volume or sodium excretion, when compared to animals that received the intragastric loading. So, it seems that muscimol injected into the LPBN may not affect urinary volume or sodium renal excretion independently if the animal were allowed or not to drink 0.3 M NaCl and water. Animals allowed to ingest water and 0.3 M NaCl treated with baclofen into the LPBN had a reduction on urinary volume and sodium urinary excretion when compared to the animals that received intragastric loading, suggesting that while baclofen induced sodium intake it could reduce urinary excretion.

Since gabaergic activation into the LPBN induced water and sodium intake it could be possible that these activation into the LPBN could affect the activity of prosencephalic and hindbrain areas that area already known to be involved in the control of water and/or sodium intake. So, using the immunohistochemical technique to detected c-fos protein, it was investigated if some of these areas could be affected after bilateral injection of muscimol or baclofen into the LPBN. Serotonergic neurons in the raphe system and oxytocinergic neurons in the supraoptic (SON) and paraventricular (PVN) nucleus also seem to be involved in the control of water and sodium intake and they were also analyzed using double labeling technique (c-fos + serotonergic or oxytocinergic neurons) only in rats that had access to 0.3 M NaCl and water during the experiment. Only 24 h sodium depletion promoted a reduction on c-fos expression in the SON, anterior dorsal raphe (aDR), anterior median nucleus of

raphe (aMnR), pontine nucleus of raphe (PnR) and raphe Pallidus (RPa), and an increase in the activity of subfornical organ (SFO), suggesting a possible participation of these areas in the promotion of sodium depletion-induced sodium intake. On the other hand, when sodium depleted rats were allowed to drink 0.3 M NaCl and water, there was an increase on c-fos expression in PVN, SON, medial nucleus of amygdala (NMA) e medial parabrachial nucleus (MPBN), and also an increase on oxytocinergic neurons in PVN and SON and serotonergic neurons in RPa. These results suggest that these areas could be activated or by an increase of osmolarity due to hypertonic NaCl intake or by volume expansion or maybe they could participate in the limitation of the ingestive process, avoiding an excessive intake of sodium and/or water.

In satiated rats not allowed to drink, gabaergic activation (muscimol and baclofen) into the LPBN promoted an increase on c-fos expression in the cNTS and a decrease in the ventral median preoptic nucleus (vMPON). When the animals were allowed to drink, muscimol injected into the LPBN promoted activation of other areas, such as: dorsal median preoptic nucleus (dMPON), amygdala, AP and cNTS (considering only the areas analyzed that were common to both situations) and the reduction in vMPON disappeared. When animals treated with muscimol into the LPBN with and without access to sodium were compared, the animals that were allowed to drink showed a greater expression of c-fos in the dMPON, *organum vasculosus of lamina terminalis* (OVLT), PVN, SON, amygdala and AP, suggesting that activation of these areas could be due to hypertonic NaCl intake. Besides, although the animals had drunk sodium, the satiated animals treated with muscimol did not show the expected increase on oxytocinergic neurons (PVN and SON) and serotonergic neurons (RPa) activity. These could be an effect of muscimol that could promote a delay in the activation of oxytocinergic and serotonergic inhibitory mechanisms, therefore, facilitating sodium intake.

Sodium depleted rats treated with muscimol into the LPBN showed an increase in the activity of SON (no int oxytocinergic neurons), dMPON, LPBN, cNTS and lateral portion of cNTS (lcNTS) when compared to sodium depleted rats treated with saline into the LPBN, suggesting that alterations in the activity of these areas could be involved in the natriorexigenic effect of muscimol injected into the LPBN. Anyway, it is important to mention that sodium depleted rats treated with muscimol had a

greater ingestion than sodium depleted rats treated with saline, and the effect on c-fos expression may also be a consequence of a greater sodium and water intake.

In summary considering the results in satiated animals with or without access to sodium, it is possible to consider that the increase in cNTS activity is independent of sodium intake, although this increase could also be a consequence of the increase on basal MAP. Anyway, when the animals were allowed to drink the reduction on vMPOB disappeared, actually, the activity of this area come back to basal levels, maybe as an attempt to inhibit sodium intake.

Based on the immunohistochemistry study that suggested a possible involvement of the cNTS on the effects of muscimol and baclofen injected into the LPBN, it was investigated if acute lesion of this area could affect 0.3 M NaCl and water intake induced by gabaergic activation into the LPBN in satiated rats. Acute lesion of cNTS increased sodium intake induced by baclofen (1st day after lesion) and muscimol (3rd day after lesion) injected into the LPBN in satiated rats. The cNTS lesion promoted an increase and a reduction on water intake that follows hypertonic sodium intake, respectively, for baclofen and muscimol treatment. These results suggest that cNTS may have an inhibitory role on the natriorexigenic effect of gabaergic activation into the LPBN.

The AV3V region is an important area involved in the hidroelectrolytic control, so it was also studied if acute lesion of this region could affect sodium and water intake induced by gabaergic activation into the LPBN. Acute lesion of AV3V region abolished 0.3 M NaCl and water intake induced by bilateral injections of baclofen (1st day after lesion) or muscimol (3rd day after lesion) injected into the LPBN, suggesting that the integrity of AV3V region may be important to the complete expression of the ingestive behavior produced by gabaergic activation into the LPBN.

Many neuronal mechanisms (such as: gabaergics, opioids, serotonergics, α_2 -adrenergics, and others) are involved in the control of water and sodium intake, and they could interact to produce the final ingestive behavior. Therefore, it was investigated a possible interaction between gabaergic mechanisms and α_2 -adrenergics or serotonergics or opioids mechanisms into the LPBN on sodium and water intake.

Previous injection into the LPBN of the α_2 -adrenergic receptor antagonist, RX 821002 (10 nmol), that inhibits the α_2 -adrenergic mechanisms, partially reduced the

natriorexigenic effect of muscimol (last 90 minutes of experiment) and baclofen (last 30 minutes of experiment). In relation to water intake, RX 821002 abolished and did not affect water intake in satiated animals treated with muscimol and baclofen, respectively. So, it seems that activation of α_2 -adrenergic mechanisms into the LPBN participated in the natriorexigenic effect of gabaergic activation in the same area, and this participation seems to be more evident in animals treated with muscimol than animals treated with baclofen.

In satiated rats, activation of serotonergic mechanisms into the LPBN through bilateral injections of the 5HT_{2A/2C} serotonergic receptor agonist, DOI (5 μ g) inhibited 0.3 M NaCl and water intake induced by muscimol injected in the same area, suggesting that gabaergic activation could be inhibiting serotonergic mechanisms into the LPBN, and injection of the serotonergic agonist could restore the serotonergic activity into the LPBN. On the other hand, previous injection of DOI did not affect 0.3 M NaCl or water intake in rats treated with baclofen, suggesting that muscimol and baclofen injected into the LPBN could induce sodium and water intake by 2 different mechanisms.

Naloxone, opioid receptor antagonist, bilateral injected into the LPBN reduced, in a dose dependent manner, 0.3 M NaCl and water intake induced by muscimol or baclofen injected into the LPBN. The highest dose of naloxone (60 μ g) abolished sodium and water intake induced by muscimol and baclofen injected into the LPBN, confirming an involvement of opioid mechanisms on these effects of gabaergic activation into the LPBN in satiated rats.

Based on the fact that naloxone abolished the effects of gabaergic activation into the LPBN on sodium intake, it could be possible that gabaergic activation may promote release of endogenous opioids that acting in their receptors could induce sodium intake. Bilateral administration of β -endorphin (opioid receptor agonist - 2 nmol) into the LPBN induced 0.3 M NaCl and water intake similarly to water and sodium intake induced by gabaergic activation. Sodium and water intake induced by β -endorphin was abolished by previous treatment with naloxone (40 μ g), suggesting that these effects of β -endorphin is due to activation of opioid receptors. Besides, bilateral injections of naloxone into the LPBN reduced sodium depletion-induced sodium intake, suggesting the presence of a tonic opioid mechanism into the LPBN to control sodium intake in the protocol studied. The effects of β -endorphin injected

into the LPBN seems to be specific to sodium intake, since β -endorphin did not affect 2% sucrose intake (two-bottle test: water and 2% sucrose available) or water intake (one-bottle test: only water available) in satiated rats.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

Amg	=	amígdala
ANG II	=	angiotensina II
ANOVA	=	análise de variância
ANP	=	peptídeo natriurético atrial
AP	=	área postrema
ASL	=	área septal lateral
ASM	=	área septal média
AV3V	=	região anteroventral do terceiro ventrículo
BNSTd	=	núcleo da estria terminal dorsal
BNSTv	=	núcleo da estria terminal ventral
bpm	=	batimentos por minuto
CCK	=	colecistocinina
DAB	=	diaminobenzidina
DOCA	=	acetato de desoxicorticosterona
EPM	=	erro padrão da média
FC	=	freqüência cardíaca
g	=	grama(s)
GABA	=	ácido gama-aminobutírico
h	=	hora(s)
icv	=	intracerebroventricular
IEGs	=	immediate early genes (genes de expressão imediata)
iv	=	intravenosa
K⁺	=	cátion potássio
kg	=	kilograma
M	=	molaridade
mg	=	miligrama(s)
min	=	minutos
mm	=	milímetro(s)
mmHg	=	milímetros de mercúrio
Na⁺	=	cátion sódio
NaCl	=	cloreto de sódio
NBLA	=	núcleo basolateral da amígdala

NCA	=	núcleo central da amígdala
NMA	=	núcleo medial da amígdala
nmol	=	nanomoles
NPB	=	núcleo parabraquial
NPBL	=	núcleo parabraquial lateral
NPBM	=	núcleo parabraquial medial
NPOM	=	núcleo preóptico mediano
NPOMd	=	núcleo preóptico mediano dorsal
NPOMv	=	núcleo preóptico mediano ventral
NPV	=	núcleo paraventricular
NSO	=	núcleo supraóptico
NTS	=	núcleo do trato solitário
NTSc	=	núcleo do trato solitário comissural
NTScl	=	núcleo do trato solitário comissural lateral
NTSm	=	porção medial do núcleo do trato solitário
NTSr	=	núcleo do trato solitário rostral
OCVs	=	órgãos cincunventriculares
OSF	=	órgão subfornicial
OVLT	=	órgão vasculoso da lamina terminal
PAM	=	pressão arterial média
PB	=	tampão fosfato
RDa	=	rafe dorsal anterior
RDm	=	rafe dorsal mediana
RDp	=	rafe dorsal posterior
RMg	=	rafe magnus
RMna	=	núcleo mediano da rafe porção anterior
RMnm	=	núcleo mediano da rafe porção mediana
RPa	=	rafe <i>Pallidus</i>
RPn	=	rafe pontina
sc	=	subcutâneo
SNC	=	sistema nervoso central
%	=	porcento
α	=	alfa
β	=	beta

Lista de Abreviaturas e Símbolos

Δ	=	delta
γ	=	gama
\sim	=	aproximadamente
\pm	=	mais ou menos
μg	=	micrograma(s)
μl	=	microlitro(s)
μm	=	micrometro(s)

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

- Figura 1:** Fotomicrografia de um corte histológico transversal do cérebro de um animal representativo dos grupos, indicando (setas) os pontos de injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL) 75
- Figura 2:** Fotomicrografia de um corte histológico transversal do cérebro de um animal representativo dos grupos, indicando (seta) o ponto de lesão da região anteroventral do 3º ventrículo (AV3V) 76
- Figura 3:** Fotomicrografias de cortes histológicos transversais do cérebro de um animal representativo dos grupos, indicando (seta) a lesão do núcleo do trato solitário comissural (NTSc). A) a D) cortes no sentido antero-posterior 76
- Figura 4:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 78
- Figura 5:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e após 1 h receberam injeções, também no NPBL, de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 79
- Figura 6:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 81
- Figura 7:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 83
- Figura 8:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e após 1 h receberam injeções, também no NPBL, de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl) e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 84
- Figura 9:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 86

- Figura 10:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 88
- Figura 11:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 89
- Figura 12:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 91
- Figura 13:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 92
- Figura 14:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que tiveram solução de NaCl 0,3 M disponível apenas 2 h/dia (ingestão não regulatória) que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 95
- Figura 15:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que tiveram solução de NaCl 0,3 M disponível apenas 2 h/dia (ingestão não regulatória) que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais 96
- Figura 16:** Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de ratos, ilustrando a expressão da proteína c-fos no NPOMv (painel da esquerda) e NTSc (painel da direita) em ratos saciados que receberam ou não (A) injeções bilaterais de salina (B), muscimol (C) ou baclofen (D) no NPBL. Os animais não tiveram acesso ao sódio e água após as injeções no NPBL 99
- Figura 17:** Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) no A) BNSTd; B) BNSTv; C) NPOMd; D) NPOMv; E) OVLT e F) OSF em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais 102

- Figura 18:** Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) no A) NBLA; B) NCA; C) NMA; D) NPBL e E) NPBM em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais 103
- Figura 19:** Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) no A) AP; B) NTSr; C) NTSc e D) NTScl em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais 104
- Figura 20:** Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de ratos, ilustrando a expressão da proteína c-fos no OSF (painel da esquerda) e AP-NTSc (painel da direita) em ratos saciados (A e B) ou depletados de sódio (C, D e E) por 24 h que receberam ou não (C) injeções bilaterais de salina (A e D) ou muscimol (B e E) no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl (C), receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água 105
- Figura 21:** Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) no A) NPV e C) NSO e da atividade de neurônios ocitocinérgicos no B) NPV-OT e D) NSO-OT em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais 107
- Figura 22:** Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de ratos, ilustrando a expressão da proteína c-fos no NSO (painel da esquerda) e NPV (painel da direita) em ratos saciados (A e B) ou depletados de sódio (C, D e E) por 24 h que receberam ou não (C) injeções bilaterais de salina (A e D) ou muscimol (B e E) no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl (C), receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água 108
- Figura 23:** Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) na A) RDa; C) RDm e E) RDp e da atividade de neurônios serotoninérgicos na B) RDa-5HT; D) RDm-5HT e F) RDp-5HT em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais 111
- Figura 24:** Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) na A) RMna e C) RMnm e da atividade de neurônios serotoninérgicos na B) RMna-5HT e D) RMm-5HT em ratos saciados ou depletados de sódio por

24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média \pm EPM; n = número de animais 112

Figura 25: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) na A) RPN; C) RMg e E) RPa e da atividade de neurônios serotoninérgicos na B) RPN-5HT; D) RMg-5HT e F) RPa-5HT em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média \pm EPM; n = número de animais 113

Figura 26: Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de ratos, ilustrando a expressão da proteína c-fos na RDa (painel da esquerda) e RPa (painel da direita) em ratos saciados (A e B) ou depletados de sódio (C, D e E) por 24 h que receberam ou não (C) injeções bilaterais de salina (A e D) ou muscimol (B e E) no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl (C), receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água 114

Figura 27: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados com lesão fictícia ou lesão aguda do NTSc (1 dia) que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais 116

Figura 28: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados com lesão fictícia ou lesão aguda do NTSc (3 dias) que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais 117

Figura 29: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados com lesão fictícia ou lesão aguda da região AV3V (1 dia) que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais 119

Figura 30: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados com lesão fictícia ou lesão aguda da região AV3V (3 dias) que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais 120

Figura 31: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou RX 821002 (10 nmol/0,2 μ l) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais. 122

- Figura 32:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou RX 821002 (10 nmol/0,2 µl) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais. 123
- Figura 33:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de salina ou DOI (5 µg/0,2 µl) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 125
- Figura 34:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de salina ou DOI (5 µg/0,2 µl) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 126
- Figura 35:** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou A) naloxona 20 µg/0,2 µl; B) naloxona 40 µg/0,2 µl; C) naloxona 60 µg/0,2 µl + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 128
- Figura 36:** Ingestão cumulativa de água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou A) naloxona 20 µg/0,2 µl; B) naloxona 40 µg/0,2 µl; C) naloxona 60 µg/0,2 µl + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 129
- Figura 37:** Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou A) naloxona 20 µg/0,2 µl; B) naloxona 40 µg/0,2 µl; C) naloxona 60 µg/0,2 µl + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 130
- Figura 38:** Ingestão cumulativa de água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou A) naloxona 20 µg/0,2 µl; B) naloxona 40 µg/0,2 µl; C) naloxona 60 µg/0,2 µl + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 131
- Figura 39:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de salina ou β endorfina (2 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 133
- Figura 40:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou naloxona (40 µg/0,2 µl) + salina ou β endorfina (2 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de ratos 134

- Figura 41:** Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de veículo, naloxona (20, 40 e 60 µg/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 138
- Figura 42:** Ingestão cumulativa de água em ratos saciados (lado esquerdo) e privados de água por 24 h (lado direito) que receberam injeções bilaterais de salina, A) e C) muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou B) e D) baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 140
- Figura 43:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 0,3 M; B) água e C) alimento em ratos saciados (painel da esquerda) e privados de alimento por 24 h (painel da direita) que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso ao NaCl 0,3 M, água e alimento. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 142
- Figura 44:** Ingestão cumulativa de A) NaCl 0,3 M; B) água e C) alimento em ratos saciados (painel da esquerda) e privados de alimento por 24 h (painel da direita) que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso ao NaCl 0,3 M, água e alimento. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 143
- Figura 45:** Variação da PAM (mmHg) e FC (bpm) após as injeções de salina, muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL de ratos saciados e normovolêmicos. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 145
- Figura 46:** Variação da PAM (mmHg) e FC (bpm) após as injeções de salina ou prazosin iv + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 147
- Figura 47:** Excreção urinária cumulativa de volume; Na⁺ e K⁺ em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e não tiveram [A), B) e C)] ou tiveram acesso a água e NaCl 0,3 M [D), E) e F)]; e em ratos sem injeções no NPBL e que receberam sobrecargas intragástricas de água e NaCl 0,3 M [D), E) e F)]. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 149
- Figura 48:** Excreção urinária cumulativa de volume; Na⁺ e K⁺ em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e não tiveram [A), B) e C)] ou tiveram acesso a água e NaCl 0,3 M [D), E) e F)]; e em ratos sem injeções no NPBL e que receberam sobrecargas intragástricas de água e NaCl 0,3 M [D), E) e F)]. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais 150
- Figura 49:** Esquema ilustrando uma possível interação entre os diferentes neurotransmissores envolvidos no efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos 180

Figura 50: Esquema ilustrando uma possível hipótese para o efeito dual decorrente da ativação gabaérgica no NPBL sobre a ingestão de sódio em ratos depletados de sódio por 24 h	184
Tabela 1: Ingestão cumulativa (ml) de NaCl 0,3 M, água e sacarose 2% em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de salina, muscimol ou baclofen no NPBL	93
Tabela 2: Expressão da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm ²) sem injeções no NPBL ou após o tratamento com salina, muscimol ou baclofen no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos que não tiveram acesso à água ou ao NaCl 0,3 M	98
Tabela 3: Ingestão cumulativa (ml) de água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou β -endorfina no NPBL	136
Tabela 4: Ingestão cumulativa (ml) de água e sacarose 2% em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou β -endorfina no NPBL	136

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	39
OBJETIVOS	49
MÉTODOS	50
1. <i>Animais</i>	50
2. <i>Cirurgia cerebral</i>	50
3. <i>Injeção das drogas no cérebro</i>	51
4. <i>Drogas injetadas</i>	52
5. <i>Medida da ingestão de água e de NaCl 0,3 M</i>	52
5.1 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos	52
5.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos submetidos à depleção de sódio de 24 h	53
5.3 Ingestão não regulatória de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos	53
6. <i>Medida da ingestão de água, sacarose 2% e/ou NaCl 0,3 M</i>	54
6.1 Ingestão de água e sacarose 2% em ratos saciados e normovolêmicos	54
6.2 Ingestão de água, NaCl 0,3 M e sacarose 2% em ratos submetidos à depleção de sódio por 24 h	54
7. <i>Medida da ingestão de água</i>	55
7.1 Ratos saciados e normovolêmicos	55
7.2 Ratos privados de água por 24 h	55
8. <i>Medida da ingestão de água, NaCl 0,3 M e alimento</i>	55
8.1 Ratos saciados e normovolêmicos	55
8.2 Ratos privados de alimento por 24 h	55
9. <i>Medida do volume urinário e excreção de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) urinário</i>	

.	56
9.1 Ratos sem acesso a água e NaCl 0,3 M durante o experimento	56
9.2 Ratos com acesso a água e NaCl 0,3 M durante o experimento	56
10. <i>Medida da pressão arterial e frequência cardíaca</i>	56
11. <i>Histologia cerebral para localização das áreas cerebrais estudadas</i>	57
12. <i>Imunoistoquímica</i>	57
12.1 Determinação apenas da expressão da proteína c-fos	57
12.2 Determinação da expressão da proteína c-fos + marcação de neurônios ocitocinérgicos ou serotoninérgicos	58
13. <i>Apresentação dos resultados e análise estatística</i>	60
PROTÓCOLOS EXPERIMENTAIS	61
1. <i>Efeitos da administração de bicuculina ou CGP 35348 + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos saciados e normovolêmicos</i>	61
2. <i>Efeitos da administração de CGP 35348 ou bicuculina + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos saciados e normovolêmicos</i>	62
3. <i>Participação de mecanismos gabaérgicos sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio por 24 h.</i>	62
3.1 Efeitos da administração de bicuculina ou CGP 35348 + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos com depleção de sódio	62
3.2 Efeitos da administração de CGP 35348 ou bicuculina + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos com depleção de sódio	63
3.3 Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água, NaCl hipertônico e sacarose 2% em ratos com depleção de sódio	63
4. <i>Participação de mecanismos gabaérgicos no NPBL sobre a ingestão não regulatória de NaCl 0,3 M</i>	63

5.	<i>Alteração da atividade de áreas cerebrais após a administração de muscimol ou baclofen no NPBL</i>	64
5.1	<i>Expressão da proteína c-fos após ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos que não tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Holtzman)</i>	64
5.2	<i>Expressão da proteína c-fos após ativação gabaérgica (muscimol) no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos ou 24 h depletados de sódio por 24 h que tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Sprague-Dawley – Companhia Charles River)</i>	64
6.	<i>Efeitos da lesão do NTSc sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzidas pela administração prévia de muscimol ou baclofen no NPBL em ratos normovolêmicos</i>	65
7.	<i>Efeitos da lesão da região anteroventral do 3º ventrículo (AV3V) sobre as ingestões de água e de NaCl 0,3 M induzidas pela administração prévia de muscimol ou baclofen no NPBL em ratos normovolêmicos</i>	66
8.	<i>Efeitos da associação de RX 821002 ou DOI e muscimol injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos</i>	66
9.	<i>Efeitos da associação de RX 821002 ou DOI e baclofen injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos</i>	67
10.	<i>Efeitos da associação de naloxona e muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos</i>	67
11.	<i>Estudo da administração de β endorfina associada ou não à naloxona no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos</i>	68
12.	<i>Efeitos da administração de β endorfina no NPBL sobre a ingestão de água em ratos saciados e normovolêmicos</i>	69
13.	<i>Efeitos da administração de β endorfina no NPBL sobre a ingestão de água e sacarose 2% em ratos saciados e normovolêmicos</i>	69
14.	<i>Efeitos da administração de naloxona no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio por 24 h</i>	69
15.	<i>Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água em ratos saciados e normovolêmicos ou privados de água por 24 h</i>	70

16.	<i>Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água, NaCl 0,3 M e alimento em ratos saciados e normovolêmicos ou privados de ração por 24 h</i>	71
17.	<i>Estudo dos efeitos do muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a pressão arterial e frequência cardíaca</i>	72
17.1	<i>Estudo dos efeitos do muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a pressão arterial e frequência cardíaca</i>	72
17.2	<i>Estudo dos efeitos da associação prazosin iv + muscimol injetado no NPBL sobre a pressão arterial e frequência cardíaca</i>	72
18.	<i>Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a excreção urinária de sódio e potássio em ratos saciados e normovolêmicos</i>	73

RESULTADOS **74**

1.	<i>Análise histológica</i>	74
2.	<i>Efeitos da administração de bicuculina + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos</i>	77
3.	<i>Efeitos da administração de CGP 35348 + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos</i>	80
4.	<i>Efeitos da administração de CGP 35348 + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos</i>	82
5.	<i>Efeitos da administração de bicuculina + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos</i>	85
6.	<i>Efeitos da administração de bicuculina ou CGP 35348 + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos com depleção de sódio</i>	87
7.	<i>Efeitos da administração de CGP 35348 ou bicuculina + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos com depleção de sódio</i>	90
8.	<i>Efeitos da administração de muscimol e baclofen no NPBL sobre a ingestão de água, NaCl 0,3 M e sacarose 2% em ratos com depleção de sódio</i>	93
9.	<i>Efeitos da inibição gabaérgica no NPBL sobre a ingestão não regulatória de NaCl 0,3 M em ratos</i>	94

10. *Estudo da expressão da proteína c-fos após ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos que não tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Holtzman) 97*
11. *Estudo da expressão da proteína c-fos após injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio que tiveram livre acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Sprague-Dawley – Austrália) 100*
12. *Estudo da expressão da proteína c-fos em neurônios ocitocinérgicos (dupla marcação – cfos-OT) após injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio que tiveram livre acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Sprague-Dawley – Austrália) 106*
13. *Estudo da expressão da proteína c-fos em neurônios serotoninérgicos (dupla marcação – cfos-5HT) após injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio que tiveram livre acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Sprague-Dawley – Austrália) 109*
14. *Efeitos da lesão do NTSc sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos normovolêmicos 115*
15. *Efeitos da lesão da região AV3V sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos 118*
16. *Efeitos da associação de RX 821002 e muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos 121*
17. *Efeitos da associação de DOI e muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos 124*
18. *Efeitos da associação de naloxona e muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos normovolêmicos 127*
19. *Efeitos da ativação de mecanismos opióides no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos 132*
20. *Efeitos da administração de β endorfina no NPBL sobre a ingestão de água e/ou sacarose 2% em ratos saciados e normovolêmicos 135*
21. *Efeitos da administração de naloxona no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com depleção de sódio 137*
22. *Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água (apenas água disponível) em ratos saciados ou privados de água por 24 h 139*

23.	<i>Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água, NaCl 0,3 M e alimento em ratos normovolêmicos e saciados ou privados de alimento por 24 h</i>	141
24.	<i>Efeitos da administração de muscimol e baclofen no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais em ratos saciados e normovolêmicos</i>	144
25.	<i>Efeitos da administração de prazosin iv + muscimol no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC)</i>	146
26.	<i>Efeitos da administração de muscimol ou baclofen sobre a excreção urinária em ratos saciados e normovolêmicos</i>	148

DISCUSSÃO 151

1.	<i>Efeitos da ativação gabaérgica no NPBL sobre o comportamento ingestivo</i>	151
2.	<i>Efeitos da ativação gabaérgica no NPBL sobre a expressão da proteína c-fos e a atividade de neurônios serotoninérgicos e ocitocinérgicos</i>	160
2.1	<i>Estudo da expressão da proteína c-fos em animais saciados e normovolêmicos submetidos à ativação gabaérgica no NPBL sem acesso à solução de NaCl 0,3 M e água</i>	161
2.2	<i>Estudo da expressão da proteína c-fos e da atividade de neurônios ocitocinérgicos e serotoninérgicos em animais saciados e depletados de sódio que tiveram ativação gabaérgica (muscimol) no NPBL e com livre acesso à solução de NaCl 0,3 M e água</i>	163
3.	<i>Participação do NTSc e região AV3V no efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados</i>	170
3.1	<i>Lesão aguda do NTSc sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados</i>	170
3.2	<i>Lesão aguda da região AV3V sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados</i>	172
4.	<i>Interação entre diferentes mecanismos neuronais no NPBL no controle da ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados</i>	175
4.1	<i>Interação entre mecanismos adrenérgicos α_2 e gabaérgicos</i>	176
4.2	<i>Interação entre mecanismos serotoninérgicos e gabaérgicos</i>	177
4.3	<i>Interação entre mecanismos opióides e gabaérgicos</i>	179

5.	<i>Mecanismos opióides no NPBL no controle da ingestão de NaCl 0,3 M, água e sacarose em ratos saciados</i>	181
6.	<i>Efeitos da ativação gabaérgica no NPBL sobre a PAM e FC basais e excreção urinária</i>	186
	SINOPSE	189
	CONCLUSÕES	193
	BIBLIOGRAFIA	196

INTRODUÇÃO

É constante a perda para o ambiente de água e eletrólitos, principalmente o sódio, através da respiração, suor e predominantemente pela excreção urinária. Todavia, a osmolaridade e o volume dos líquidos do organismo devem permanecer dentro de uma pequena faixa de variação para que haja um perfeito funcionamento das células, manutenção da pressão arterial e irrigação tecidual. A regulação da osmolaridade e volume dos líquidos corporais exigem que a entrada de água e eletrólitos seja igual à perda pelo corpo e, para tanto, a regulação envolve a ação integrada dos rins e dos centros da sede e secretores de hormônio antidiurético do hipotálamo. Os rins exercem um papel importante na regulação da osmolaridade e do volume dos líquidos graças a sua capacidade de variar a excreção de água e solutos durante o processo de formação de urina, podendo excretar uma urina hipo ou hiperosmótica. A excreção de sódio é decorrente de uma ação dos rins, influenciada pelo sistema nervoso simpático e hormônios. Assim, os sinais hormonais e neurais modulam a excreção renal de sódio para que ela se iguale a sua entrada (Berne e Levy, 2000).

Há situações nas quais a água e/ou sódio estão em falta no organismo, e conseqüentemente os rins sozinhos não são capazes de normalizar a volemia e/ou a osmolaridade. Nessas situações, a recuperação da normalidade só poderá ser obtida através da ingestão de água e de sódio que é regulada por mecanismos ativados em situações de hipovolemia ou alterações de osmolaridade. Nestas situações, receptores localizados em diversas partes do organismo ou hormônios produzidos sinalizam para algumas regiões específicas do cérebro, que uma vez ativadas desencadeiam respostas renais e/ou o comportamento de busca pela água e sódio (Johnson e Edwards, 1990; Thunhorst e Johnson, 1994; Thunhorst e cols., 1994). Durante a desidratação, por exemplo, uma série de mecanismos ativados controla as ingestões de água e de sódio. Alguns destes, como a produção de angiotensina II (ANG II) e a diminuição das descargas dos receptores cardiovasculares, ativam ou facilitam a ativação desses dois comportamentos. Por outro lado, aumento da osmolaridade sanguínea ou da concentração de sódio ativam apenas o comportamento de ingestão de água e inibem a ingestão de sódio (De Luca e Menani, 1997).

No sistema nervoso central (SNC), mecanismos excitatórios e inibitórios podem ser ativados para se controlar a ingestão de água e sódio. Dentre as substâncias que ativam a ingestão de água e sódio, uma das principais é o peptídeo ANG II, cuja produção está aumentada em situações de hipovolemia e hipotensão. A ANG II atua tanto por suas ações periféricas (controle da secreção de aldosterona) como pela ação em algumas áreas do cérebro como a região anteroventral do terceiro ventrículo (AV3V) e o órgão subfornicial (OSF), que são as principais áreas do cérebro onde estão localizados os receptores para essa substância (Simpson e Routtenberg, 1973; Brody e Johnson, 1980; Mangiapane e Simpson, 1980). Além da ANG II, há outras substâncias envolvidas no controle da ingestão de água e sódio, exercendo um papel inibitório como o peptídeo natriurético atrial (ANP), cuja injeção central inibe a ingestão de sódio induzida tanto pela depleção de sódio como pela ANG II (Antunes-Rodrigues e cols., 1986). Além do ANP, noradrenalina, agonistas e antagonistas de receptores adrenérgicos α_2 , mecanismos opióides, serotoninérgicos, gabaérgicos, colecistocinérgicos e ocitocinérgicos também participam do controle da ingestão de água e solução de NaCl (Brown e cols., 1981; Siviyy e cols., 1981; Rowland, 1982; Ohman e Johnson, 1989; Ferrari e cols., 1990; Edwards e Johnson 1991; Ferrari e cols., 1991; Blackburn e cols., 1992; De Luca e cols., 1994; Barbosa e cols., 1995; Blackburn e cols., 1995; Menani e cols., 1995; Ohman e Johnson, 1995; Verbalis e cols., 1995; De Paula e cols., 1996; Menani e cols., 1996; Stricker e Verbalis, 1996; De Luca e Menani, 1997; Sato e cols., 1997; Yada e cols., 1997a; Yada e cols., 1997b; Yu e cols., 1997; Menani e cols., 1998; Menani e Johnson, 1998; De Gobbi e cols., 2000; Menani e cols., 2000; Fitts e cols., 2003; Rigatto e cols., 2003; Callera e cols., 2005).

As influências excitatórias de áreas prosencefálicas do cérebro no equilíbrio hidroeletrólítico têm sido bem estudadas, enquanto que os mecanismos centrais inibitórios não são bem compreendidos e têm sido demonstrados tanto em áreas prosencefálicas quanto em áreas do tronco cerebral (Ferrari e cols., 1990; Johnson e Edwards, 1990; Ferrari e cols., 1991; Edwards e cols., 1993; Menani e Johnson, 1995; Menani e cols., 1996; De Paula e cols., 1996; De Luca Jr. e Menani, 1997). Importantes mecanismos envolvidos no controle da ingestão de água e sódio foram descobertos no núcleo parabraquial lateral (NPBL), área postrema (AP) e núcleo do trato solitário (NTS) (Contreras e Stetson, 1981; Hyde e Miselis, 1984; Watson, 1985, Ohman e Johnson, 1989; Edwards e Johnson 1991; Edwards e cols., 1993; Menani

e cols., 1995; Ohman e Johnson, 1995; Menani e cols., 1996; Houpt e cols., 1998; Menani e cols., 1998; Menani e Johnson, 1998; De Gobbi e cols., 2000; Menani e cols., 2000; Schreihofe e cols., 2000), além de estudos imunohistoquímicos sugerirem um possível aumento de atividade do NTS e NPBL frente a um aumento na concentração de sódio (Hochstenbach e cols., 1993; Kobashi e cols., 1993; Carlson e cols., 1997; 1998).

Percebe-se, portanto, que a regulação da ingestão de água e sódio é complexa, podendo envolver uma série de áreas (por exemplo, o NPBL, região AV3V e NTS), além de diversos neurotransmissores (como exemplos: ácido gama-aminobutírico, serotonina, opióides e mecanismos α_2 -adrenérgicos) que podem interagir entre si para desencadear o comportamento ingestivo final.

1. Ácido gama-aminobutírico – GABA

O GABA é um neurotransmissor inibitório distribuído ao longo de todo SNC e se ligando basicamente em dois subtipos de receptores: os receptores GABA_A e GABA_B (Bowery, 1987; Christie e North, 1988; Bowery e cols., 1989; Meeley e cols., 1989; Araki e cols., 1992), sendo que o muscimol é um agonista de receptores GABA_A e o baclofen, agonista de receptores GABA_B.

Estudos eletrofisiológicos mostraram que o efeito pós-sináptico do GABA seria mediado principalmente pelos receptores GABA_A (bicuculina-sensíveis) que estão acoplados diretamente aos canais de ânion e cuja ativação promove um aumento na permeabilidade ao cloreto da membrana pós-sináptica e conseqüentemente reduz a despolarização produzida pela ação do neurotransmissor excitatório (Bormann, 1988). Estudos também mostraram uma possível modulação pré-sináptica da liberação de GABA mediada por auto-receptores do tipo GABA_A (Hashimoto e Kuriyama, 1997). Os receptores GABA_B, por sua vez, estão localizados principalmente nos terminais pré-sinápticos, porém também podem ter ações pós-sinápticas, e pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G e atuam através de segundos mensageiros levando no final a um aumento na condutância do potássio (hiperpolarização de membrana) e inibição dos canais de cálcio voltagem-sensíveis, acarretando a inibição da liberação do neurotransmissor (Bormann, 1988; Zhang e Mifflin, 1998). Estes dois subtipos de receptores podem interagir entre si, sendo que a ativação de receptores GABA_B

pode reduzir os sítios de ligação para os receptores GABA_A (Kardos e Kovacs, 1991), podendo exercer um efeito modulatório negativo nas respostas mediadas pelos receptores GABA_A (Hahner e cols., 1991; Si e cols., 1997).

1.1 GABA e comportamento ingestivo

Em ovelhas depletadas de sódio há uma liberação de GABA na zona incerta evocada pela visão e ingestão de soluções de sal, sendo que o mesmo ocorre quando animais privados de alimento vêm e ingerem alimento (Kendrick e cols., 1991). Injeções intracerebroventricular (icv) de muscimol e/ou GABA reduzem a resposta dipsogênica induzida pela ANG II e carbacol (Unger e cols., 1993; Abe e cols., 1988) e inibem as ingestões de sódio e água induzidas pela renina injetada na área preóptica (Abe e cols., 1988). Injeção sistêmica de baclofen inibe a ingestão de água induzida por privação hídrica, sem alterar a ingestão de água em ratos saciados (Ebenezer e cols, 1992).

Em relação à ingestão de alimento, observou-se que muscimol e baclofen injetados no núcleo accumbens induziram ingestão de alimento sem alterar a ingestão de água em ratos saciados (Stratford e Kelley, 1997; Soderpalm e Berridge, 2000). Muscimol, mas não baclofen, injetado na amígdala reduziu ingestão de alimento em ratos saciados e privados (Minano e cols., 1992), porém quando injetado no núcleo mediano e dorsal da rafe, bem como na área tegmental ventral, muscimol induziu intensa ingestão de alimento e líquido de forma dose dependente (Klitenick e Wirtshafter, 1988). Baclofen, administrado sistemicamente, aumentou a ingestão de alimento em ratos saciados (Ebenezer e Pringle, 1992), bem como a ingestão de dietas líquida e sólida (Ebenezer, 1995) e quando injetado no núcleo mediano da rafe, baclofen, induziu ingestão de alimento e água em animais não privados (Wirtshafter e cols., 1993). Bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) quando injetada no núcleo pallidus induziu ingestão de alimento em ratos saciados (Stratford e cols., 1999).

Ativação gabaérgica também parece estar envolvida em outros comportamentos ingestivos, como por exemplo, a ingestão de sacarose. Muscimol injetado na porção medial do núcleo accumbens induziu uma intensa ingestão de sacarose sem alterar ingestão de água, salina ou sacarina (Basso e Kelley, 1999) e injetado na área tegmental ventral aumentou o número de respostas de reforço à

sacarose (Hodge e cols., 1996). Já a administração sistêmica de baclofen reduziu o comportamento de auto-ingestão de sacarose (Anstrom e cols., 2003).

Em resumo, estes estudos mostraram que os efeitos da ativação gabaérgica sob o comportamento ingestivo dependem da área cerebral, do tipo de ingestão e da condição experimental estudada.

2. Peptídeos opióides

Dois pentapeptídeos com ações farmacológicas muito parecidas às da morfina e que competiam com ela pelos mesmos receptores foram isolados do cérebro, sugerindo que as ações da morfina eram decorrentes da sua capacidade de simular as ações de uma família de mediadores endógenos, que foram denominados de peptídeos opióides. Os principais peptídeos endógenos são as encefalinas, endorfinas e dinorfinas que podem atuar como neurotransmissores ou neuromoduladores. Os três principais tipos de receptores opióides são μ (mu), κ (Kappa) e δ (delta) (Goodman e Gilman, 1996; Rang e cols., 1997).

A afinidade pelos diferentes receptores varia de acordo com os opióides endógenos estudados: derivados da proencefalina (por exemplo, meta-encefalina) apresentam afinidade para os receptores μ e δ , enquanto os peptídeos derivados da prodinorfina (por exemplo, α -neoendorfina) se ligam predominantemente aos receptores do tipo κ e os derivados da proopiomelanocortina (β -endorfina) se ligam tanto aos receptores μ quanto δ (Goodman e Gilman, 1996; Rang e cols., 1997).

Embora sejam entidades moleculares distintas, as três classes de receptores opióides citadas anteriormente compartilham algumas características comuns: freqüentemente são encontradas nas terminações nervosas pré-sinápticas cuja ação resulta em diminuir a liberação de neurotransmissores excitatórios, ou seja, exerceriam uma modulação inibitória sob a transmissão sináptica; e seriam receptores acoplados à proteína G, podendo regular o sistema de sinalização transmembrana (como exemplos: regulação da adenil ciclase, canais iônicos e fosfolipases). A ativação de receptores μ e δ pode promover hiperpolarização de membrana (através da ativação de canais de potássio) ou inibir a adenil ciclase. Já a ativação de receptores κ altera a atividade de canais de cálcio e pode promover inibição voltagem-dependente (Goodman e Gilman, 1996; Rang e cols., 1997).

2.1 Opióides e comportamento ingestivo

Antagonistas opióides, como naloxona e naltrexona, administrados sistêmica ou centralmente reduzem a ingestão de água induzida por injeção central ou periférica de ANG II (Brown e cols., 1981; Siviy e cols., 1981; Summy-Long e cols., 1981; Rowland, 1982; Izumi, 1991; Yu e cols., 1997). Injeção sistêmica de naloxona reduziu de forma dose dependente a ingestão de salina hipo e hipertônica (Cooper e Gilbert, 1984), enquanto que a administração central de naltrexona reduziu a ingestão de salina hipotônica, mas não a ingestão de salina hipertônica induzida por privação hídrica (Bodnar e cols., 1995).

Em relação à ingestão de alimento, observou-se que morfina injetada no núcleo accumbens aumenta a ingestão de alimento (Soderpalm e Berridge, 2000), porém de acordo com a condição fisiológica do animal, a ativação de mecanismos opióides pode ter efeitos diferentes, sendo que a administração de morfina reduziu e aumentou a ingestão de alimento e água em animais, respectivamente, privados de alimento e saciados (Sanger e McCarthy, 1980). Injeção icv crônica de β -endorfina promoveu um aumento, embora de curta duração, na ingestão de alimento e água (Hill e cols., 2002). Em ratos privados de alimento, β -endorfina estimula ingestão de água quando injetada nos núcleos paraventricular e ventromedial do hipotálamo e globus pallidus, enquanto que injeções de naloxona nestas mesmas áreas reduzem a ingestão de alimento (Gosnell e cols., 1986).

Portanto, nota-se um envolvimento de mecanismos opióides no controle do comportamento ingestivo.

3. Núcleo parabraquial lateral (NPBL)

O NPBL é uma estrutura pontina localizada na porção dorsolateral do pedúculo cerebelar superior, sendo que este núcleo possui conexões com áreas prosencefálicas envolvidas no controle do balanço hidroeletrólítico, como núcleos específicos do hipotálamo (ventromedial, dorsomedial, paraventricular e núcleo supraóptico) e amígdala, além de receber projeções aferentes da área postrema (AP) e da porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm) (Ciriello e cols., 1984; Shapiro e Miselis, 1985; Herbert e cols., 1990; Krukoff e cols., 1993; Jhamandas e cols., 1996). Assim, um papel importante do NPBL seria integrar as informações

ascendentes do NTSm e AP que por sua vez poderiam influenciar a atividade das áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico.

3.1 NPBL e comportamento ingestivo

Ao longo do núcleo parabraquial (NPB) desde áreas rostrais tipicamente consideradas como sendo viscerais até áreas mais caudais associadas à função gustatória há neurônios responsivos à distensão gástrica, sugerindo um envolvimento do NPB na integração de sinais tanto de sabor quanto viscerais relacionados ao controle da ingestão (Baird e cols., 2001).

O papel inibitório do NPBL sobre a ingestão de água e sódio tem sido demonstrado em vários estudos. Lesões eletrolíticas ou químicas (ácido ibotênico) e injeção de lidocaína no NPBL aumentaram a ingestão de água induzida por injeção central ou periférica de ANG II, bem como por outros estímulos relacionados com a formação de ANG II (Ohman e Johnson, 1989; Menani e cols., 1995; Ohman e Johnson, 1995), sugerindo um papel inibitório do NPBL sobre o controle da ingestão de água. Lesão da porção gustatória do NPB aboliu a expressão comportamental do apetite ao sódio (Flynn e cols., 1991) e promoveu um maior consumo de quinino, sacarose e NaCl (Flynn e cols., 1991a), sugerindo um papel do NPB também para o controle da ingestão de sódio e sacarose. Além disso, a administração de antagonista de receptor serotoninérgico (metisergida) no NPBL aumentou a ingestão de água e de solução hipertônica de cloreto de sódio induzidas por depleção de sódio, tratamento com injeções subcutâneas do diurético furosemide + captopril (inibidor da enzima conversora de angiotensina, em baixas doses) e tratamento com deoxicorticosterona (DOCA - composto esteróide com propriedades semelhantes a aldosterona), enquanto que injeções bilaterais do agonista serotoninérgico DOI promoveu redução dessa ingestão (Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; De Gobbi e cols., 2000). Esses resultados sugerem a presença de um mecanismo serotoninérgico inibitório da ingestão de água e sódio no NPBL. Há ainda no NPBL, o mecanismo colecistocinérgico que também exerce um papel inibitório sobre a ingestão de água e sódio (Menani e Johnson, 1998) e a ativação de mecanismos gabérgicos no NPBL foi capaz de induzir ingestão de sódio e água em animais saciados (Callera e cols., 2005). Além disso, ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL promoveu um aumento da ingestão de NaCl hipertônico e água em ratos submetidos ao tratamento com furosemide + captopril (Andrade e cols., 2004).

O NPBL não participa apenas do controle da ingestão de sódio e de água, mas também da ingestão de alimento. Administração de midazolam no NPBL promoveu um aumento da ingestão alimentar (Soderpalm e Berridge, 2000) e no NPB aumentou o consumo de dieta pastosa em animais saciados (Higgs e Cooper, 1996). Ativação direta ou indireta de receptores 5HT_{1B} no NPBL reduziu a consumo de alimento, sugerindo uma participação desse núcleo pontino na regulação serotoninérgica da alimentação e saciedade (Lee e cols., 1998; Simansky e Nicklous, 2002).

O NPB também está envolvido no controle da ingestão de sacarose, sendo que a ingestão voluntária de sacarose induziu expressão da proteína c-fos na parte medial e lateral do NPB (Streefland e cols., 1996), assim como infusões intraorais e intragástricas de sacarose, mas não sacarina, induzem forte expressão de c-fos nos subnúcleos externo-laterais do NPB rostral (Yamamoto e Sawa, 2000). Administração de midazolam no NPB promoveu um aumento da ingestão de sacarose 3% em ratos saciados (Higgs e Cooper, 1996).

3.2 NPBL e regulação cardiovascular

Estudos sugerem que o NPBL receberia aferências da AP/NTSm que poderiam conduzir informações da atividade de pressorreceptores arteriais e/ou cardiopulmonares as quais poderiam modular a ingestão de água e sódio e sugerindo um envolvimento do NPBL no controle cardiovascular (Johnson e Edwards, 1990, Thunhorst e Johnson, 1994, Thunhorst e cols, 1994).

Estimulação elétrica ou injeção de glutamato nas regiões lateral e medial do NPB, bem como administração de lidocaína no NPBL, promoveram um aumento da pressão arterial média - PAM (Paton e cols., 1990; Menani e cols., 1995). Além disso, já foi observada uma influência modulatória do NPB no processamento das informações cardiovasculares aferentes do NTS (Felder e Mifflin, 1988). Alterações de pressão sanguínea ou volume promoveram expressão da proteína c-fos nos subnúcleos centro, dorso e externo lateral, mas não nas porções externo medial, interno ou ventrolateral do NPB (Rocha e Herbert, 1996). Em situações de hipotensão hemorrágica, o NPB ventrolateral é essencial para a restauração da PA normal, enquanto que o NPBL é essencial para a expressão completa da bradicardia que acompanha a hipotensão (Blair e cols., 2001). Estes resultados sugerem um

envolvimento do núcleo parabraquial tanto para a regulação cardiovascular quanto volume sanguíneo.

3.3 NPBL e GABA

Estudo de Guthmann e cols. (1998) demonstrou a presença de um denso plexo de varicosidades imunorreativas para o GABA ao longo do complexo parabraquial/Kolliker-Fuse, sendo que o processamento neural nessa região estaria sob forte inibição gabaérgica. Tanto receptores GABA_A quanto GABA_B estão presentes no NPBL (Christie e North, 1988; Araki e cols., 1992), sendo que o GABA atuaria como um neurotransmissor inibitório tanto na parte gustatória quanto visceral do NPBL, sendo seus efeitos mediados em parte por receptores GABA_A (Kobashi e Bradley, 1998).

Estudo anterior mostrou um envolvimento de mecanismos gabaérgicos no NPBL no controle da ingestão de água e sódio, sendo que injeções bilaterais de muscimol no NPBL induz intensa ingestão de solução hipertônica de NaCl (0,3 M) acompanhada de um aumento na ingestão de água, sem alterar a ingestão de alimento, em ratos saciados (Callera e cols., 2005).

3.4 NPBL e opióides

Estudos neuroanatômicos mostraram que neurônios do NPBL expressam receptores opióides do tipo μ (Christie e North, 1988) e no NPBL já foram encontrados além dos receptores μ também receptores δ (Xia e Haddad, 1991). Imunorreatividade para encefalina foi observada na região dorsolateral do NPBL (Milner e cols, 1984), sendo que o NPBL recebe projeções do NTS de neurônios imunorreativos para encefalina (Maley e Pannenton, 1988).

Já um estudo funcional mostrou um possível envolvimento de mecanismos opióides no NPBL para o comportamento ingestivo, sendo que injeções de agonista de receptor opióide do tipo μ no NPBL aumentaram a ingestão de alimento em ratos saciados, sendo este efeito abolido pela administração prévia de naloxona (Wilson e cols., 2003).

4. Marcadores de atividade celular: proteína c-fos

O estudo da expressão da proteína c-fos tem sido utilizado como uma ferramenta para se estudar a ativação neuronal e a ativação deste proto-oncogene pode ser considerada como a ponte de ligação entre estímulos externos e alterações fenotípicas em células cerebrais (Herrera e Robertson, 1996).

Diferentes estímulos podem modular a função celular de diferentes maneiras podendo, por exemplo, afetar o funcionamento celular por meio da regulação da expressão gênica (Sheng e Greenberg, 1990; Herrera e Robertson, 1996). Genes que são ativados rapidamente após a estimulação celular e que não são inibidos por inibidores de síntese proteica são denominados de genes de expressão imediata (IEGs: *immediate early genes*) (Morgan e Curran, 1989; Sheng e Greenberg, 1990) e as proteínas codificadas por eles podem atuar como fatores de transcrição que se ligam em seqüências específicas de genes alvos, modulando sua transcrição, e conseqüentemente a expressão destes genes alvos (Tsay e cols., 1988; Beato, 1989; Sheng e Greenberg, 1990), podendo promover alterações bioquímicas de longa duração envolvendo a síntese de novas proteínas. Assim, os genes alvos alterariam o fenótipo da célula e, portanto, estímulos externos poderiam alterar a expressão proteica da célula (Sheng e Greenberg, 1990; Shen e cols., 1995; Herrera e Robertson, 1996). Dentre os IEGs conhecidos, os mais estudados são os proto-oncogenes c-fos e c-jun.

Assim sendo, estímulos que promovem alterações do volume e/ou osmolaridade plasmática, ativação dos receptores de neurotransmissores, incluindo os envolvidos no controle do equilíbrio hidroeletrólítico, podem levar à expressão da proteína c-fos e fornecer informações importantes sobre as possíveis áreas envolvidas no comportamento estudado.

OBJETIVOS

Sabendo-se da presença de diferentes mecanismos neurais, entre eles os mecanismos gabaérgicos e opióides, no NPBL envolvidos no controle do equilíbrio hidroeletrólítico, foram objetivos deste trabalho:

1. estudar a participação dos receptores GABA_A e GABA_B nos efeitos natriorexigênicos e dipsogênicos decorrentes da ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio;
2. os efeitos da ativação gabaérgica no NPBL na expressão da proteína c-fos em ratos saciados ou depletados de sódio, com e sem acesso à solução de NaCl;
3. investigar os efeitos da lesão aguda do núcleo do trato solitário comissural (NTSc - área que apresentou maior expressão da proteína c-fos em ratos saciados sem acesso ao sódio) e da região AV3V (importante área envolvida no controle do equilíbrio hidroeletrólítico) sobre o efeito natriorexigênico e a ingestão de água induzidos pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados;
4. verificar os efeitos da inibição de receptores adrenérgicos α_2 e opióides, bem como a ativação de mecanismos serotoninérgicos, no NPBL sobre os efeitos da ativação gabaérgica no NPBL na ingestão de NaCl e água em ratos saciados;
5. estudar a participação de mecanismos opióides do NPBL sobre a ingestão de sódio e água em ratos saciados ou depletados de sódio;
6. verificar os efeitos da ativação gabaérgica do NPBL sobre a pressão arterial e excreção urinária.

MÉTODOS

1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman fornecidos pelo Biotério da Faculdade de Odontologia de Araraquara, UNESP ou ratos Sprague Dawley da Companhia Charles River (Austrália) com pesos em torno de 300 g.

2. Cirurgia cerebral

Para o implante de cânulas cerebrais ou lesões eletrolíticas, os ratos foram anestesiados com ketamina (80 mg/kg de peso corporal) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e bregma foram utilizados 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. Nestes pontos foi feita uma trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo um orifício de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. No NPBL foram implantadas cânulas de aço inoxidável de 12 x 0,5 mm d.i. bilateralmente, orientadas de acordo com as seguintes coordenadas: 9,4 mm caudal ao bregma, 2,2 mm lateral à linha mediana e 4,3 mm abaixo da dura-máter. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com parafusos e resina acrílica.

Para a lesão eletrolítica da região AV3V, os animais também foram fixados em um aparelho estereotáxico (Kopf Instruments). O crânio dos animais foi nivelado no plano horizontal ajustando-se a altura da sutura bregmática e lambda. Após o posicionamento da cabeça foi feita uma incisão longitudinal da pele da cabeça e do tecido subcutâneo. Determinado os pontos de introdução do eletrodo, foi feita a trepanação do crânio com o auxílio de uma broca odontológica. Por esse orifício foi introduzido um eletrodo de aço inoxidável de 0,4 mm de diâmetro com 0,5 mm de ponta livre. Para a lesão da região AV3V o eletrodo foi posicionado na linha média, sobre o bregma e introduzido a 6,8 mm abaixo da dura mater. A corrente elétrica utilizada foi de 2 mA por 10 segundos.

Para lesão do NTSc, os animais foram adaptados a um aparelho

estereotáxico e a cabeça dos animais foi posicionada em ângulo de aproximadamente 45°. A musculatura da nuca foi cuidadosamente rebatida expondo o occipital e a membrana atlanto-occipital. Após a separação da dura-máter do osso occipital, este foi parcialmente removido utilizando-se um osteótomo. A membrana atlanto-occipital foi perfurada e a dura-máter rebatida, expondo-se assim, o *calamus scriptorius*, que foi então utilizado como ponto de referência para as seguintes coordenadas estereotáxicas: 0,0 mm e 0,5 mm caudal e 0.0 mm lateral ao *calamus scriptorius* e 0,3 e 0,2 mm ventral a superfície dorsal do bulbo no 1º e 2º pontos de lesão, respectivamente. Em cada ponto de lesão eletrolítica, foram passadas duas correntes elétricas de 1 mA por 5 segundos, com intervalo de 30 segundos entre elas. Após a lesão, o músculo e a pele foram suturados.

Outros animais foram submetidos aos mesmos procedimentos de cirurgia cerebral a que foram expostos os animais lesados, exceto que não foram submetidos à passagem de corrente elétrica (lesão fictícia).

Os animais com lesão ou com lesão fictícia tiveram também cânulas implantadas no NPBL de acordo a técnica descrita acima.

Após a cirurgia cerebral, os ratos receberam uma injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e permaneceram em recuperação em suas gaiolas por, pelo menos, 5 dias antes de serem iniciados os experimentos. Exceção feita para os animais com lesão do NTSc ou região AV3V, sendo que os experimentos foram realizados 1 e 3 dias após as cirurgias cerebrais.

3. Injeções das drogas no cérebro

As drogas dissolvidas em salina fisiológica (muscimol, baclofen, CGP 35348, DOI, β -endorfina) ou propilenoglicol/água 2:1 (bicuculina, RX 821002 e naloxona) foram injetadas no cérebro dos ratos num volume de 0,2 μ l. Para tanto, foi utilizada seringa Hamilton (5 μ l) conectada com um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no cérebro pela cânula guia previamente fixada no cérebro. A cânula injetora (0,3 mm diâmetro) foi 2 mm mais longa do que a cânula guia.

4. Drogas injetadas

Foram utilizadas as seguintes drogas:

- hidrobrometo de muscimol (RBI - Sigma, 0,5 nmol/0,2 µl);
- bicuculina (Tocris, 1,6 nmol/0,2 µl);
- baclofen (RBI - Sigma, 0,5 nmol/0,2 µl);
- ácido 3-aminopropil(dietoximetil) fosfênico - CGP 35348 (Tocris, 20 e 50 nmol/0,2 µl);
- hidrobrometo de 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina - DOI (RBI, 5 µg/0,2 µl);
- hidrocloreto 2[2(2-metoxi-1,4-benzodioxanil-imidazol] - RX 821002 (RBI, 10 nmol/0,2 µl);
- hidrocloreto de naloxona (Tocris, 20, 40 e 60 µg/0,2 µl);
- β endorfina (Sigma, 2 nmol/0,2 µl);
- furosemide (Sigma, 20 mg/kg de peso corporal) sc;

As doses utilizadas foram retiradas de dados da literatura, bem como de estudos realizados no laboratório (Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; Andrade e cols., 2004; Callera e cols., 2005).

Salina fisiológica ou propilenoglicol/água (2:1) foi injetada nos experimentos controles.

5. Medida da ingestão de água e de NaCl 0,3 M

5.1 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos

Após a cirurgia, os animais tiveram cinco dias de recuperação, tendo à disposição ração, água e NaCl 0,3 M. No dia do experimento buretas graduadas contendo água e NaCl 0,3 M estiveram à disposição dos animais. Quinze minutos após as injeções no NPBL foram iniciadas as medidas da ingestão de água e NaCl 0,3 M. A ingestão de água e sódio foi medida a cada 30 minutos durante 4 h.

Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de registro da ingestão de água e de NaCl 0,3 M os ratos não tiveram acesso à ração.

5.2 Ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos submetidos à depleção de sódio por 24 h

A depleção de sódio foi feita pelo tratamento com o diurético furosemide (20 mg/kg de peso corporal) subcutaneamente (sc), seguido de manutenção dos ratos por 24 h com alimento deficiente em sódio (fubá) e água *ad libitum* antes de se iniciarem as medidas de ingestão de água e de NaCl 0,3 M. Para o registro da ingestão de água e de NaCl 0,3 M foram utilizados tubos graduados (divisão de 0,1 ml). Quinze minutos após as injeções bilaterais no NPBL, água e NaCl 0,3 M foram oferecidos aos animais e as ingestões foram medidas nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min.

Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de registro da ingestão de água e de NaCl 0,3 M, os ratos não tiveram acesso à ração. Os animais que foram utilizados para o estudo da ingestão de NaCl, além de água, tiveram à disposição NaCl 0,3 M, desde, pelo menos, 5 dias antes do início dos experimentos.

5.3 Ingestão não regulatória de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos

Os animais foram colocados em gaiolas individuais com água e ração disponíveis por 24 h, sendo que durante duas horas por dia (entre 12 – 14 h), os animais também tiveram acesso a buretas graduadas com NaCl 0,3 M disponível para condicioná-los a ingerir sódio. Aproximadamente 3 dias após o início do condicionamento, os animais foram submetidos à primeira depleção de sódio por 24 h (furosemide sc + dieta deficiente de sódio e água por 24 h), sendo que após 3 dias, foram submetidos à segunda depleção de sódio. Aproximadamente 1 semana após à segunda depleção, os animais foram submetidos à cirurgia estereotáxica para implante de cânulas no NPBL, sendo aguardado um período de aproximadamente 7 dias (período necessário para obtenção de uma ingestão de NaCl 0,3 M/2 h mais uniforme) para o início dos experimentos.

As injeções bilaterais no NPBL foram realizadas quinze minutos antes do oferecimento das buretas contendo NaCl 0,3 M. A ingestão de água e NaCl 0,3 M foi medida nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min.

Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de registro da ingestão de água e de NaCl 0,3 M, os ratos não tiveram acesso à ração.

6. Medida da ingestão de água, sacarose 2% e/ou NaCl 0,3 M

6.1 Ingestão de água e sacarose 2% em ratos saciados e normovolêmicos

Durante o período de aproximadamente cinco dias de recuperação da cirurgia estereotáxica, os animais tiveram à disposição ração, água e sacarose 2%. No dia do experimento buretas graduadas contendo água e sacarose 2% estiveram à disposição dos animais. Quinze minutos após as injeções no NPBL foram iniciadas as medidas da ingestão de água e sacarose 2%, feitas a cada 30 minutos durante 4 h.

Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de registro da ingestão de água e de sacarose 2% os ratos não tiveram acesso à ração.

6.2 Ingestão de água, NaCl 0,3 M e sacarose 2% em ratos submetidos à depleção de sódio por 24 h

A ingestão de água, NaCl 0,3 M e sacarose 2% foi registrada nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min em animais depletados de sódio. O protocolo experimental foi semelhante ao item 5.2, com a diferença que os ratos tinham 3 buretas disponíveis: água, NaCl 0,3 M e sacarose 2%.

Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 72 horas entre dois experimentos nos mesmos animais. Durante o período de registro da ingestão de água, NaCl 0,3 M e sacarose 2%, os ratos não tiveram acesso à ração.

Os animais que foram utilizados para o estudo da ingestão de sacarose e NaCl, além de água, tiveram à disposição NaCl 0,3 M e sacarose 2%, desde, pelo menos, 5 dias antes do início dos experimentos.

7. Medida da ingestão de água

Durante o período de registro da ingestão de água os ratos não tiveram acesso à ração. Foi guardado sempre um intervalo de, no mínimo, 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

7.1 Ratos saciados e normovolêmicos

Após a cirurgia, os animais tiveram cinco dias de recuperação, tendo à disposição ração e água. No dia do experimento buretas graduadas contendo água estiveram à disposição dos animais. Quinze minutos após as injeções no NPBL foram iniciadas as medidas da ingestão de água. A ingestão de água foi medida a cada 30 minutos durante 4 h.

7.2 Ratos privados de água por 24 h

Água, mas não ração, foi retirada dos animais. Vinte e quatro h após a retirada da água, foi removida a ração e feitas as injeções no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, foram iniciadas as medidas de ingestão de água. A ingestão de água foi medida a cada 30 minutos durante 4 h, exceção feita para a primeira medida que ocorreu aos 15 min.

8. Medida da ingestão de água, NaCl 0,3 M e alimento

8.1 Ratos saciados e normovolêmicos

O protocolo experimental foi semelhante ao descrito no item 5.1. No dia do experimento buretas graduadas contendo água e NaCl 0,3 M e recipientes contendo ração previamente pesada foram oferecidos aos animais. Quinze minutos após as injeções no NPBL foram iniciadas as medidas da ingestão de água, NaCl 0,3 M e ração. A ingestão de água, sódio e ração foi medida a cada 30 minutos durante 4 h.

8.2 Ratos privados de alimento por 24 h

O protocolo experimental foi semelhante ao descrito anteriormente, com a diferença de que os animais ficaram 24 h privados de ração.

9. Medida do volume urinário e excreção de sódio (Na⁺) e potássio (K⁺) urinário

Ratos saciados e normovolêmicos foram mantidos em gaiolas metabólicas tendo água, NaCl 0,3 M e ração disponíveis.

9.1 Ratos sem acesso a água e NaCl 0,3 M durante o experimento

Água, NaCl 0,3 M e ração foram removidas e as gaiolas foram lavadas apenas com água para eliminar resíduos de urina e fezes. Os animais receberam injeções bilaterais no NPBL e, imediatamente após as injeções no NPBL, iniciou-se a coleta de urina. A medida do volume urinário foi realizada a cada 30 min durante 4 h.

As amostras de urina foram analisadas no analisador de Na⁺/K⁺ Nova 1 (Nova Biomedical).

9.2 Ratos com acesso a água e NaCl 0,3 M durante o experimento

Foi realizado um protocolo experimental semelhante ao do item 9.1, com a diferença de que neste protocolo, imediatamente após as injeções no NPBL, os animais tiveram acesso a buretas graduadas contendo água e NaCl 0,3 M.

Os mesmos animais também foram submetidos a um outro experimento no qual receberam 8 sobrecargas intragástricas com intervalos de 30 min, contendo água e NaCl 0,3 M no mesmo volume que eles ingeriram durante os experimentos com injeções bilaterais no NPBL.

Durante os experimentos tanto para o item 9.1 quanto para o item 9.2, os animais não tiveram acesso à ração. Foi aguardado sempre um intervalo de, no mínimo, 48 horas entre dois experimentos nos mesmos animais.

10. Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM) foi registrada em ratos não anestesiados submetidos à canulação prévia (1 dia) da artéria femoral com um tubo de polietileno PE 10, o qual foi conectado a um tubo de polietileno PE 50 que, conduzido subcutaneamente, foi exteriorizado pelo dorso do animal. O tubo de PE 50 foi conectado a um transdutor de pressão (Stathan P 23 Db) acoplado a um polígrafo

de registro (Narcotrace 40, Narco Bio Systems). A frequência foi registrada por um biotacômetro (Narco Bio Systems) acionado pelos pulsos da pressão arterial. O registro da PA e FC foi realizado através de um sistema computadorizado de aquisição de dados PowerLab.

11. Histologia cerebral para localização das áreas cerebrais estudadas

Terminados os experimentos, os ratos foram profundamente anestesiados e submetidos a uma perfusão cerebral por meio de injeção no coração de solução salina tamponada (50 ml), seguida de solução de formalina 10% (50 ml). A seguir, os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (50 μ m de espessura) foram feitos nos pontos de injeção com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos, montados em lâmina foram corados pelo método Giemsa e analisados para se localizar os pontos das injeções no NPBL e as áreas de lesão no NTSc e região AV3V.

12. Imunoistoquímica

Ao término dos experimentos abaixo relacionados, os animais foram anestesiados com tiopental sódico e em seguida perfundidos com salina em tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) seguida da perfusão com paraformaldeído (PFA) 4% cada um num volume final de aproximadamente 300 ml. O cérebro foi removido e mantido numa solução de PFA 4% em temperatura ambiente. A seguir, o cérebro foi transferido para uma solução de sacarose 20% (diluída em tampão fosfato) onde foi mantido por no mínimo 12 h na geladeira. Após a execução de todas estas etapas, os cérebros foram cortados transversalmente (60 μ m de espessura) em criostato. A seguir foram executados dois procedimentos imunohistoquímicos:

12.1 Determinação apenas da expressão da proteína c-fos:

Este procedimento foi realizado em ratos Holtzman que foram sacrificados 2 h após terem recebido ou não injeções bilaterais de salina, muscimol ou baclofen no NPBL. Durante as 2 h, os animais não tiveram acesso a água, NaCl 0,3 M ou ração.

Os cortes obtidos foram lavados uma vez com tampão fosfato-salina (PBS) 0,1 M, durando 5 min a lavagem. Foram transportados para uma solução contendo o

soro bloqueador (Vector Laboratories), PBS 0,1 M e o anticorpo c-fos (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:4000, ficando sob agitação por um período de 22 horas na temperatura ambiente. Os cortes foram então lavados três vezes com PBS 0,1 M. Em seguida, foram transportados para outra solução contendo soro bloqueador, PBS 0,1 M e o anticorpo secundário anti-coelho biotilado (Vectastain Elite – ABC Kit, PK 6101, Vector Laboratories) na diluição de 1:400. Ficaram sob agitação branda por 1 h na temperatura ambiente. Foi feita nova lavagem dos cortes (3 vezes) com PBS 0,1 M. Após a lavagem, os cortes foram transferidos para a solução ABC (Vectastain Elite – ABC Kit, PK 6101, Vector Laboratories) ficando sob agitação suave por 1 h na temperatura ambiente. Após 1 h, os cortes foram novamente lavados em PBS (3 vezes). Os cortes foram colocados na solução de diaminobenzidina (DAB - 45 mg/100 ml) + peróxido de hidrogênio (Merck – 30% p/p; 90 µl/100 ml) por um período de 10 min e então lavados 2 vezes em PBS 0,1 M para parar a reação de cor.

Os cortes foram montados em lâminas e deixados para secar por 12 h. Foram, então, desidratados e cobertos com lamínulas.

Após a montagem, as lâminas foram analisadas em microscópio, com subsequente captura das imagens e contagem das células com resposta positiva para a proteína c-fos utilizando o programa Image Pro Plus. Foram analisadas as seguintes áreas centrais: órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT), núcleo preóptico mediano dorsal (NPOMd), núcleo preóptico mediano ventral (NPOMv), órgão subfornicial (OSF), núcleo paraventricular (NPV), núcleo supraóptico (NSO), amígdala (Amg), núcleo parabraquial lateral (NPBL), área postrema (AP), núcleo do trato solitário comissural (NTSc). Os resultados das áreas bilaterais NPV, NSO, Amg e NPBL foram representados como a somatória de células positivas para a proteína c-fos presentes nos dois lados da área analisada.

12.2 Determinação da expressão da proteína c-fos + marcação de neurônios ocitocinérgicos ou serotoninérgicos:

Segundo o protocolo experimental foi caracterizado o fenótipo neuroquímico dos neurônios imunorreativos para c-fos (Fos) por meio da técnica de localização imunológica nuclear de Fos (Fos) em combinação com a técnica de localização imunológica citoplasmática dos neuromoduladores como ocitocina (OT) e serotonina (5HT). Este procedimento foi realizado em ratos Sprague Dawley (Companhia

Charles River da Austrália) saciados ou depletados de sódio que foram sacrificados 3 h após terem recebido ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Durante as 3 h, os animais tiveram acesso a água e NaCl 0,3 M, mas não à ração. Apenas um dos grupos de animais depletados teve acesso à água, mas não ao NaCl 0,3 M ou ração.

Os cortes obtidos foram lavados uma vez com tampão fosfato (PB) 0,1 M, durando 5 min a lavagem. Foi, então, feito o bloqueio das ligações inespecíficas com soro de cavalo (10%) em PB 0,1 M sob agitação por um período de no mínimo 1 h. Os cortes foram então lavados em PB 0,1 M por 3 vezes durando 5 min cada. Os cortes foram incubados a temperatura ambiente durante toda a noite numa solução contendo PB 0,1 M + Triton X + soro bloqueador + anticorpo primário anti c-fos (Santa Cruz Biotechnology) na diluição de 1:50000. No dia seguinte, os cortes foram novamente lavados 3 vezes em PB, e então foram colocados numa solução contendo PB 0,1 M + soro bloqueador + anticorpo secundário (Kit Vecstastain – PK 4001, Vector Laboratories) na diluição de 1:200, na qual ficaram sob agitação durante 1 h. Após 1 h, os cortes foram novamente lavados e então transferidos para a solução ABC (Kit Vecstastain – PK 4001, Vector Laboratories) ficando sob agitação suave por mais 1 h na temperatura ambiente. Com o objetivo de diferenciar a coloração da marcação imunológica nuclear da citoplasmática, na reação para marcação da proteína c-fos foi adicionado sulfato de níquel que deu ao produto da reação nuclear uma coloração violeta escuro. Para tanto, 1 h após os cortes terem sido colocados na solução ABC, eles foram novamente lavados em PB (2 vezes) e depois foram lavados 3 vezes em tampão TRIS (12,12 g de ácido clorídrico + 2,8 g de base + 2 l de água destilada), para só então serem transferidos para a solução contendo tampão TRIS + sulfato de níquel (40 mg/100 ml) + diaminobenzidina (DAB – 50 mg/100 ml) onde ficaram sob agitação por 10 min. Após os 10 min, foi então adicionado à solução, peróxido de hidrogênio (Sigma – 15 µl/100 ml), e aguardados mais 6 min. Os cortes foram então primeiramente lavados 2 vezes em tampão TRIS e em seguida 3 vezes em PB 0,1 M (lavagens sob agitação com duração de 5 min cada).

Para os cortes destinados apenas à marcação da proteína c-fos, após a última lavagem em PB, eles foram montados em lâminas e deixados para secar por no mínimo 12 h, para então serem desidratados e cobertos com lamínulas. Para os cortes destinados à dupla marcação Fos + OT e Fos + 5HT, após a última lavagem

em PB, eles foram colocados numa solução contendo PB 0,1 M + Triton X + anticorpo anti OT (Chemicon, 1:5000) ou anti 5HT (Biogenesis, 1:3000) no qual permaneceram sob agitação branda durante toda a noite à temperatura ambiente. No dia seguinte, os cortes foram lavados 3 vezes em PB e então seguiu-se o procedimento já descrito anteriormente para a ligação do anticorpo secundário seguida da reação na solução ABC. Após a solução ABC, os cortes foram lavados 3 vezes em PB e então adicionados numa solução contendo PB 0,1 M + DAB (50 mg/100 ml) na qual ficaram sob agitação por 10 min, sendo adicionado em seguida à solução, peróxido de hidrogênio (Sigma – 30 µl/100 ml), e aguardou-se mais 6 min. Os cortes foram então primeiramente lavados 3 vezes em PB e então as lâminas foram montadas para posterior desidratação e colocação da lamínula.

Após a montagem das lâminas elas foram analisadas em microscópio, com subsequente captura das imagens e contagem manual das células marcadas.

As áreas analisadas para a dupla marcação Fos + OT foram o NPV e NSO. Em relação à marcação Fos + 5HT foram analisadas as seguintes áreas: rafe dorsal anterior (RDa), mediana (RDm) e posterior (RDp); núcleo mediano da rafe porção anterior (RMna) e medial (RMnm); rafe pontina (RPn); rafe magnus (RMg) e rafe palidus (RPa). As áreas analisadas para a contagem das células com resposta positiva apenas para a proteína c-fos foram, além das já mencionadas no item 11.1, o núcleo da estria terminal ventral (BNSTv) e dorsal (BNSTd), núcleo central (NCA), basolateral (NBLA) e medial (NMA) da amígdala, núcleo parabraquial medial (NPBM), núcleo do trato solitário comissural lateral (NTScl), núcleo do trato solitário rostral (NTSr). Os resultados das áreas bilaterais BNSTv, BNSTd, NPV, NSO, amígdala, NPBL, NPBM, NTSr e NTScl foram representados como a somatória de células positivas para a proteína c-fos ou c-fos + OT presentes nos dois lados da área analisada.

13. Apresentação dos resultados e análise estatística

Os resultados foram tabelados. A média e o erro padrão da média foram representados em gráficos. Análise de variância e o teste de Newman Keuls ou Fisher's LSD foram utilizados para as comparações entre diferentes tratamentos. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS

1. Efeitos da administração de bicuculina ou CGP 35348 + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos saciados e normovolêmicos.

Objetivo: verificar a participação dos receptores GABA_A e GABA_B no efeito do muscimol injetado bilateralmente no NPBL sobre a ingestão de sódio em ratos saciados.

As ingestões de água e de NaCl 0,3 M foram estudadas em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL saciados e normovolêmicos. Os ratos receberam injeções de veículo (propilenoglicol/água 2:1) ou salina ou CGP 35348 (antagonista de receptores GABA_B - 50 nmol/0,2 µl) ou bicuculina (antagonista de receptores GABA_A - 1,6 nmol/0,2 µl) bilateralmente no NPBL. Quinze minutos após a primeira injeção no NPBL, os ratos receberam injeções bilaterais no NPBL de muscimol (agonista de receptores GABA_A - 0,5 nmol/0,2 µl) e passados mais quinze minutos, tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram medidas a cada 30 min durante 4 h.

Foram utilizados grupos de ratos diferentes para o estudo da participação dos receptores GABA_A e GABA_B nos efeitos do muscimol. Cada grupo de ratos foi submetido a 4 tratamentos. Para o estudo do envolvimento dos receptores GABA_A os tratamentos foram os seguintes: veículo + salina; veículo + muscimol; bicuculina + salina; bicuculina + muscimol. Para o estudo do envolvimento dos receptores GABA_B os tratamentos foram: salina + salina; salina + muscimol; CGP 35348 + salina; CGP 35348 + muscimol.

Uma vez que a ingestão de sódio induzida pelas injeções bilaterais de muscimol no NPBL ocorre aproximadamente entre 90-120 min após as injeções no NPBL, foi investigado se ainda haveria uma participação direta de receptores GABA_A durante este efeito. Para tanto, em um outro grupo de animais, bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) foi injetada 1 h após as injeções de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. Os animais foram submetidos a 4 tratamentos: salina + veículo; muscimol + veículo; salina + bicuculina; muscimol + bicuculina.

Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos foi aleatória.

2. Efeitos da administração de CGP 35348 ou bicuculina + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos saciados e normovolêmicos.

Objetivo: verificar a participação dos receptores GABA_A e GABA_B no efeito do baclofen injetado bilateralmente no NPBL sobre a ingestão de sódio em ratos saciados.

Foi realizado um protocolo experimental semelhante ao descrito no item anterior, exceto que foi utilizado baclofen (agonista de receptores GABA_B - 0,5 nmol/0,2 µl) ao invés de muscimol no NPBL.

3. Participação de mecanismos gabaérgicos sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio por 24 h:

3.1 Efeitos da administração de bicuculina ou CGP 35348 + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos com depleção de sódio.

Objetivo: verificar a participação dos receptores GABA_A ou GABA_B do NPBL nos efeitos do muscimol na ingestão de sódio induzida por depleção de sódio.

As ingestões de água e de NaCl 0,3 M foram estudadas em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL submetidos à 24 h de depleção de sódio. Após as 24 h, os ratos receberam injeções de veículo (propilenoglicol/água 2:1) ou salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl) ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) bilateralmente no NPBL. Quinze minutos após as injeções dos antagonistas gabaérgicos, os ratos receberam injeções bilaterais no NPBL de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) e passados mais quinze minutos, tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M.

Cada grupo de ratos foi submetido a 4 tratamentos: veículo ou salina + salina; veículo ou salina + muscimol; bicuculina ou CGP + salina; bicuculina ou CGP + muscimol; bicuculina ou CGP + salina.

Foram utilizados grupos de ratos diferentes para o estudo da participação dos receptores GABA_A (grupo bicuculina) e GABA_B (grupo CGP) nos efeitos do muscimol sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos foi aleatória.

3.2 Efeitos da administração de CGP 35348 ou bicuculina + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl hipertônico em ratos com depleção de sódio.

Objetivo: verificar a participação dos receptores GABA_A ou GABA_B do NPBL nos efeitos do baclofen na ingestão de sódio induzida por depleção de sódio.

O protocolo é semelhante ao descrito anteriormente, exceto que foi injetado baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) ao invés de muscimol no NPBL.

3.3 Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água, NaCl hipertônico e sacarose 2% em ratos com depleção de sódio.

Objetivo: verificar a especificidade da ativação gabaérgica no NPBL para a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio.

As ingestões de água, NaCl 0,3 M e sacarose 2% foram estudadas em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL submetidos à 24 h de depleção de sódio. Após as 24 h, os ratos receberam injeções de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) bilateralmente no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os animais tiveram acesso à água, à solução de NaCl 0,3 M e de sacarose 2%. As ingestões de NaCl 0,3 M, sacarose 2% e água foram medidas nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min.

Cada grupo de ratos foi submetido a 3 tratamentos: salina; muscimol e baclofen injetados bilateralmente no NPBL. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos foi aleatória.

4. Participação de mecanismos gabaérgicos no NPBL sobre a ingestão não regulatória de NaCl 0,3 M.

Objetivo: verificar se a inibição de mecanismos gabaérgicos no NPBL afetaria a ingestão não regulatória de NaCl 0,3 M.

Ratos bilateralmente implantados no NPBL tiveram água e ração *ad libitum*. Diariamente, entre 12 e 14 h, a ração dos animais era retirada, e buretas graduadas contendo água e NaCl 0,3 M eram oferecidas para os animais. No dia do experimento, a ração era retirada, e os animais receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348; veículo ou bicuculina. Quinze minutos após as injeções centrais, buretas contendo água e sódio foram oferecidas aos animais e as medidas da ingestão de água e NaCl 0,3 M foram feitas nos tempos de 15, 30, 60 e 120 min.

Os animais foram submetidos a quatro tratamentos: salina; CGP 35348 (50 nmol/0,2 μ l); veículo; bicuculina (1,6 nmol/0,2 μ l).

Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos foi aleatória.

5. Alteração da atividade de áreas cerebrais após a administração bilateral de muscimol ou baclofen no NPBL.

Objetivo: verificar se alguma área prosencefálica (principalmente aquelas em que já se sabe que participam do controle da ingestão de água e sódio), da ponte ou do bulbo, poderia estar sendo ativada após injeções dos agonistas gabaérgicos no NPBL em condições experimentais diferentes.

5.1 Expressão da proteína c-fos após ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos que não tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Holtzman).

A expressão da proteína c-fos em áreas prosencefálicas, da ponte e do bulbo foi estudada em ratos normotensos e saciados que receberam injeções bilaterais de salina, muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL. Após as injeções no NPBL, aguardou-se cerca de 2 h (período no qual os animais não tiveram acesso à água ou NaCl 0,3 M), para então se anestesiarem os animais, perfundi-los, retirar os cérebros e realizar os procedimentos de imuno-histoquímica, segundo a metodologia descrita no item 11.1.

5.2 Expressão da proteína c-fos após ativação gabaérgica (muscimol) no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos ou depletados de sódio por 24 h que tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Sprague-Dawley – Companhia Charles River).

A expressão da proteína c-fos, bem como a dupla marcação para c-fos e neurônios ocitocinérgicos (c-fos + OT) ou serotoninérgicos (c-fos + 5HT), em diferentes áreas, foi estudada em ratos normotensos e saciados que receberam injeções de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL. Imediatamente após as injeções no NPBL, água e NaCl 0,3 M, mas não ração, foram oferecidas aos animais e permaneceram disponíveis até o momento dos animais serem anestesiados (3 h).

Outros animais foram submetidos a duas depleções de sódio obtidas pelo tratamento com o diurético LASIX – furosemide (20 mg/kg de peso corporal) seguido de manutenção dos ratos por 24 h com alimento deficiente em sódio e água *ad libitum*. Aproximadamente 3 dias após a primeira depleção, foi realizada a segunda depleção de sódio, sendo que após as 24 h, os ratos receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e imediatamente após as injeções centrais tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M até o momento dos animais serem anestesiados (3 h).

Foram estudados os seguintes grupos experimentais:

- 1) ratos depletados de sódio sem acesso à NaCl 0,3 M e sem injeções centrais;
- 2) ratos depletados de sódio que receberam injeções no NPBL de salina ou muscimol – todos os animais tiveram acesso ao NaCl 0,3 M;
- 3) ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções no NPBL de salina ou muscimol – todos os animais tiveram acesso ao NaCl 0,3 M.

Em todos os grupos, os animais tiveram livre acesso à água, mas não à ração. A expressão de c-fos, c-fos + OT ou c-fos + 5HT foi estudada em ratos saciados ou depletados de sódio que foram anestesiados e perfundidos imediatamente após o término do registro da ingestão de água ou sódio (3 h após as injeções centrais no NPBL). Os cérebros foram retirados e realizou-se os procedimentos de imuno-histoquímica, segundo a metodologia descrita no item 11.2.

6. Efeitos da lesão do NTSc sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M induzidas pela administração prévia de muscimol ou baclofen no NPBL em ratos normovolêmicos.

Objetivo: estudar a participação da região do NTS que apresentou maior expressão da proteína c-fos sobre as ingestões de água e sódio induzidas pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados.

Um dia após a lesão eletrolítica do NTSc ou lesão fictícia (lesão aguda), a ração dos animais foi removida e estes receberam injeções bilaterais de salina e foram medidas as ingestões de água e de sódio por 4 h. Após o término destas 4 h, baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) foi injetado bilateralmente no NPBL, e mediu-se novamente as ingestões de água e de sódio por 4h. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram medidas a cada 30 min durante 4 h.

No mesmo grupo de animais o mesmo protocolo descrito acima foi repetido no terceiro dia após a lesão do NTSc ou lesão fictícia, com a diferença de que, ao invés do baclofen, foi injetado muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) bilateralmente no NPBL.

7. Efeitos da lesão da região anteroventral do 3º ventrículo (AV3V) sobre as ingestões de água e de NaCl 0,3 M induzidas pela administração prévia de muscimol ou baclofen no NPBL em ratos normovolêmicos.

Objetivo: estudar a participação da região AV3V nas ingestões de água e sódio induzidas pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados.

O protocolo é semelhante ao descrito no item 6.

8. Efeitos da associação de RX 821002 ou DOI e muscimol injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Objetivo: estudar uma possível interação entre a ativação dos receptores gabaérgicos - GABA_A e os mecanismos adrenérgicos α_2 e serotoninérgicos no NPBL sobre a ingestão de água e sódio.

O protocolo é semelhante ao descrito no item 1, sendo que logo após a remoção da ração, ratos normovolêmicos receberam injeções bilaterais no NPBL de veículo ou RX 821002 (10 nmol/0,2 µl) seguidas 15 min após, por outra injeção de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. Quinze minutos após a injeção de muscimol (ou salina), se iniciou a medida da ingestão de água e solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram medidas a cada 30 min durante 4 h.

Um protocolo semelhante àquele em que se utilizou o RX 821002 foi utilizado para se estudar os efeitos do DOI (5 µg/0,2 µl) associado com muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL sobre ingestão de água e de sódio.

Foram utilizados grupos de ratos diferentes para cada uma das associações realizadas: RX821002 + muscimol ou DOI + muscimol. Para o estudo do antagonista de receptores adrenérgicos α_2 (RX821002), cada grupo de ratos foi submetido a quatro tratamentos: veículo + salina; veículo + muscimol; RX 821002 + salina; RX 821002 + muscimol.

Para o estudo da interação de mecanismos gabaérgicos com os mecanismos serotoninérgicos (DOI – agonista de receptores serotoninérgicos 5HT_{2A/2C}) os

animais foram submetidos a 4 tratamentos: salina + salina; salina + muscimol; DOI + salina; DOI + muscimol.

Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória, de tal forma que no final dos experimentos, todos os animais receberam todos os possíveis tratamentos.

9. Efeitos da associação de RX 821002 ou DOI e baclofen injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Objetivo: estudar uma possível interação entre a ativação dos receptores gabaérgicos – GABA_B e os mecanismos adrenérgicos α_2 e serotoninérgicos no NPBL sobre a ingestão de água e sódio.

O procedimento experimental foi definido como descrito no item anterior, com a diferença de que, ao invés de muscimol, os animais receberam injeções bilaterais de baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL.

10. Efeitos da associação de naloxona e muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Objetivo: estudar uma possível interação entre a ativação dos receptores gabaérgicos e os mecanismos opióides no NPBL sobre a ingestão de água e sódio.

O protocolo é semelhante ao descrito no item 1, sendo que logo após a remoção da ração, ratos normovolêmicos receberam injeções bilaterais no NPBL de veículo ou do antagonista de receptores opióide (naloxona) em diferentes doses, seguidas 15 min após, por outra injeção de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL. Quinze minutos após a injeção de muscimol (ou salina), se iniciou a medida da ingestão de água e solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram medidas a cada 30 min durante 4 h.

Para naloxona nas doses de 20 e 60 μ g/0,2 μ l, cada grupo de ratos foi submetido a seis tratamentos: veículo + salina; veículo + muscimol; naloxona 20 μ g + muscimol; naloxona 20 μ g + salina; naloxona 60 μ g + muscimol; naloxona 60 μ g + salina. Para o estudo da naloxona na dose de 40 μ g foi utilizado um outro grupo de

animais que foi submetido a quatro tratamentos: veículo + salina; veículo + muscimol; naloxona 40 µg + muscimol; naloxona 40 µg + salina. Para o grupo da naloxona nas doses de 20 e 60 µg, a análise estatística e a representação gráfica dos resultados foi feita comparando-se apenas 4 tratamentos, a saber: para naloxona na dose de 20 µg/ 0,2 µl: veículo + salina, veículo + muscimol, naloxona 20 + salina e naloxona 20 + muscimol; para naloxona na dose de 60 µg/ 0,2 µl: veículo + salina, veículo + muscimol, naloxona 60 + salina e naloxona 60 + muscimol.

Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória, de tal forma que no final dos experimentos, todos os animais receberam todos os possíveis tratamentos.

O procedimento experimental para o estudo da interação dos receptores GABA_B com os receptores opióides foi definido como descrito acima, com a diferença de que, ao invés de muscimol, os animais receberam injeções bilaterais de baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL.

11. Estudo da administração de β endorfina associada ou não à naloxona no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Objetivo: uma vez que injeções prévias do antagonista opióide aboliram o efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL, investigaram-se os efeitos da ativação opioidérgica no NPBL sobre a ingestão de água e sódio em ratos saciados.

Em ratos normovolêmicos e saciados, retirou-se a ração e os animais receberam injeções bilaterais no NPBL de salina ou do agonista de receptores opióides, β endorfina (2 nmol/0,2 µl). Em outro grupo de ratos, naloxona (antagonista de receptores opióides - 40 µg/0,2 µl) ou veículo (propilenoglicol/água 2:1) foi injetado bilateralmente no NPBL seguido 15 min após, por outra injeção de salina ou β endorfina (2 nmol/0,2 µl) no NPBL. Quinze minutos após a injeção de β endorfina (ou salina), se iniciou a medida da ingestão de água e solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram medidas a cada 30 min durante 4 h.

O primeiro grupo de ratos foi submetido a apenas 2 tratamentos: salina ou β endorfina, enquanto que o segundo grupo, foi submetido a 4 tratamentos: veículo +

salina; veículo + β endorfina; naloxona + salina; naloxona + β endorfina. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória.

12. Efeitos da administração de β endorfina no NPBL sobre a ingestão de água em ratos saciados e normovolêmicos.

Objetivo: verificar a especificidade da ativação opioidérgica no NPBL para a ingestão de solução hipertônica de NaCl em ratos saciados.

A ingestão de água foi estudada em ratos saciados e normovolêmicos com cânulas bilateralmente implantadas no NPBL que receberam injeções bilaterais de salina ou β endorfina (2 nmol/0,2 μ l) e 15 min após as injeções no NPBL, os animais tiveram acesso a buretas graduadas contendo água. As medidas de ingestão de água foram feitas a cada 30 min durante 4 h.

Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos nos diferentes experimentos foi aleatória.

13. Efeitos da administração de β endorfina no NPBL sobre a ingestão de água e sacarose 2% em ratos saciados e normovolêmicos.

Objetivo: verificar a especificidade da ativação opioidérgica no NPBL para a ingestão de solução hipertônica de NaCl em ratos saciados.

Realizou-se um protocolo experimental semelhante ao descrito anteriormente, com a diferença de que os animais além de água, também tiveram buretas contendo solução de sacarose 2% disponíveis.

14. Efeitos da administração de naloxona no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio por 24 h.

Objetivo: uma vez que a ativação opioidérgica no NPBL induz ingestão de sódio em ratos saciados, foi estudado se a inibição de mecanismos opioidérgicos no NPBL poderia afetar a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio.

As ingestões de água e de NaCl 0,3 M foram estudadas em ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL submetidos a 24 h de depleção de sódio. Após as 24 h, os ratos receberam injeções de veículo (propilenoglicol/água 2:1) ou

naloxona nas doses de 20, 40 e 60 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ bilateralmente no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os animais tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M. As ingestões de NaCl 0,3 M e água foram medidas nos tempos de 15, 30, 60, 90, 120, 150 e 180 min.

Cada grupo de ratos foi submetido a 4 tratamentos: veículo; naloxona 20; naloxona 40; naloxona 60. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos foi aleatória, sendo que no final os animais receberam todos os tratamentos.

15. Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água em ratos saciados e normovolêmicos ou privados de água por 24 h.

Objetivo: verificar se a ativação gabaérgica no NPBL alteraria a ingestão de água em diferentes protocolos experimentais, bem como verificar a especificidade da ativação gabaérgica no NPBL para a ingestão de sódio.

A ingestão de água foi estudada em ratos com cânulas bilateralmente implantadas no NPBL em duas condições experimentais: ratos saciados e normovolêmicos e ratos privados de água por 24 h. Para cada condição experimental foram utilizados diferentes grupos de animais.

Ratos saciados e normovolêmicos receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μl) e 15 min após as injeções no NPBL, os animais tiveram acesso a buretas graduadas contendo água. As medidas de ingestão de água foram feitas a cada 30 min durante 4 h.

Nos animais privados de água, 24 h após a retirada da água, salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μl) foram bilateralmente injetados no NPBL, sendo que 15 min após as injeções no NPBL os animais tiveram acesso à água. As medidas de ingestão de água foram feitas aos 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 e 240 min.

Os mesmos protocolos experimentais foram repetidos em outros grupos de animais, com a diferença que ao invés de muscimol, foi injetado baclofen (0,5 nmol/0,2 μl) no NPBL.

Durante a medida da ingestão de água, os animais não tiveram acesso à ração. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do

grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos foi aleatória, sendo que no final, todos os animais receberam os dois tratamentos.

16. Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água, NaCl 0,3 M e alimento em ratos saciados e normovolêmicos ou privados de ração por 24 h.

Objetivo: verificar um eventual efeito da ativação gabaérgica na ingestão de alimento e também a especificidade do efeito da ativação gabaérgica sobre a ingestão de sódio em ratos saciados.

Ratos normovolêmicos receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. Quinze minutos após a injeção de muscimol (ou salina), se iniciou a medida da ingestão de água, solução de NaCl 0,3 M e ração. As ingestões de NaCl 0,3 M, água e ração foram medidas a cada 30 min durante 4 h. A quantidade de ração oferecida aos animais durante o teste foi previamente pesada, sendo que para cada medida de ingestão de alimento foi também considerada a ração que se espalhou por debaixo da gaiola.

Um procedimento experimental semelhante foi realizado em outro grupo de ratos, com a diferença de que ração, mas não as buretas de água e NaCl 0,3 M, foi retirada 24 h antes das injeções bilaterais de muscimol ou salina no NPBL.

Os mesmos testes feitos com injeção de muscimol no NPBL foram feitos em outros grupos de ratos injetando-se baclofen no NPBL.

Cada grupo de ratos saciados e normovolêmicos foi submetido a dois tratamentos: salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl); salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl). Já o mesmo grupo de animais foi utilizado para se testar os efeitos do muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) e baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) injetados no NPBL após a privação de alimento por 24 h. Nesse caso, cada grupo de ratos foi submetido a três tratamentos: salina; muscimol ou baclofen. Em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento. A seqüência de tratamentos foi aleatória e, no final, todos os ratos receberam todos os tratamentos.

17. Estudo dos efeitos do muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a pressão arterial e frequência cardíaca.

17.1 Estudo dos efeitos do muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a pressão arterial e frequência cardíaca.

Objetivo: verificar se ativação de receptores gabaérgicos (GABA_A e GABA_B) no NPBL promoveria alterações da pressão arterial média e frequência cardíaca.

Ratos normotensos foram submetidos à canulação prévia da artéria e veia femorais. No dia seguinte à canulação, foi realizado o registro da PAM e FC. Após um período controle de registro da PAM e FC, salina, muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) foram injetados bilateralmente no NPBL. As medidas da PAM e FC foram feitas aos 5, 15, 60 e 120 minutos após as injeções no NPBL.

Em cada grupo de animais, o registro da pressão arterial e frequência cardíaca foi feito em dois períodos diferentes com um intervalo de 1 dia entre eles. No primeiro período de registro, 1/3 do grupo dos animais recebeu injeção de salina, o outro 1/3 recebeu muscimol e o restante recebeu baclofen. O mesmo protocolo foi repetido no dia seguinte modificando-se os tratamentos no NPBL.

17.2 Estudo dos efeitos da associação prazosin iv + muscimol injetado no NPBL sobre a pressão arterial e frequência cardíaca.

Objetivo: verificar se o aumento da pressão arterial média decorrente da injeção de muscimol no NPBL seria devido a um aumento da atividade simpática.

Ratos normotensos foram submetidos à canulação prévia da artéria e veia femorais. No dia seguinte à canulação, foi realizado o registro da PAM e FC. Após um período controle de registro da PAM e FC, salina ou prazosin (1 mg/kg) foi injetado intravenosamente (iv). Aguardou-se 10 min, e então salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) foram injetados bilateralmente no NPBL e continuou-se o registro da PAM por mais 1 h. As medidas de PAM e FC foram feitas nos tempos de 5, 15, 30 e 60 minutos após as injeções no NPBL.

Em cada grupo de animais, o registro da pressão arterial e frequência cardíaca foi feito em dois períodos diferentes com um intervalo de 1 dia entre eles. Foram realizados 4 tratamentos: salina iv + salina NPBL; prazosin iv + salina NPBL; salina iv + muscimol NPBL ou prazosin iv + muscimol NPBL. No primeiro período de

registro, os animais foram divididos em 4 grupos, sendo que cada grupo recebeu um dos 4 tratamentos. O mesmo protocolo foi repetido no dia seguinte alterando-se os tratamentos.

18. Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a excreção urinária de sódio e potássio em ratos saciados e normovolêmicos.

Objetivo: verificar se o efeito da ativação gabaérgica no NPBL sobre a ingestão de sódio poderia ser secundário a alterações na excreção renal.

Os animais bilateralmente implantados no NPBL foram colocados para adaptação em gaiolas metabólicas, tendo água, NaCl 0,3 M e ração a disposição. No dia do experimento, água, NaCl 0,3 M e ração foram retirados dos animais, que então receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL. Imediatamente após as injeções no NPBL, iniciou-se a coleta urinária, cujas medidas foram feitas a cada 30 min durante 4 h. Durante as 4 h de experimento, os animais não tiveram acesso a água, NaCl 0,3 M ou ração. Foram utilizados grupos de animais diferentes para o estudo com muscimol e baclofen injetados no NPBL, sendo que em cada experimento o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um tratamento, sendo que a seqüência de tratamentos foi aleatória.

Num outro grupo de animais, foi realizado um protocolo semelhante ao anterior, com a diferença que os animais tiveram acesso a água e NaCl 0,3 M durante as 4 h de experimento. Além dos 3 tratamentos com injeções bilaterais no NPBL (salina, muscimol ou baclofen), os animais também foram submetidos a mais um tratamento, no qual eles não receberam injeções no NPBL, mas sim sobrecargas intragástricas de NaCl 0,3 M e água a cada 30 min na mesma quantidade que eles ingeriram quando houve ativação gabaérgica no NPBL.

RESULTADOS

1. Análise histológica

As figuras 1, 2 e 3 apresentam cortes histológicos das áreas cerebrais estudadas num animal representativo dos grupos.

Semelhante a estudos anteriores (Colombari e cols., 1996; Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998, De Gobbi e cols., 2000), os pontos de injeções no NPBL (Figura 1) ficaram centrados na porção centro e dorsolateral do NPBL. Injeções que atingiram as porções ventro e externo lateral do NPBL, assim como o núcleo Kolliker-Fuse (KF) também foram observadas em alguns ratos e esses resultados também foram incluídos na análise.

A lesão da região AV3V (Figura 2) foi parecida à descrita em estudos anteriores (Colombari e cols., 1992; Gonçalves e cols., 1992; Menani e cols., 1990), sendo que os animais lesados exibiram uma área comum de destruição do tecido periventricular entre o recesso óptico e a comissura anterior, compreendendo a porção ventral do núcleo preóptico mediano, o OVLT e o tecido rostral periventricular, assim como, os núcleos pertencentes a porção medial da área preóptica medial.

Como mostrado na Figura 3, lesões do NTSc foram localizadas na região da linha média acima do canal central e se estendeu do nível do obex a aproximadamente 1 mm caudal a ele. As lesões destruíram completamente o NTSc, sem atingir a área postrema. Em alguns dos animais a lesão foi capaz de atingir as regiões laterais adjacentes ao NTSc, e esses animais também foram incluídos na análise. O núcleo hipoglossal manteve-se sempre intacto. A extensão da lesão do NTSc foi semelhante à descrita em estudos anteriores (Colombari e cols., 1996; Sato e cols., 1999; 2000).

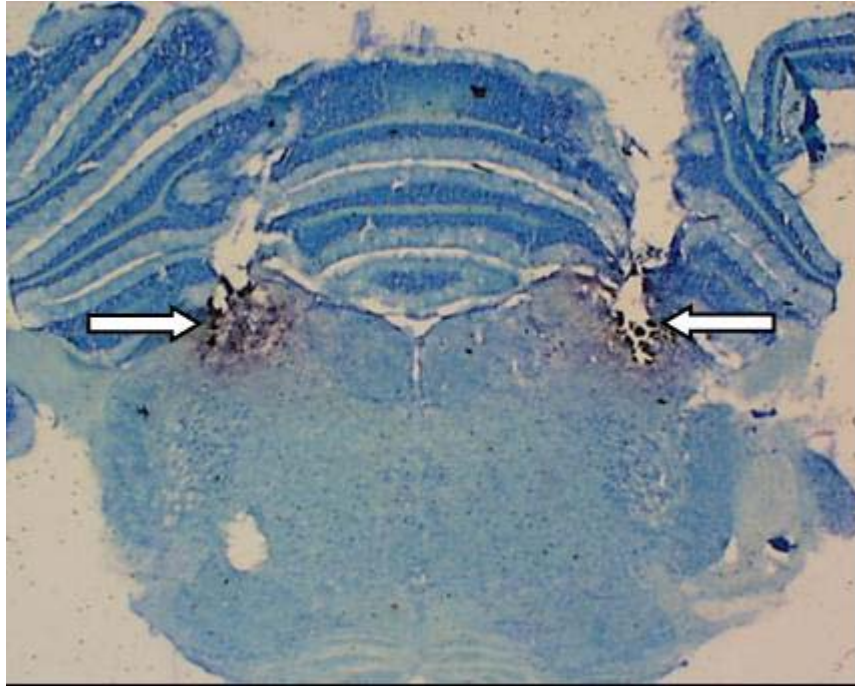


Figura 1: Fotomicrografia de um corte histológico transversal do cérebro de um animal representativo dos grupos, indicando (setas) os pontos de injeções no núcleo parabraquial lateral (NPBL).

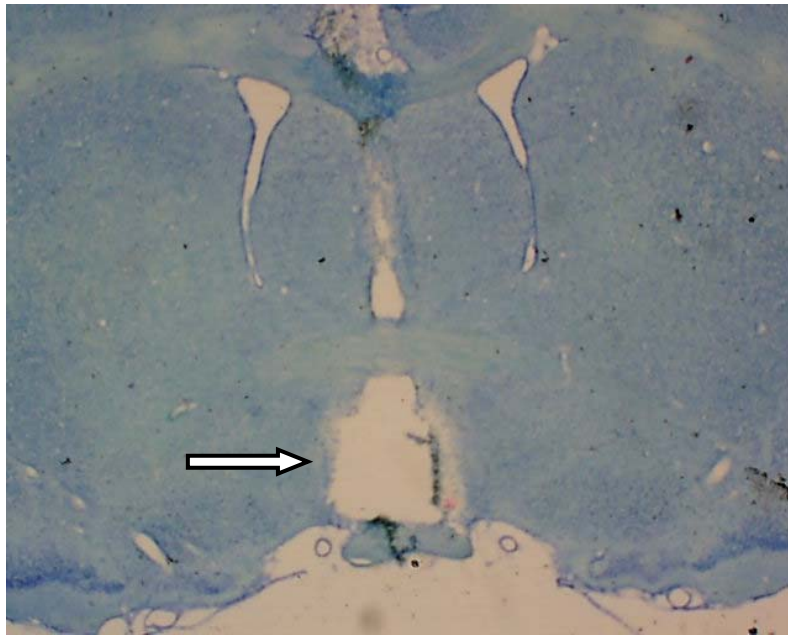


Figura 2: Fotomicrografia de um corte histológico transversal do cérebro de um animal representativo dos grupos, indicando (seta) o ponto de lesão da região anteroventral do 3º ventrículo (AV3V).

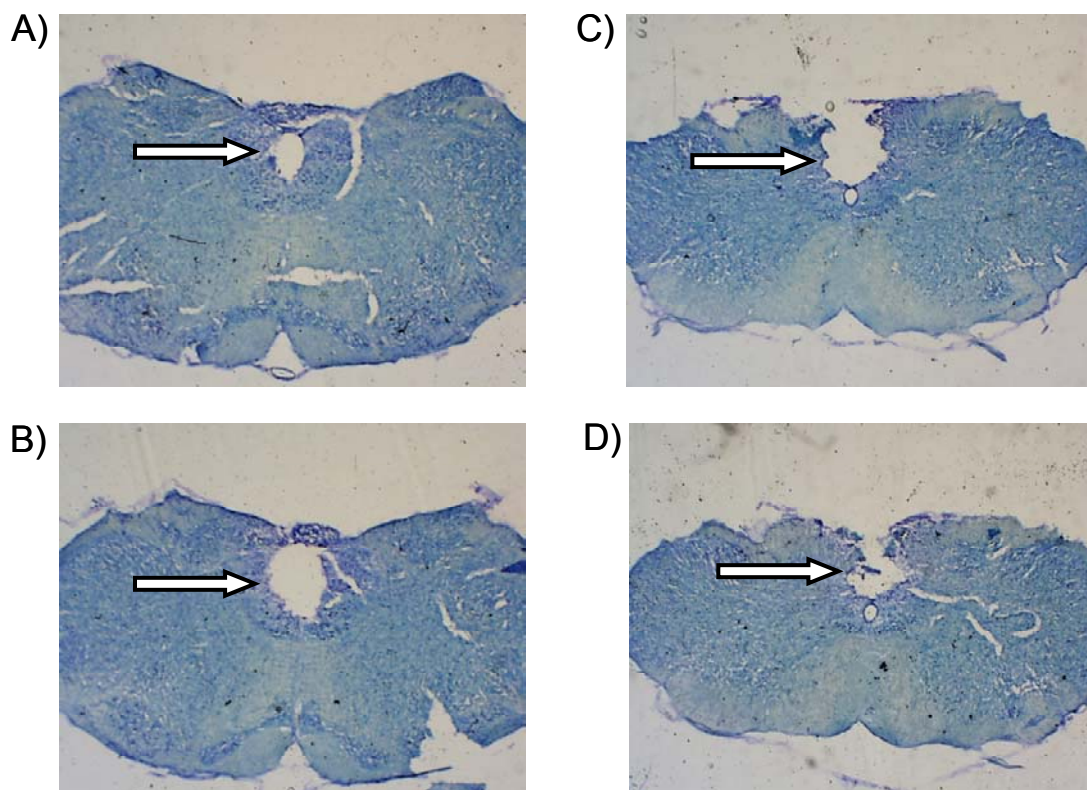


Figura 3: Fotomicrografias de cortes histológicos transversais do cérebro de um animal representativo dos grupos, indicando (seta) a lesão do núcleo do trato solitário comissural (NTSc). A) a D) cortes no sentido antero-posterior.

2. Efeitos da administração de bicuculina + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) injetado bilateralmente no NPBL induziu ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,12) = 12,6; p < 0,05$] (Figura 4A) e água [$F(3,12) = 23,5; p < 0,05$] (Figura 4B), sendo que ambos efeitos foram reduzidos pelo tratamento prévio com o antagonista de receptores GABA_A, bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl).

Uma vez que a ingestão de sódio induzida pelo muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) se inicia por volta de 90-120 min após as injeções no NPBL, para se investigar se ainda haveria ativação de receptores GABA_A por volta deste período, em um grupo experimental, bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) foi injetada 1 h após as injeções bilaterais de muscimol. Verificou-se que mesmo sendo injetada 1 h após o muscimol, o tratamento com bicuculina foi capaz de reduzir o efeito natriorexigênico [$F(3,12) = 5,4; p < 0,05$] (Figura 5A), decorrente da injeção de muscimol no NPBL, sem alterar o aumento na ingestão de água observada após a administração de muscimol no NPBL como mostrado pela ANOVA através da interação significativa entre tratamento e tempo [$F(21,84) = 2,5; p < 0,05$] (Figura 5B).

- veículo + salina △ bicuculina + salina
 ● veículo + muscimol ▲ bicuculina + muscimol

* diferente de veículo + salina

+ diferente de veículo + muscimol

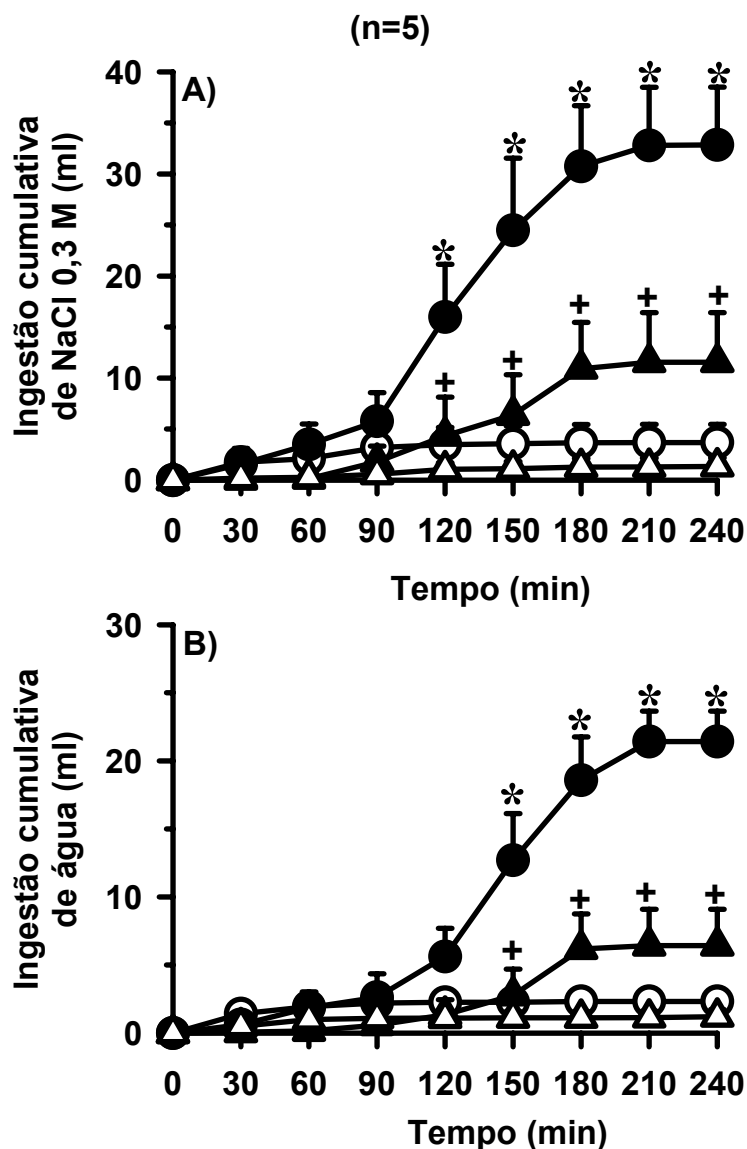


Figura 4: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 μ l) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.

- salina + veículo △ salina + bicuculina
 ● muscimol + veículo ▲ muscimol + bicuculina

* diferente de salina + veículo

+ diferente de muscimol + veículo

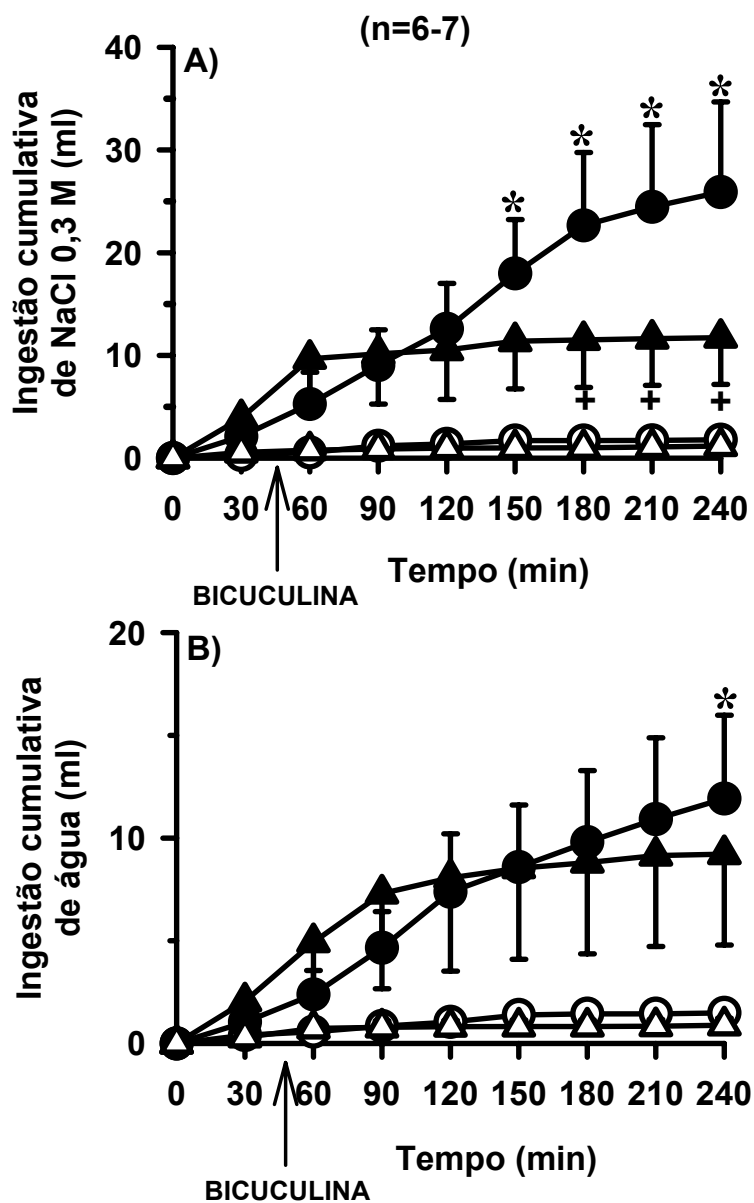
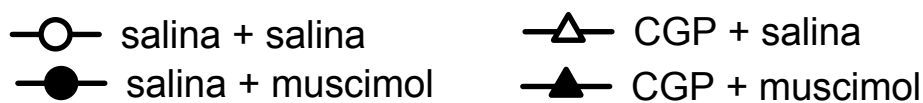


Figura 5: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e após 1 h receberam injeções, também no NPBL, de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 μ l) e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.

3. Efeitos da administração de CGP 35348 + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) injetado bilateralmente no NPBL induziu ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,15) = 5,6; p < 0,05$] (Figura 6A) e água [$F(21,105) = 4,7; p < 0,05$] (Figura 6B), como mostrado pela RMANOVA (ANOVA – medidas repetidas) através da diferença significativa entre tratamentos e da interação entre tratamento-tempo, respectivamente, para a ingestão de sódio e água. O tratamento prévio com o antagonista de receptores GABA_B, CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl), não alterou os efeitos do muscimol.



* diferente de veículo + salina

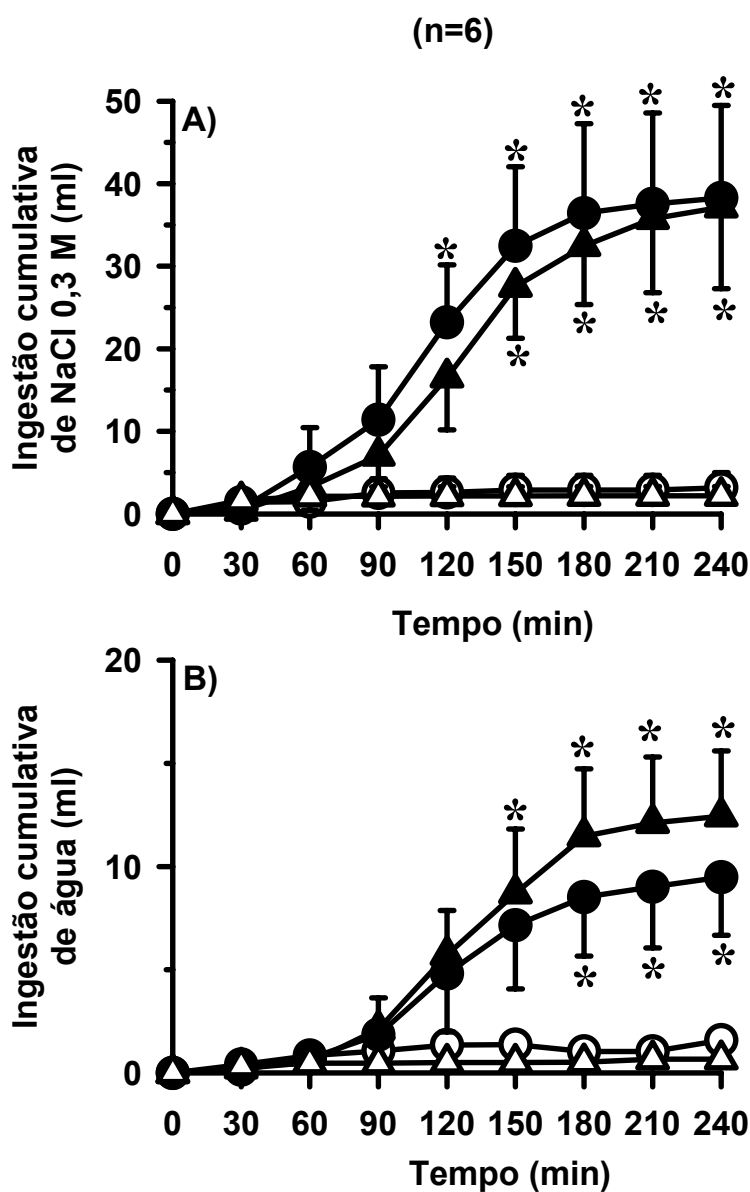


Figura 6: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 μ l) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.

4. Efeitos da administração de CGP 35348 + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) injetado bilateralmente no NPBL de ratos saciados induziu ingestão de NaCl 0,3 M $F(4,24) = 8,0; p < 0,05$ (Figura 7A) e de água $F(4,24) = 6,0; p < 0,05$ (Figura 7B). Injeções prévias de CGP na dose de 50 nmol/0,2 µl, mas não na dose de 20 nmol/0,2 µl, aboliram o efeito natriorexigênico e a ingestão de água que acompanha a ingestão de sódio induzidos pelo baclofen (Figura 7).

Assim como ocorre com o muscimol, há uma latência em torno de 90-120 min para que se inicie a ingestão de sódio induzida pelo baclofen (0,5 nmol/0,2 µl), portanto, para se investigar se ainda haveria ativação de receptores GABA_B por volta deste período, em um grupo experimental, CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl) foi injetado 1 h após as injeções bilaterais de baclofen. Verificou-se que mesmo sendo injetado 1 h após o baclofen, o tratamento com CGP foi capaz de reduzir tanto efeito natriorexigênico [$F(3,12) = 5,4; p < 0,05$] (Figura 8A), quanto a ingestão de água [$F(3,12) = 8,7; p < 0,05$] (Figura 8B), induzidos pela injeção de baclofen no NPBL.

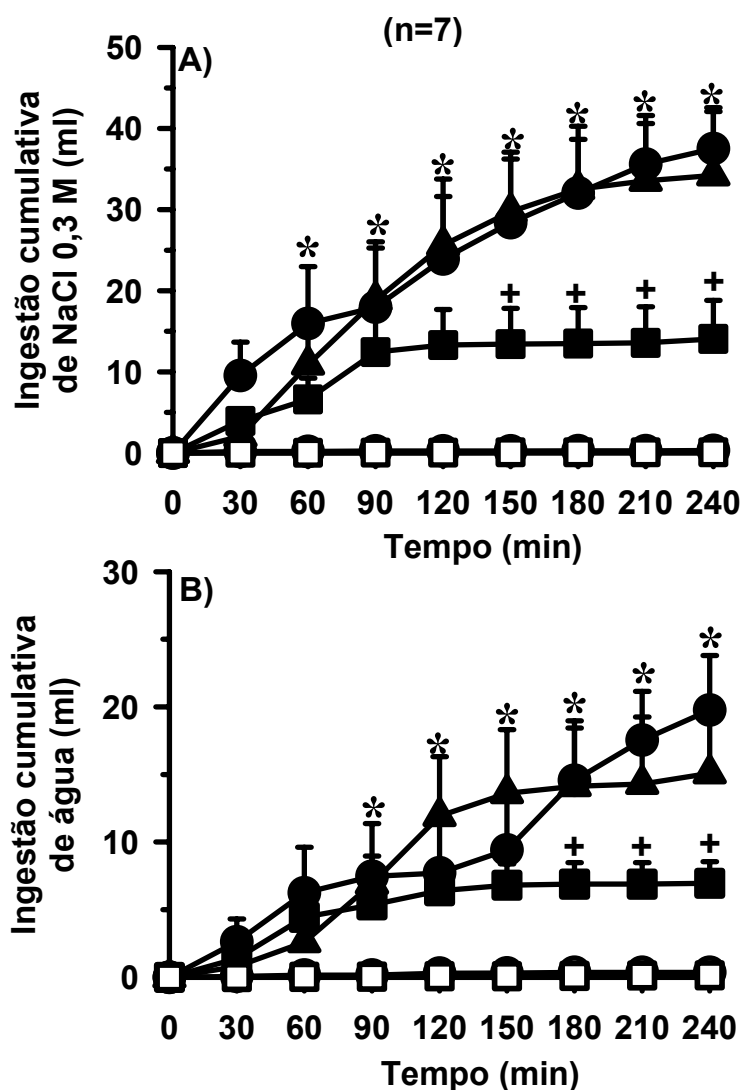
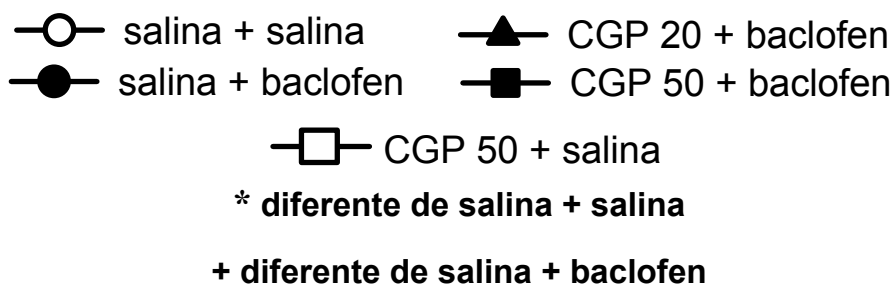
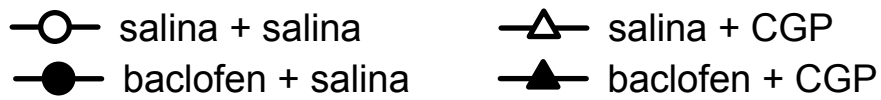


Figura 7: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 μ l) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.



* diferente de salina + salina

+ diferente de baclofen + salina

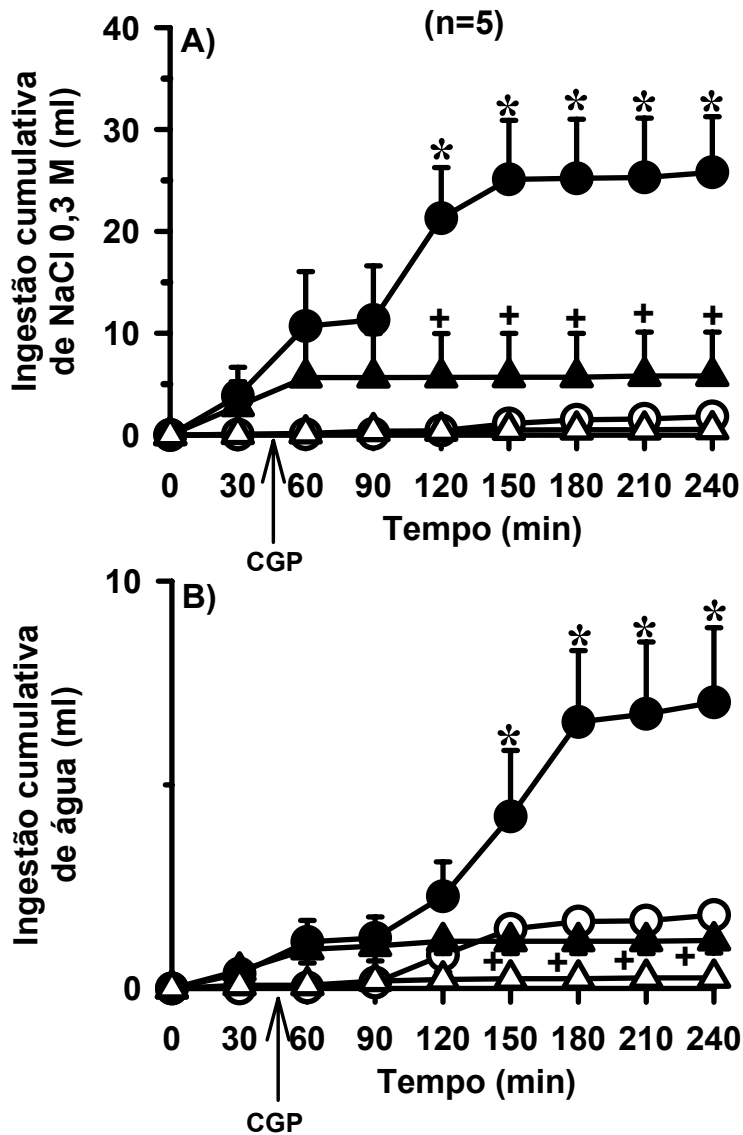


Figura 8: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e após 1 h receberam injeções, também no NPBL, de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 μ l) e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.

5. Efeitos da administração de bicuculina + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) injetado bilateralmente no NPBL de ratos saciados induziu ingestão de NaCl 0,3 M $F(3,12) = 4,4; p < 0,05$ (Figura 9A), sem alterar a ingestão de água $F(3,12) = 2,4; p > 0,05$ (Figura 9B). Injeções prévias de bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) aboliram o efeito natriorexigênico do baclofen (Figura 9A).

- veículo + salina △ bicuculina + salina
- veículo + baclofen ▲ bicuculina + baclofen

* diferente de veículo + salina

+ diferente de veículo + baclofen

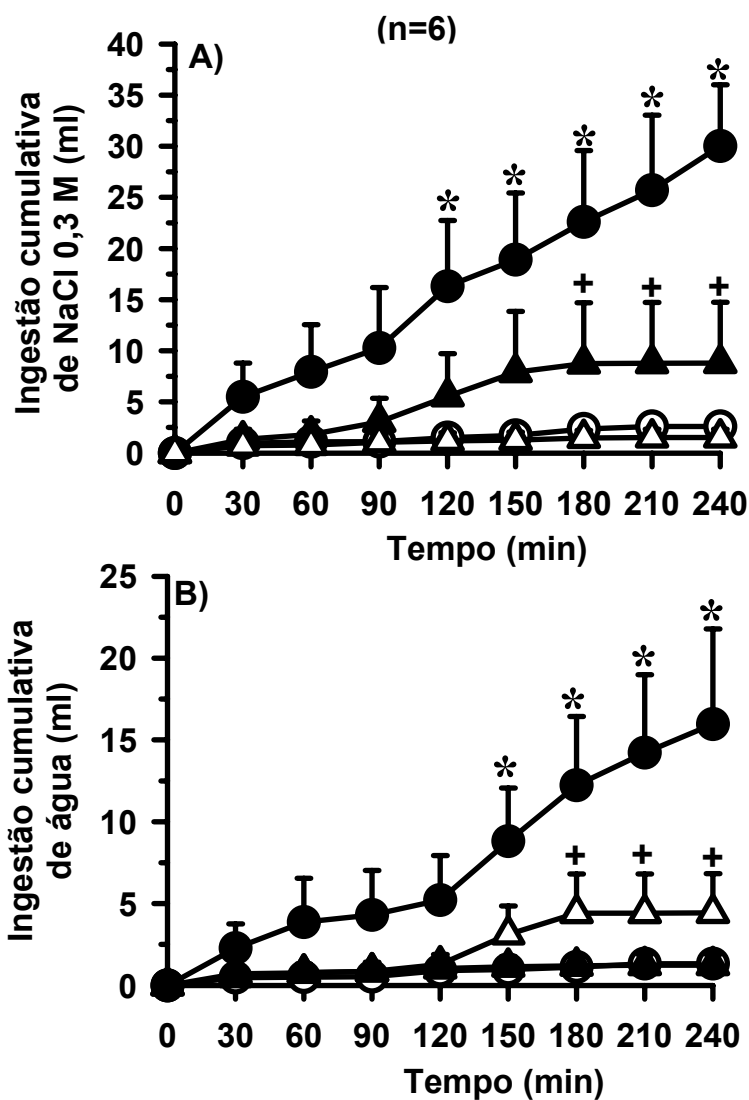


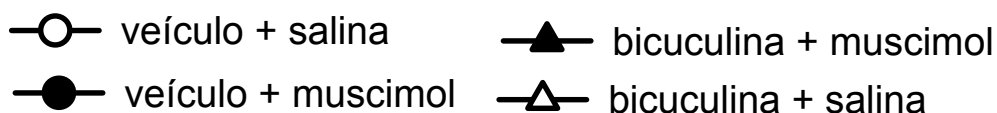
Figura 9: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n=número de animais.

6. Efeitos da administração de bicuculina ou CGP 35348 + muscimol no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos com depleção de sódio.

Em ratos submetidos a depleção de sódio por 24 h, injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) promoveram uma inibição inicial e uma facilitação tardia da ingestão de sódio, sendo estes efeitos abolidos pela prévia administração de bicuculina (1,6 nmol/0,2 μ l), como mostrados pela interação significativa entre tratamento-tempo pela ANOVA [$F(3,175) = 5,5; p < 0,05$] (Figura 10A).

Em relação à ingestão de água, muscimol apenas aumentou a ingestão de água nos últimos 90 min de experimento, sendo que este efeito não foi alterado pela injeção prévia de bicuculina [$F(3,175) = 20,4; p < 0,05$] (Figura 10B). Embora, a associação bicuculina + muscimol não tenha sido diferente de veículo + muscimol, também não foi diferente de veículo + salina para a ingestão de água (Figura 10B).

Para o estudo do envolvimento dos receptores GABA_B nos efeitos do muscimol sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, em animais depletados de sódio por 24 h, injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL promoveram uma inibição inicial e um aumento tardio da ingestão de sódio [$F(18,144) = 12,1; p < 0,05$] (Figura 11A), sendo que a administração prévia do antagonista de receptores GABA_B, CGP 35348 (50 nmol/0,2 μ l), prolongou o efeito inibitório do muscimol, sem alterar seu efeito facilitatório (Figura 11A). Em relação à ingestão de água, ANOVA mostrou diferença significativa na interação tratamento-tempo [$F(18,144) = 2,3; p < 0,05$], sendo que a associação salina + muscimol não foi diferente do grupo salina + salina, porém a associação CGP + muscimol foi diferente de salina + salina e salina + muscimol (Figura 11B).



* diferente de veículo + salina
(n = 7-8)

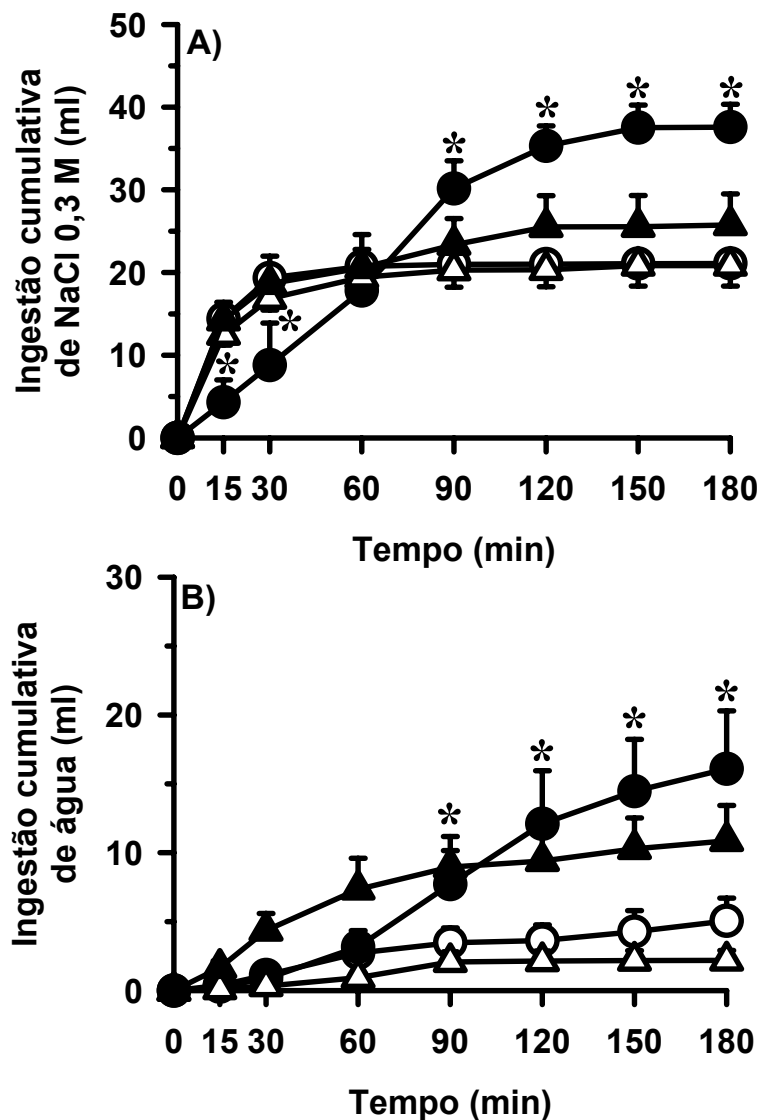
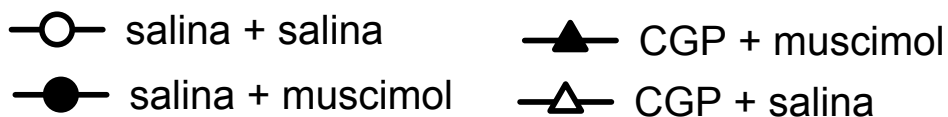


Figura 10: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 μ l) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.



* diferente de salina + salina
(n = 7)

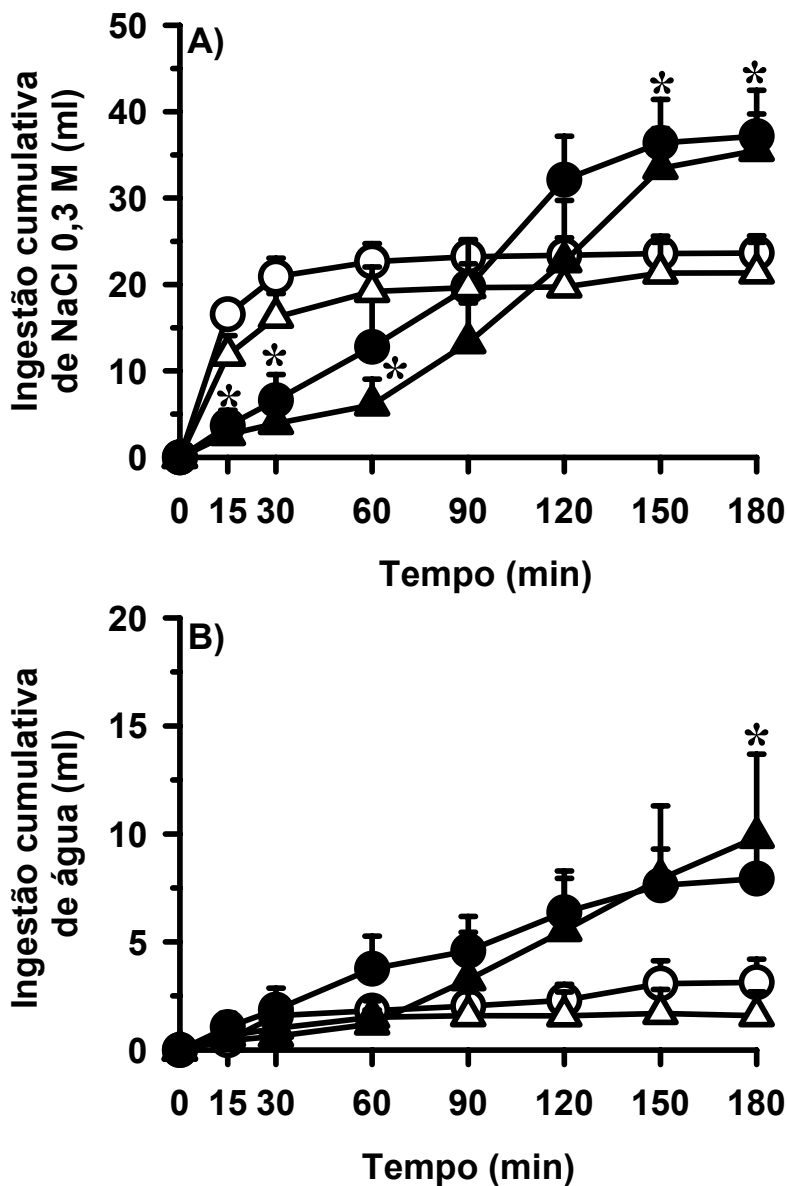


Figura 11: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 μ l) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.

7. Efeitos da administração de CGP 35348 ou bicuculina + baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos com depleção de sódio.

Em ratos depletados de sódio por 24 h, injeções bilaterais de baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL promoveram uma inibição inicial (primeira 1/2 hora) e uma facilitação tardia (última hora) da ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,259) = 41,6; p < 0,05$] no teste de apetite ao sódio de duração de 3 h, como indicado pela interação significativa entre tratamento-tempo pela ANOVA. Para a ingestão de água, ANOVA mostrou diferença significativa entre os tratamentos [$F(3,259) = 6,0; p < 0,05$], porém o pós teste não mostrou diferenças entre os tratamentos salina + salina e salina + baclofen (Figura 12).

Injeções prévias do antagonista de receptores GABA_B, CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl), aboliu o efeito inibitório e antecipou o efeito facilitatório do baclofen sobre a ingestão de sódio em ratos depletados de sódio (Figura 12A). Para a ingestão de água que acompanha a ingestão de sódio, em relação ao tratamento, o pós-teste mostrou que a curva CGP + baclofen foi diferente da curva veículo + baclofen e de veículo + salina (Figura 12B).

A prévia administração do antagonista de receptores GABA_A, bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl), prolongou o efeito inibitório e aboliu o efeito facilitatório do baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) na ingestão de sódio, como mostrado pela interação significativa entre tratamento-tempo pela ANOVA [$F(3,245) = 21,1; p < 0,05$], (Figura 13A).

Em relação à ingestão de água, ANOVA mostrou diferença significativa entre alguns dos tratamentos [$F(3,245) = 6,7; p < 0,05$] (Figura 13B), sendo que a curva do tratamento bicuculina + baclofen foi diferente das curvas dos tratamentos veículo + salina e veículo + baclofen.



* diferente de salina + salina
+ diferente de salina + baclofen
(n=8-11)

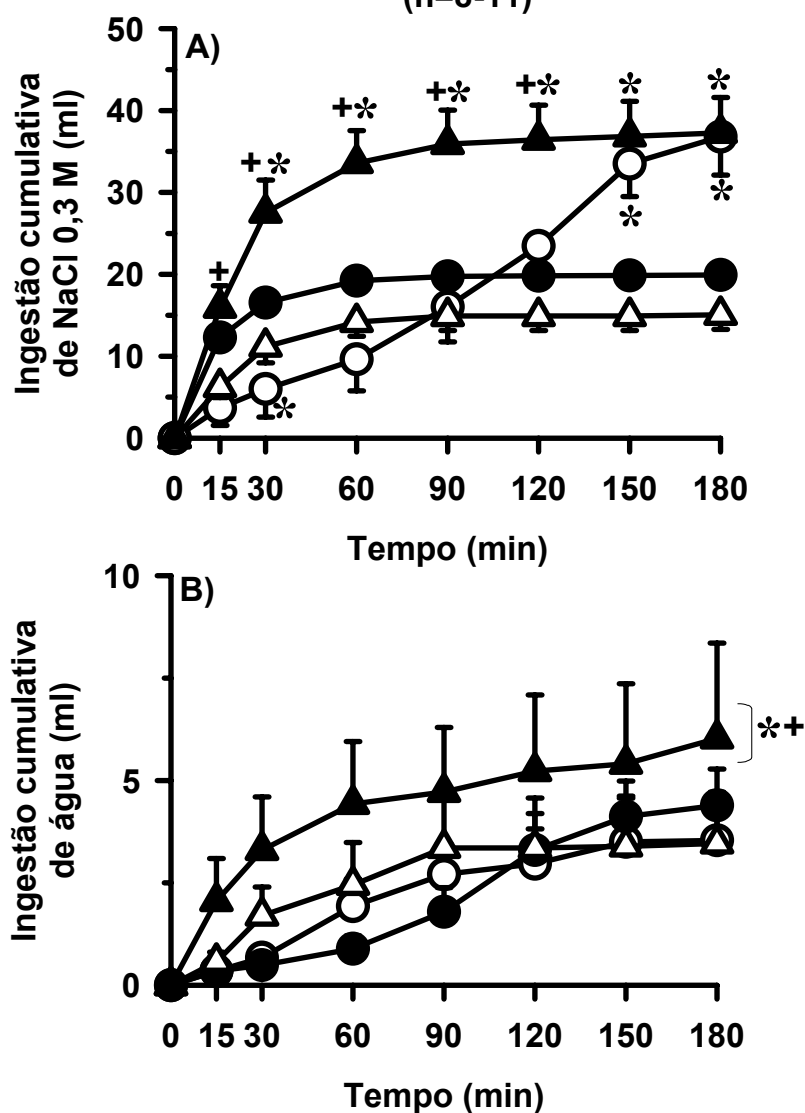
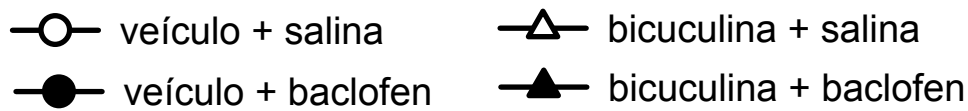


Figura 12: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 μ l) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.



* diferente de veículo + salina
 + diferente de veículo + baclofen
 (n=6-11)

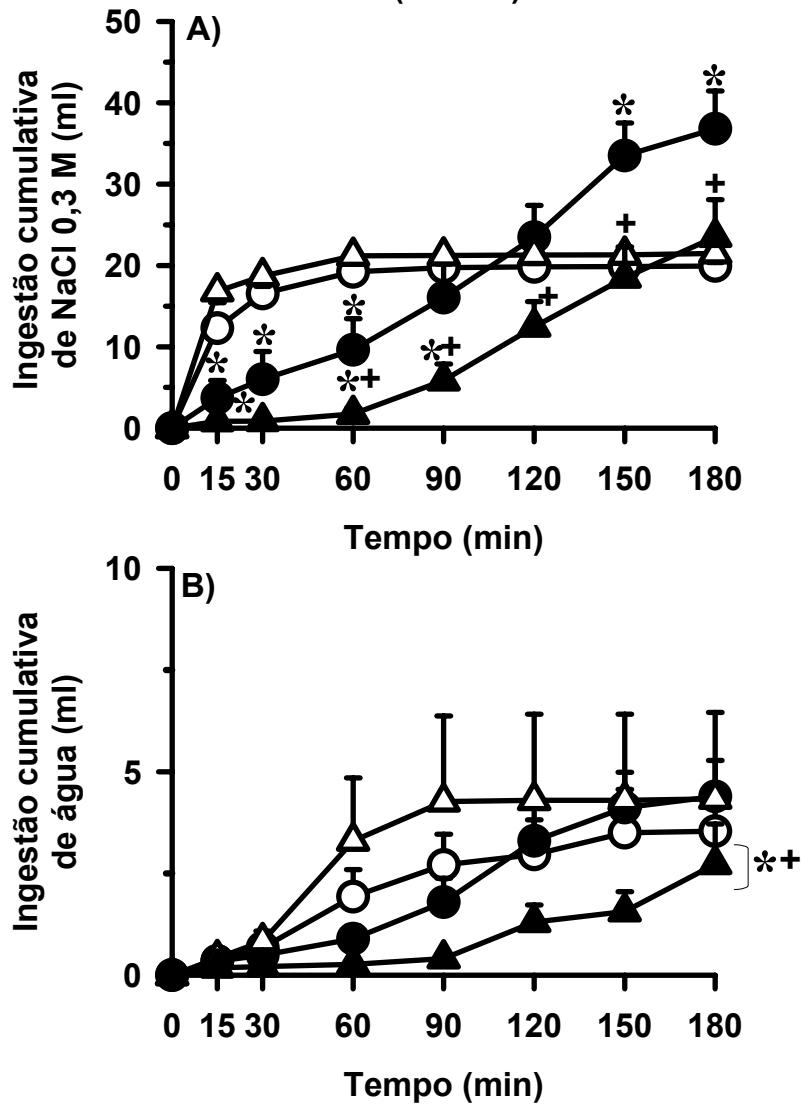


Figura 13: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 μ l) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.

8. Efeitos da administração de muscimol e baclofen no NPBL sobre a ingestão de água, NaCl 0,3 M e sacarose 2% em ratos com depleção de sódio.

Em ratos depletados de sódio por 24 h que tiveram acesso a 3 buretas (água, NaCl 0,3 M e sacarose 2%), muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) injetado bilateralmente no NPBL aumentou a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(12,72) = 5,5; p < 0,05$] e água [$F(12,72) = 2,0; p < 0,05$] nos tempos finais do experimento sem alterar a ingestão de sacarose 2% [$F(12,72) = 0,6; p > 0,05$] (Tabela 1), como indicado pela interação entre tratamento-tempo pela ANOVA. Injeções bilaterais de baclofen no NPBL não alteraram nenhuma das ingestões estudadas (Tabela 1). Em relação à ingestão de sódio, embora baclofen injetado no NPBL tenha promovido uma tendência em aumentar a ingestão de sódio no final do experimento, essa não foi diferente do grupo que recebeu salina, mas foi menor que a ingestão do grupo que recebeu injeções de muscimol no NPBL (Tabela 1).

Tabela 1: Ingestão cumulativa (ml) de NaCl 0,3 M, água e sacarose 2% em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de salina, muscimol ou baclofen no NPBL.

t \ trat	15	30	60	90	120	150	180
<i>NaCl 0,3 M</i>							
SAL	11,6±2,0	16,1±1,9	18,0±1,7	18,2±1,7	18,3±1,7	18,4±1,7	18,4±1,7
MUSC	4,0±2,1	9,2±4,5	19,8±7,2	27,9±7,2	32,4±6,8	33,6±6,5*	36,5±4,9*
BAC	6,2±2,7	11,0±4,9	15,9±7,5	17,5±7,6	20,6±7,7	22,4±7,9*	26,2±7,0*
<i>água</i>							
SAL	0,2±0,1	1,2±0,5	2,5±0,9	3,1±1,2	3,2±1,2	3,2±1,2	3,2±1,3
MUSC	0,3±0,1	0,3±0,1	1,3±0,7	2,4±1,2	4,5±1,8	7,8±3,3*	8,5±3,5*
BAC	0,2±0,1	0,2±0,1	0,7±0,3	1,5±0,8	1,6±0,8	1,6±0,8	3,2±1,4
<i>sacarose 2%</i>							
SAL	1,6±1,0	2,6±1,2	5,0±2,5	5,5±2,8	7,2±4,3	8,3±5,3	8,3±5,3
MUSC	0,3±0,2	0,9±0,6	6,4±3,7	11,2±6,3	14,3±7,8	16,6±8,8	17,4±8,7
BAC	0,5±0,3	1,1±0,7	4,1±3,4	7,8±6,5	9,2±7,8	10,7±9,1	13,0±8,8

SAL = salina (0,2 µl), MUSC = muscimol (0,5 nmol/0,2 µl), BAC = baclofen (0,5 nmol/0,2 µl), t = tempo (min), trat = tratamento no NPBL. Os resultados foram expressos como média ± EPM. * diferente de salina, + diferente de muscimol, n=7.

9. Efeitos da inibição gabaérgica no NPBL sobre a ingestão não regulatória de NaCl 0,3 M em ratos.

No protocolo de ingestão não regulatória de sódio, nos quais os animais foram treinados a ingerirem sódio apenas 2 h por dia (ingestão média de NaCl 0,3 M: 4-5 ml/2h), injeções bilaterais do antagonista de receptores GABA_A, bicuculina (1,6 nmol/0,2 µl), não alterou nem a ingestão de sódio [$F(1,10) = 0,0; p > 0,05$] (Figura 14A), nem a ingestão de água [$F(1,10) = 0,3; p > 0,05$] (Figura 14B).

CGP 35348 (50 nmol/0,2 µl), antagonista de receptores GABA_B, reduziu a ingestão não regulatória de NaCl 0,3 M [$F(1,20) = 4,84; p < 0,05$] (Figura 15A) ao longo de todo o experimento, sem alterar a ingestão de água [$F(1,20) = 0,39; p > 0,05$] (Figura 15B).

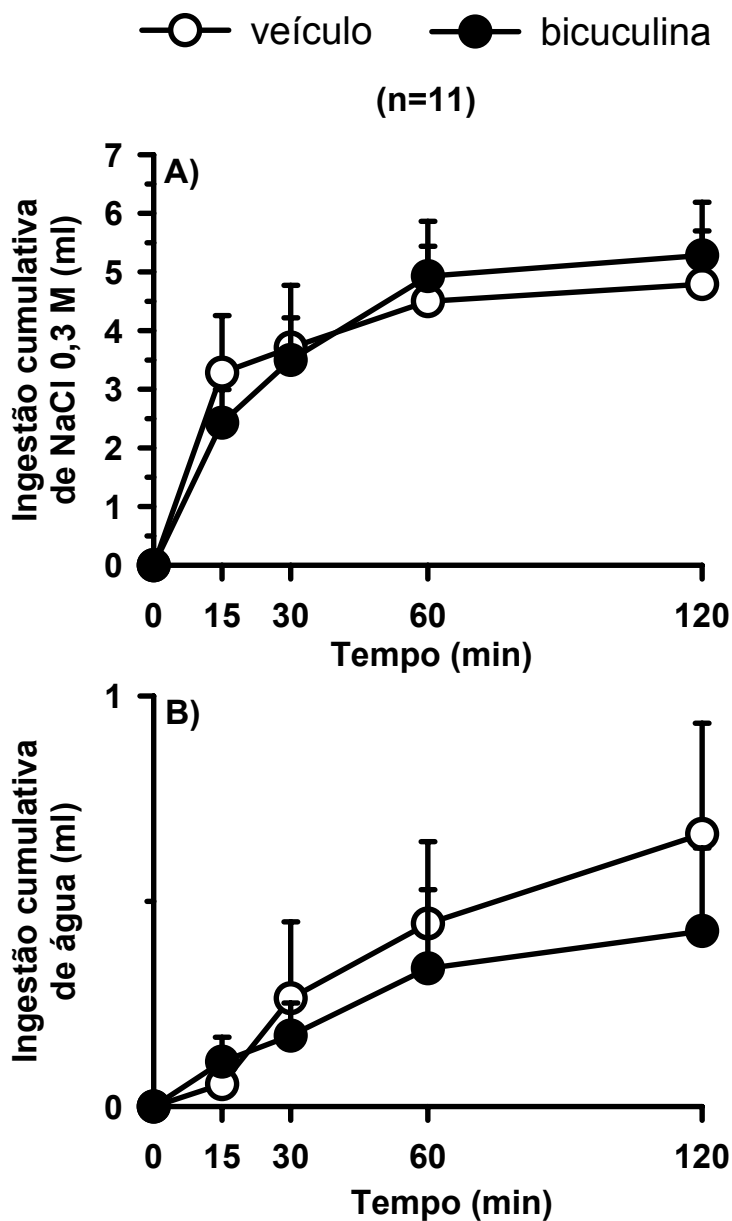


Figura 14: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que tiveram solução de NaCl 0,3 M disponível apenas 2 h/dia (ingestão não regulatória) que receberam injeções bilaterais de veículo ou bicuculina (1,6 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.

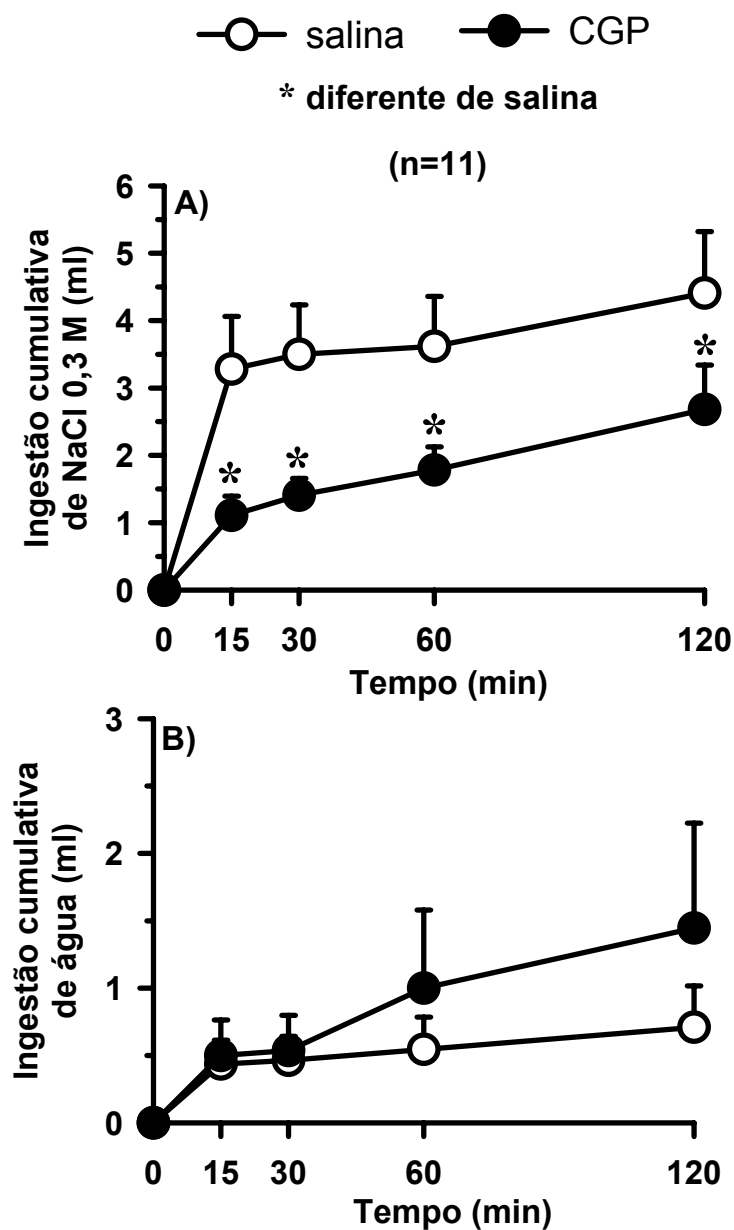


Figura 15: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que tiveram solução de NaCl 0,3 M disponível apenas 2 h/dia (ingestão não regulatória) que receberam injeções bilaterais de salina ou CGP 35348 (50 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n=número de animais.

10. Estudo da expressão da proteína c-fos após ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos que não tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Holtzman).

Analisando as áreas prosencefálicas, da ponte e do bulbo foram comparados os ratos que receberam os seguintes tratamentos: sem injeções no NPBL (controle); salina NPBL; muscimol NPBL (0,5 nmol/0,2 µl) e baclofen NPBL (0,5 nmol/0,2 µl). ANOVA mostrou diferenças significativas entre o grupo salina e os grupos do muscimol e/ou baclofen para as seguintes áreas: NTSc [$F(3,22) = 4,2; p < 0,05$] e NPOMv [$F(3,22) = 4,4; p < 0,05$] (Tabela 2). Em relação ao NPBL, tanto o tratamento com salina, quanto com muscimol ou baclofen, foi diferente do controle (sem injeções) [$F(3,22) = 9,4; p < 0,05$] (Tabela 2). Para o OSF, a expressão da proteína c-fos produzida pelo baclofen foi estatisticamente diferente do grupo controle, mas não do grupo salina [$F(3,22) = 3,8; p < 0,05$] (Tabela 2).

Não foram observadas diferenças significativas entre os grupos estudados nas demais áreas analisadas: OVLT [$F(3,20) = 2,4; p > 0,05$]; NPOMd [$F(3,22) = 2,2; p > 0,05$]; NPV [$F(3,22) = 1,9; p > 0,05$]; NSO [$F(3,21) = 0,8; p > 0,05$]; Amg [$F(3,22) = 1,3; p > 0,05$] e AP [$F(3,14) = 3,2; p > 0,05$] (Tabela 2).

Tabela 2: Expressão da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) sem injeções no NPBL ou após o tratamento com salina, muscimol ou baclofen no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos que não tiveram acesso à água ou ao NaCl 0,3 M.

tratamento área	saciado (sem injeção no NPBL)	saciado + salina NPBL	saciado + muscimol NPBL	saciado + baclofen NPBL
OVLT	76,5±20,0	146,6±22,1	118,2±20,9	115,0±22,5
NPOMd	73,2±18,5	118,1±17,6	67,6±6,0	83,0±11,9
NPOMv	471,2±118,6	605,0±178,2	171,1±47,6*	111,1±30,3*
OSF	182,3±65,8	136,5±34,6	63,3±17,4	12,0±4,4 [†]
NPV	130,7±38,8	449,0±126,6	287,9±47,9	375,8±111,6
NSO	174,5±30,0	152,7±38,5	217,5±39,7	136,8±39,2
Amg	4,2±1,9	11,3±4,2	3,9±1,3	7,2±2,9
NPBL	18,1±5,7	171,1±27,0 [†]	139,3±25,1 [†]	193,8±25,2 [†]
AP	482,9±213,7	117,1±104,8	282,1±191,0	300±103,9
NTSc	58,6±3,2	117,3±46,5	873,0±322,0* [†]	1134,9±223,1* [†]

Salina – 0,2 µl, muscimol - 0,5 nmol/0,2 µl, baclofen - 0,5 nmol/0,2 µl. Os resultados foram expressos como média ± EPM. * diferente de saciado + salina NPBL; [†] diferente de saciado sem injeções no NPBL; n=4-7.

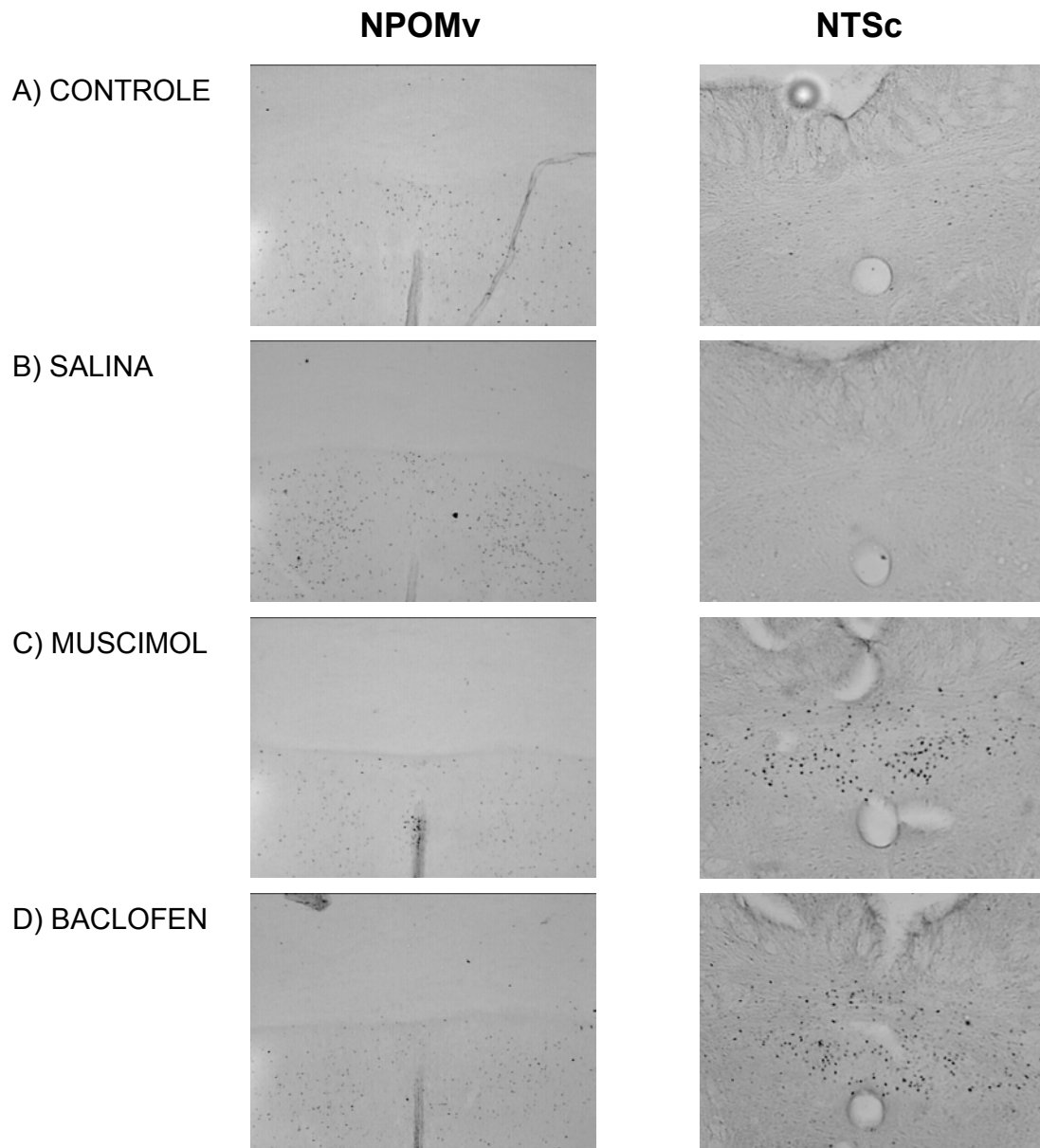


Figura 16: Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de ratos, ilustrando a expressão da proteína c-fos no NPOMv (painel da esquerda) e NTSc (painel da direita) em ratos saciados que receberam ou não (A) injeções bilaterais de salina (B), muscimol (C) ou baclofen (D) no NPBL. Os animais não tiveram acesso ao sódio e água após as injeções no NPBL.

11. Estudo da expressão da proteína c-fos após injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio que tiveram livre acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Sprague-Dawley – Austrália).

Foram estudados ratos saciados e depletados de sódio por 24 h (injeção sc do diurético furosemide + dieta deficiente de sódio e água *ad libitum* por 24 h) com acesso à solução de NaCl 0,3 M e à água que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e ratos depletados de sódio que não tiveram acesso ao NaCl e água e que não receberam injeções no NPBL.

Em ratos saciados, as injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a expressão da proteína c-fos no BNSTv [$F(4, 22) = 3,29; p < 0,05$], NPOMd [$F(4, 22) = 5,0; p < 0,05$], NBLA [$F(4, 22) = 10,1; p < 0,05$], NCA [$F(4, 22) = 6,2; p < 0,05$], NMA [$F(4, 22) = 6,9; p < 0,05$], NPBM [$F(4, 20) = 8,6; p < 0,05$], AP [$F(4, 22) = 5,9; p < 0,05$], NTSr [$F(4, 20) = 6,4; p < 0,05$], NTSc [$F(4, 23) = 3,5; p < 0,05$], NTScl [$F(4, 23) = 13,2; p < 0,05$] (Figuras 17, 18, 19 e 20). Não houve aumento da expressão da proteína c-fos no BNSTd [$F(4, 22) = 1,5; p > 0,05$], NPOMv [$F(4, 22) = 2,7; p > 0,05$], OVLT [$F(4, 21) = 2,7; p > 0,05$] e NPBL (Figuras 17 e 18).

Em ratos depletados de sódio por 24 h, as injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a expressão da proteína c-fos no NPOMd, NPBL [$F(4, 20) = 14,1; p < 0,05$], NTSc e NTScl (Figuras 17, 18, 19 e 20).

A expressão da proteína c-fos após as injeções bilaterais de muscimol no NPBL foi menor nos ratos depletados de sódio do que nos ratos saciados nas seguintes áreas: BNSTv, NBLA e NCA (Figuras 17 e 18), enquanto que a expressão de c-fos após as injeções bilaterais de muscimol no NPBL foi maior nos ratos depletados de sódio do que nos ratos saciados no OSF (Figura 17 e 20). O aumento da expressão da proteína c-fos após injeções de muscimol no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio foi semelhante nas seguintes áreas: NPOMd, NMA, NPBM, AP, NTSr, NTSc e NTScl (Figuras 17, 18, 19 e 20).

Em comparação com os ratos saciados tratados com salina no NPBL, os ratos com depleção de sódio de 24 h que receberam injeção de salina no NPBL apresentaram aumento da expressão da proteína c-fos no OSF [$F(4, 23) = 9,3; p < 0,05$] e no NTScl (Figuras 17, 19 e 20).

Em comparação com os ratos depletados que não tiveram acesso ao NaCl, os ratos com depleção de sódio por 24 h que receberam injeção de salina no NPBL e tiveram acesso ao NaCl apresentaram aumento da expressão da proteína c-fos no NPBL, NPBM e AP (Figuras 18 e 19).

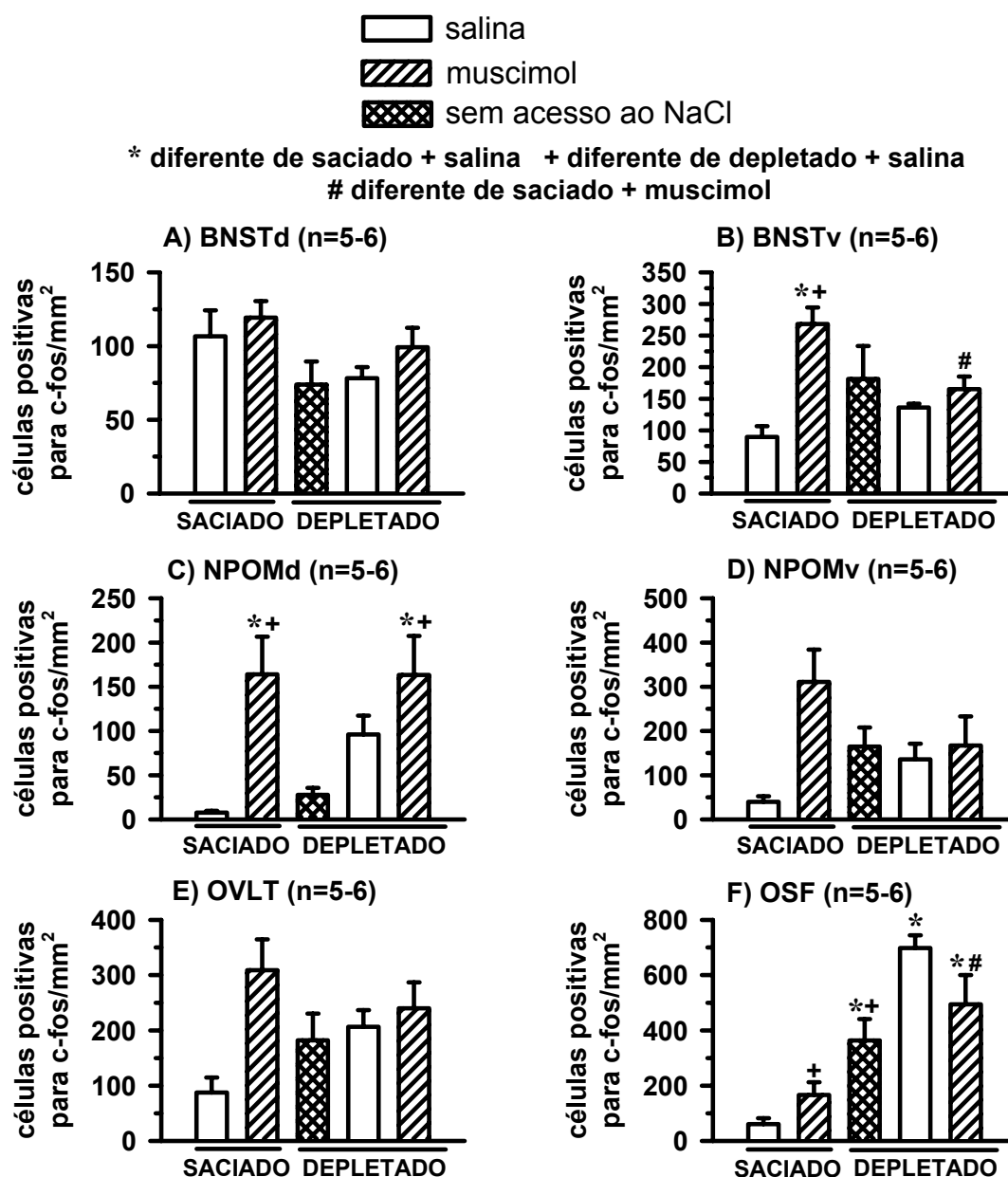


Figura 17: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) no A) BNSTd; B) BNSTv; C) NPOMd; D) NPOMv; E) OVLT e F) OSF em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média \pm EPM; n = número de animais.

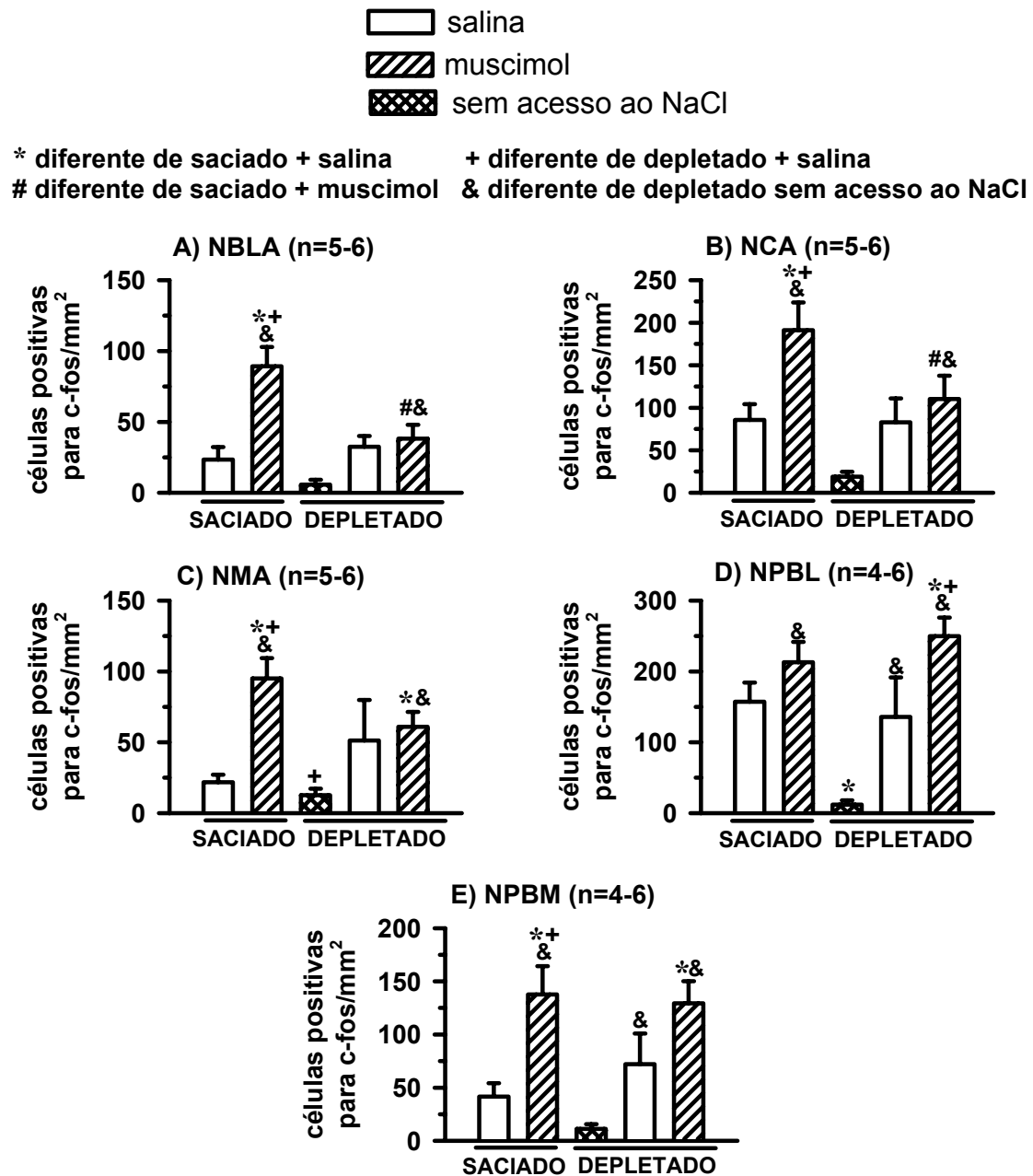


Figura 18: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) no A) NBLA; B) NCA; C) NMA; D) NPBL e E) NPBM em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais.

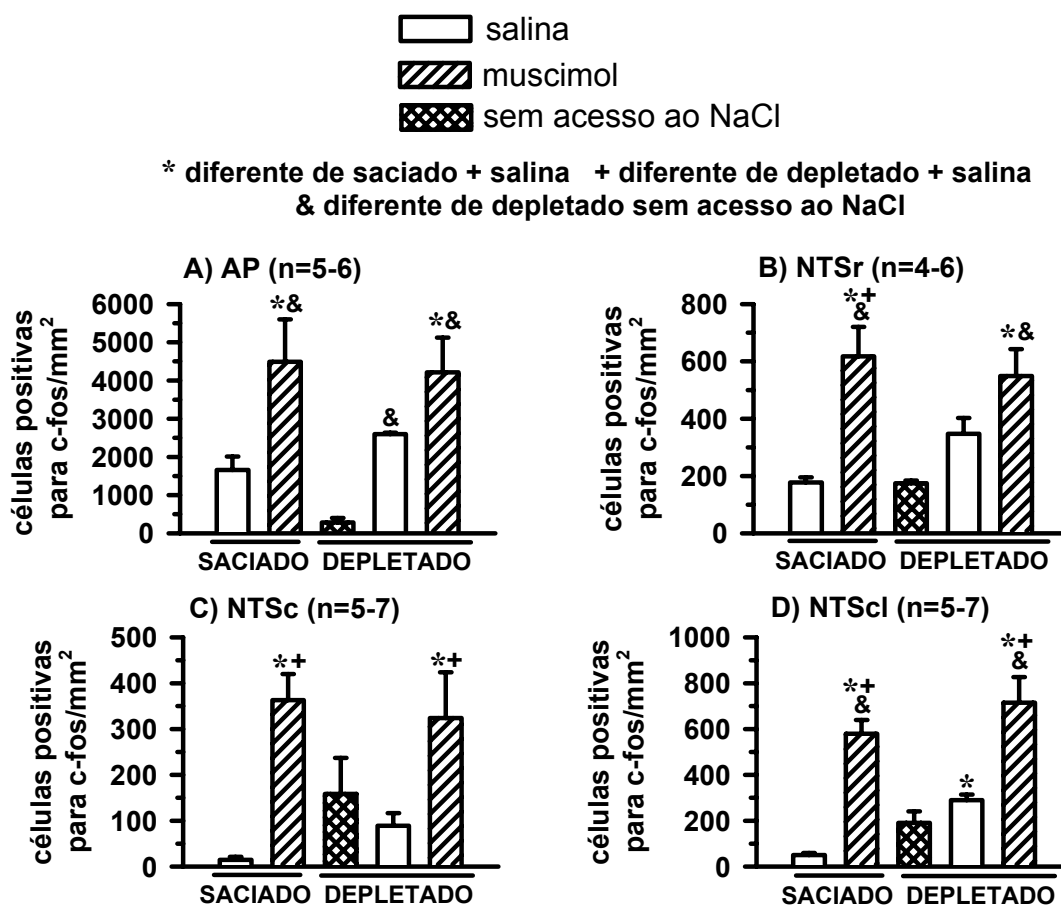


Figura 19: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) no A) AP; B) NTSr; C) NTSc e D) NTScl em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais.

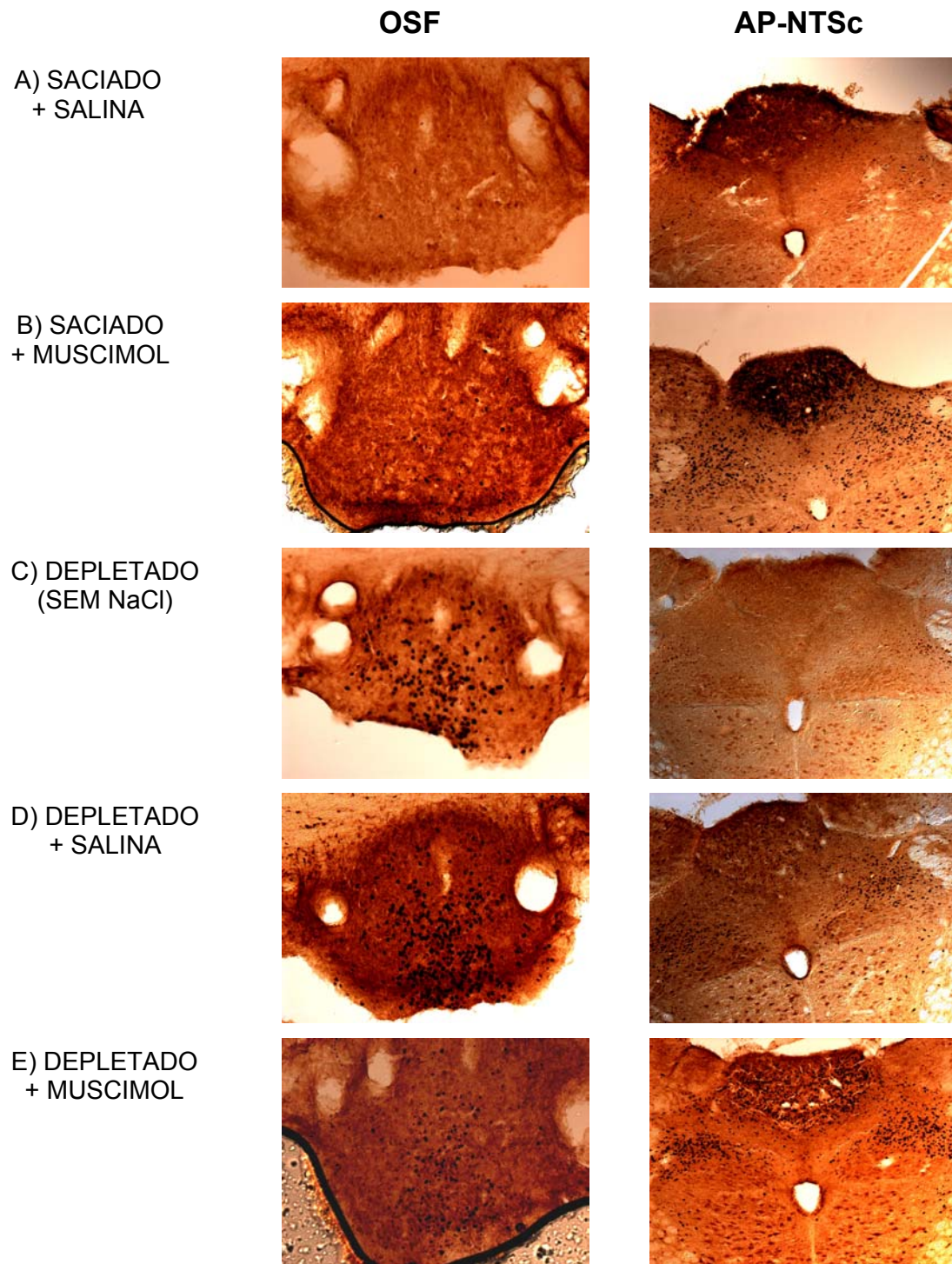


Figura 20: Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de ratos, ilustrando a expressão da proteína c-fos no OSF (painel da esquerda) e AP-NTSc (painel da direita) em ratos saciados (A e B) ou depletados de sódio (C, D e E) por 24 h que receberam ou não (C) injeções bilaterais de salina (A e D) ou muscimol (B e E) no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl (C), receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água.

12. Estudo da expressão da proteína c-fos em neurônios ocitocinérgicos (dupla marcação – c-fos-OT) após injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio que tiveram livre acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Sprague-Dawley – Austrália).

O estudo de dupla marcação (c-fos-OT) foi realizado em ratos saciados e depletados de sódio por 24 h com livre acesso à solução de NaCl 0,3 M e água que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL, além de um grupo controle depletado de sódio por 24 h que não teve acesso a água e NaCl 0,3 M.

Em animais saciados tratados com muscimol no NPBL observou-se um aumento da expressão da proteína c-fos no NPV [$F(4,23) = 5,9; p < 0,05$] (Figuras 21 e 22) e NSO [$F(4,23) = 14,8; p < 0,05$] (Figuras 21 e 22), porém não na atividade de neurônios ocitocinérgicos (Figura 21).

Ratos depletados de sódio por 24 h que receberam muscimol no NPBL não apresentaram alteração na atividade de neurônios ocitocinérgicos, embora tenha havido um aumento na expressão da proteína c-fos no NSO, quando comparados aos animais depletados tratados com salina no NPBL.

A atividade de neurônios ocitocinérgicos após injeções bilaterais de muscimol no NPBL foi maior nos ratos depletados de sódio do que nos ratos saciados tanto no NPV quanto no NSO (Figura 21).

Comparados aos ratos depletados que não tiveram acesso ao NaCl, os ratos com depleção de sódio por 24 h que tiveram acesso ao NaCl apresentaram aumento da atividade de neurônios ocitocinérgicos no NPV e NSO (Figura 21). Quando comparados aos animais saciados tratados com salina no NPBL, os animais depletados de sódio sem acesso ao NaCl apresentaram uma redução na expressão da proteína c-fos no NSO, mas não no NPV.

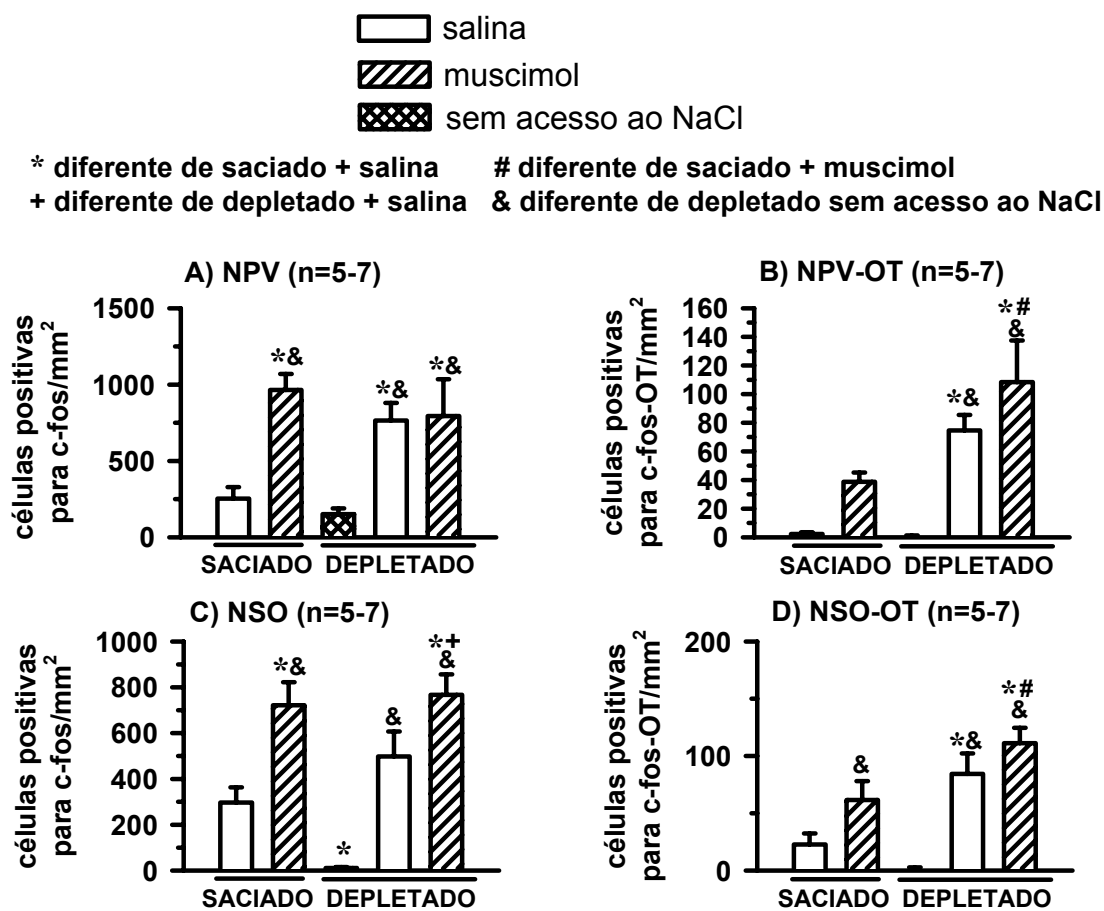


Figura 21: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) no A) NPV e C) NSO e da atividade de neurônios ocitocinérgicos no B) NPV-OT e D) NSO-OT em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais.

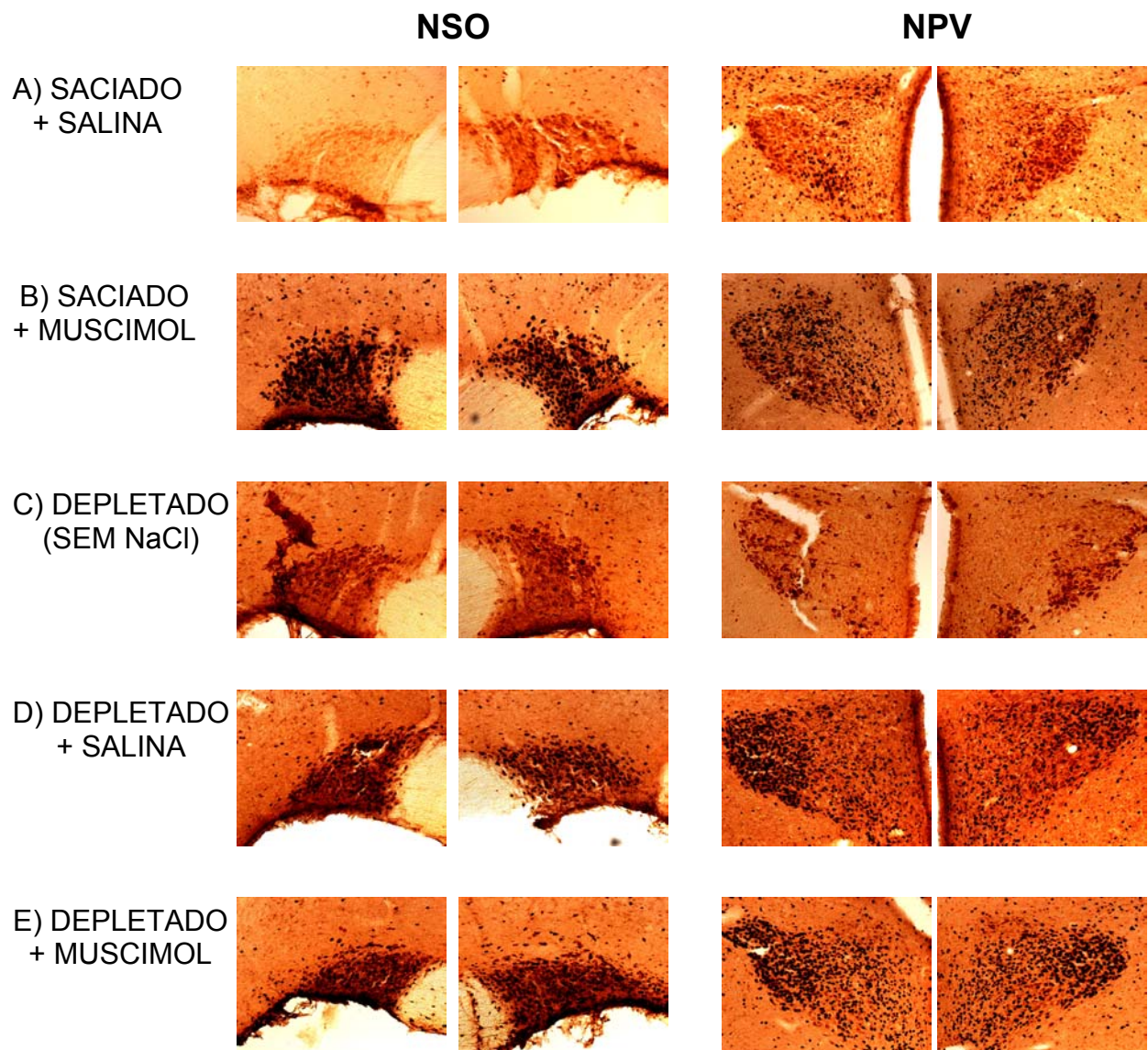


Figura 22: Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de ratos, ilustrando a expressão da proteína c-fos no NSO (painel da esquerda) e NPV (painel da direita) em ratos saciados (A e B) ou depletados de sódio (C, D e E) por 24 h que receberam ou não (C) injeções bilaterais de salina (A e D) ou muscimol (B e E) no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl (C), receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água.

13. Estudo da expressão da proteína c-fos em neurônios serotoninérgicos (dupla marcação – c-fos-5HT) após injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados e depletados de sódio que tiveram livre acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M (ratos Sprague-Dawley – Austrália).

Em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h com livre acesso à solução de NaCl 0,3 M e água que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL foi feito o estudo imunohistoquímico de dupla marcação (c-fos-5HT). Isso também foi feito em um grupo controle depletado de sódio por 24 h que não teve acesso a água e NaCl 0,3 M.

Injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados não alteraram a expressão da proteína c-fos em nenhuma das áreas do sistema da rafe analisadas (Figuras 23, 24 e 25). Algo semelhante ocorreu em relação à atividade de neurônios serotoninérgicos, com exceção de que animais saciados tratados com muscimol apresentaram maior atividade de neurônios serotoninérgicos na RPn [$F(4, 22) = 5,4; p < 0,05$] (Figura 25). Para os animais depletados de sódio também não foram observadas diferenças na expressão de c-fos e na atividade de neurônios serotoninérgicos entre os animais tratados com salina e os animais tratados com muscimol no NPBL (Figuras 23, 24 e 25).

Em comparação ao grupo de animais saciados tratados com salina no NPBL, apenas a depleção de sódio promoveu uma redução na expressão da proteína c-fos na RDa [$F(4, 21) = 6,6; p < 0,05$] (Figuras 23 e 26), RMna [$F(4, 21) = 5,9; p < 0,05$] (Figura 24), RPn [$F(4, 22) = 3,5; p < 0,05$] (Figura 25) e RPa [$F(4, 23) = 4,4; p < 0,05$] (Figuras 25 e 26), sem alterar a atividade de neurônios serotoninérgicos.

Após as injeções bilaterais de muscimol no NPBL, ratos depletados de sódio por 24 h apresentaram menor atividade na RDa (Figuras 23 e 26), RMna (Figura 24) e RPn (Figura 25) quando comparados aos animais saciados tratados com muscimol no NPBL. Já em relação à atividade de neurônios serotoninérgicos, ratos depletados tratados com muscimol apresentaram maior atividade na RDa [$F(4, 21) = 3,1; p < 0,05$] (Figuras 23 e 26) e RPn (Figura 25) e menor atividade na RPa [$F(4, 23) = 4,8; p < 0,05$] (Figuras 25 e 26) do que os ratos saciados que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL.

Para as outras áreas do sistema da rafe analisadas ANOVA não mostrou alterações na expressão da proteína c-fos [RDm [$F(4, 22) = 2,0; p > 0,05$] (Figura

23); RDp [$F(4, 22) = 1,1; p > 0,05$] (Figura 23); RMnm [$F(4, 22) = 2,5; p > 0,05$] (Figura 24); RMg [$F(4, 21) = 1,9; p > 0,05$] (Figura 25)], nem na atividade de neurônios serotoninérgicos [RDm [$F(4, 22) = 1,3; p > 0,05$] (Figura 23); RDp [$F(4, 22) = 0,8; p > 0,05$] (Figura 23); RMna [$F(4, 21) = 2,1; p > 0,05$] (Figura 24); RMnm [$F(4, 22) = 1,6; p > 0,05$] (Figura 24); RMg [$F(4, 21) = 1,0; p > 0,05$] (Figura 25)].

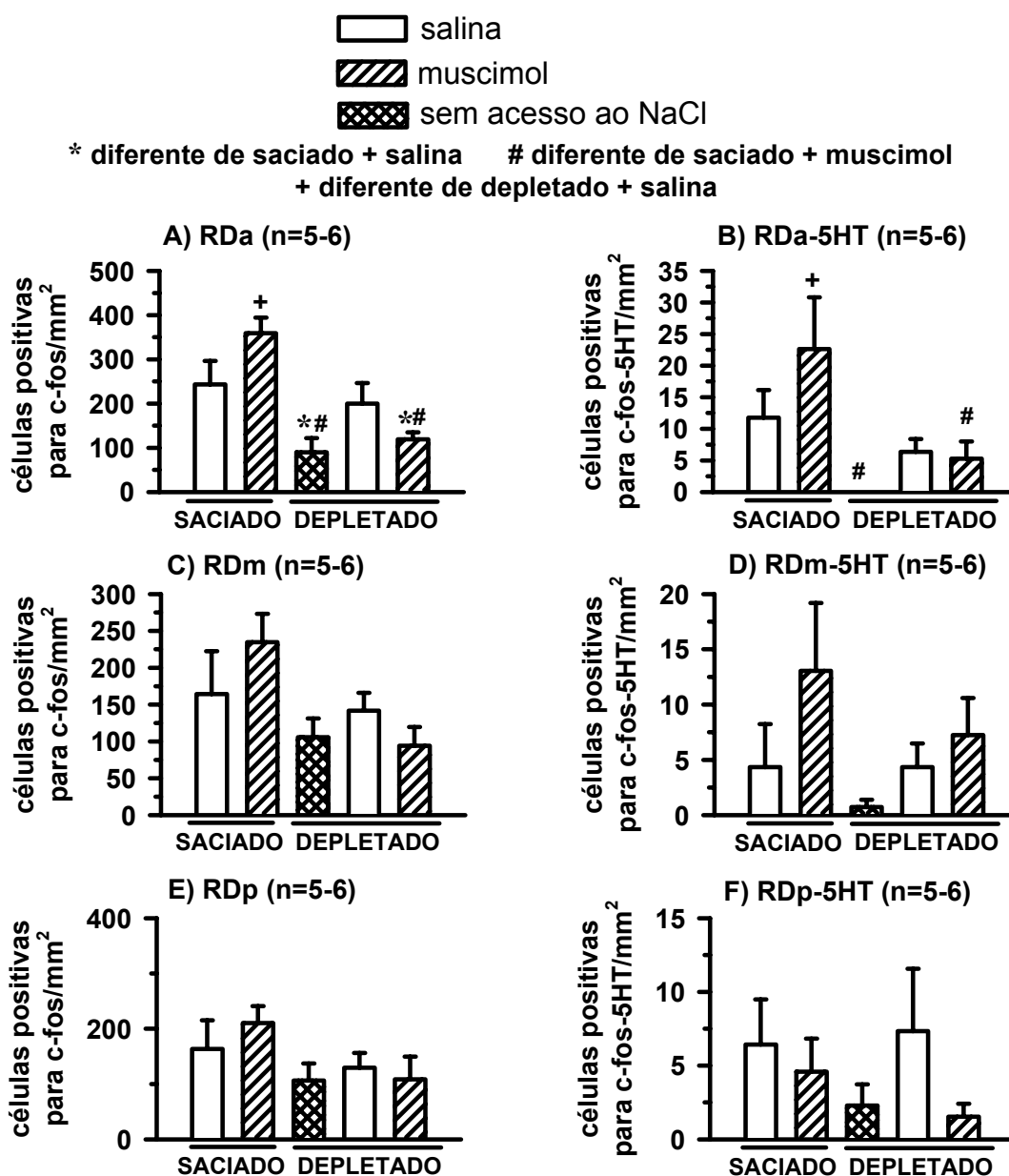


Figura 23: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) na A) RDa; C) RDm e E) RDp e da atividade de neurônios serotoninérgicos na B) RDa-5HT; D) RDm-5HT e F) RDp-5HT em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais.

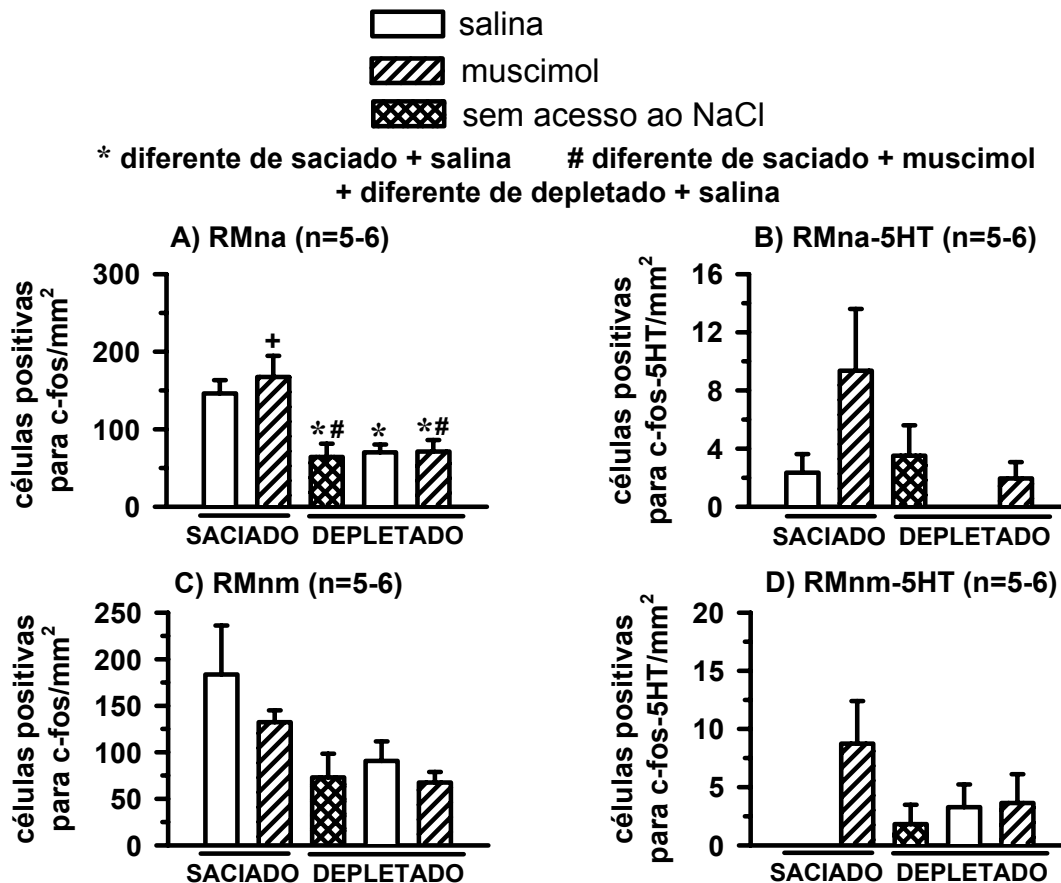


Figura 24: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) na A) RMna e C) RMnm e da atividade de neurônios serotoninérgicos na B) RMna-5HT e D) RMm-5HT em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais.

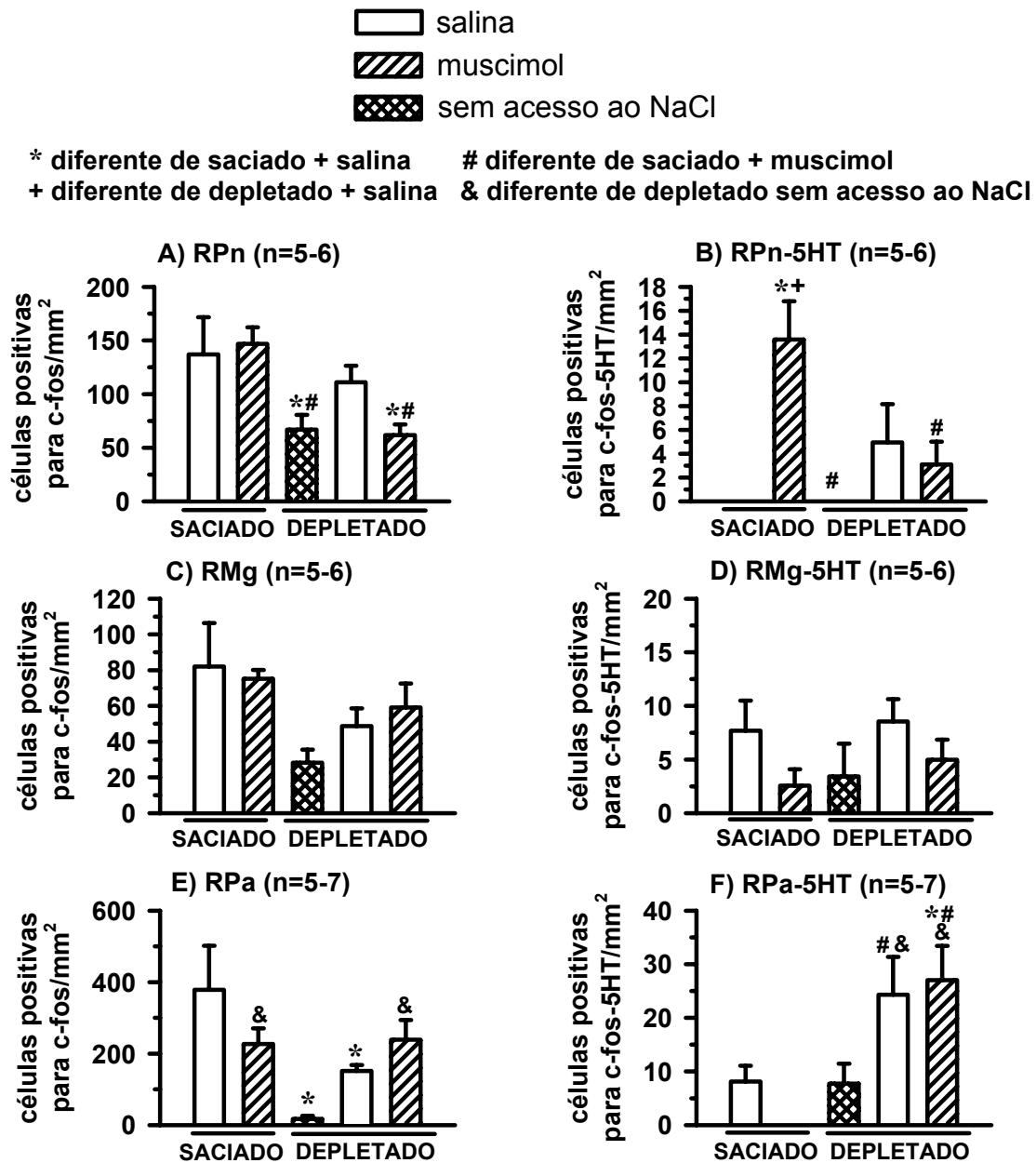


Figura 25: Marcação da proteína c-fos (células positivas para c-fos/mm²) na A) RPn; C) RMg e E) RPa e da atividade de neurônios serotoninérgicos na B) RPn-5HT; D) RMg-5HT e F) RPa-5HT em ratos saciados ou depletados de sódio por 24 h que receberam ou não injeções bilaterais de salina ou muscimol no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl, receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água. Os resultados foram expressos como média ± EPM; n = número de animais.

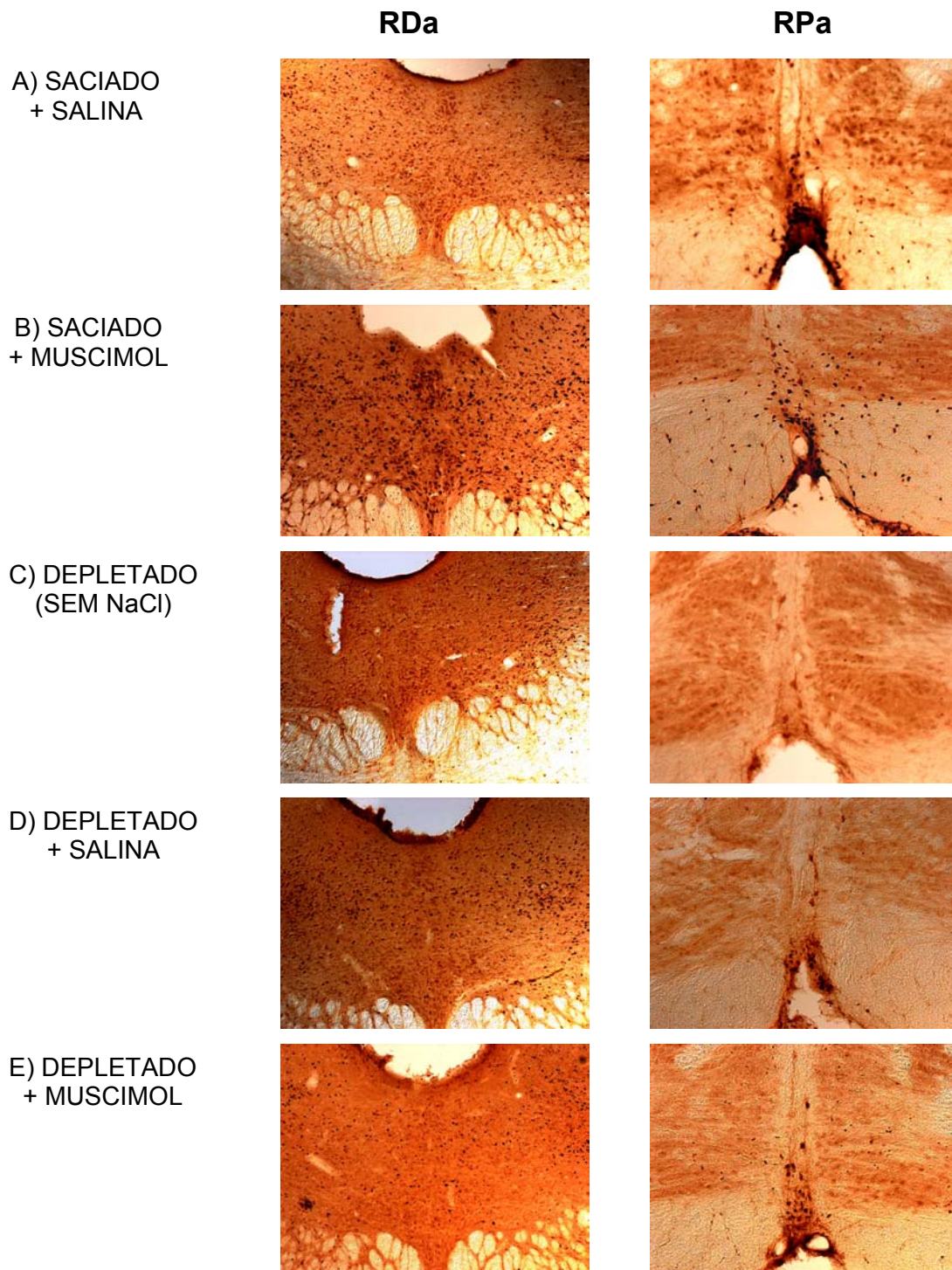


Figura 26: Fotomicrografias de cortes histológicos do cérebro de ratos, ilustrando a expressão da proteína c-fos na RDa (painel da esquerda) e RPa (painel da direita) em ratos saciados (A e B) ou depletados de sódio (C, D e E) por 24 h que receberam ou não (C) injeções bilaterais de salina (A e D) ou muscimol (B e E) no NPBL. Todos os animais, com exceção do grupo depletado sem acesso ao NaCl (C), receberam injeções no NPBL e tiveram livre acesso ao sódio e água.

14. Efeitos da lesão do NTSc sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos normovolêmicos.

A lesão aguda do NTSc (1 dia) promoveu um aumento tanto da ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,224) = 45,3; p < 0,05$] (Figura 27A) quanto de água [$F(3,224) = 11,5; p < 0,05$] (Figura 27B) induzidas pelas injeções bilaterais de baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL.

A lesão aguda do NTSc (3 dias) aumentou também a ingestão de sódio [$F(3,192) = 37,6; p < 0,05$] (Figura 28A) induzida pelo muscimol injetado bilateralmente no NPBL, ao mesmo tempo, que reduziu aos 180 e 210 min de teste, a ingestão de água [$F(3,192) = 18,4; p < 0,05$] (Figura 28B).

- lesão fictícia + salina △ lesão NTSc + salina
 ● lesão fictícia + baclofen ▲ lesão NTSc + baclofen

* diferente de lesão fictícia + salina

+ diferente de lesão fictícia + baclofen

diferente de lesão NTSc + saline

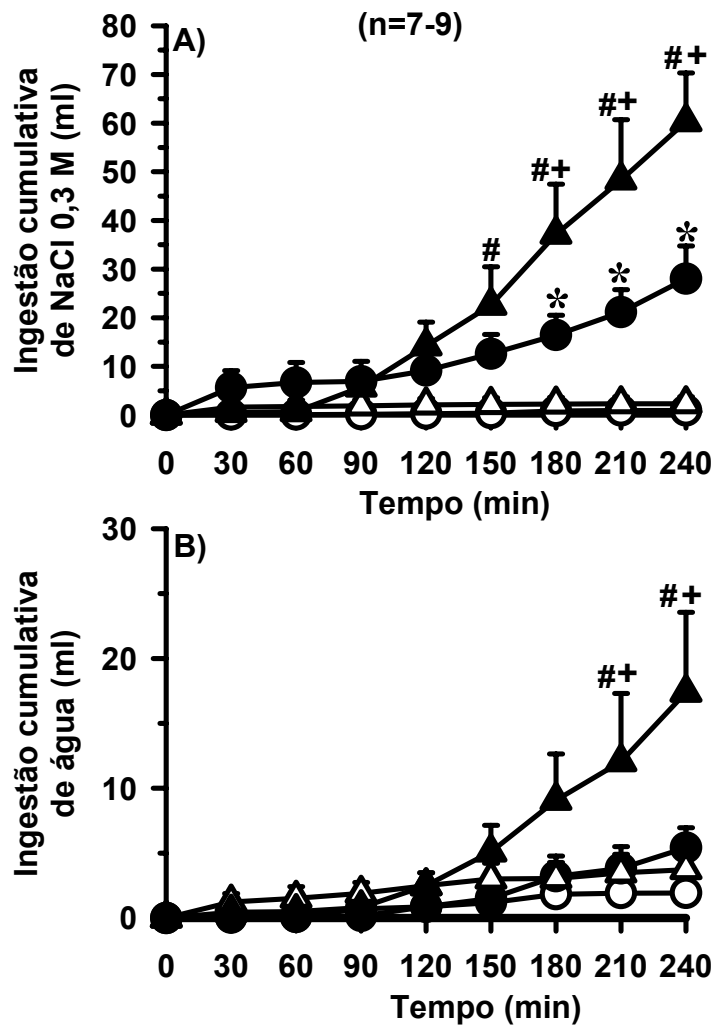


Figura 27: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados com lesão fictícia ou lesão aguda do NTSc (1 dia) que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

- lesão fictícia + salina △ lesão NTSc + salina
- lesão fictícia + muscimol ▲ lesão NTSc + muscimol

* diferente de lesão fictícia + salina

+ diferente de lesão fictícia + muscimol

diferente de lesão NTSc + salina

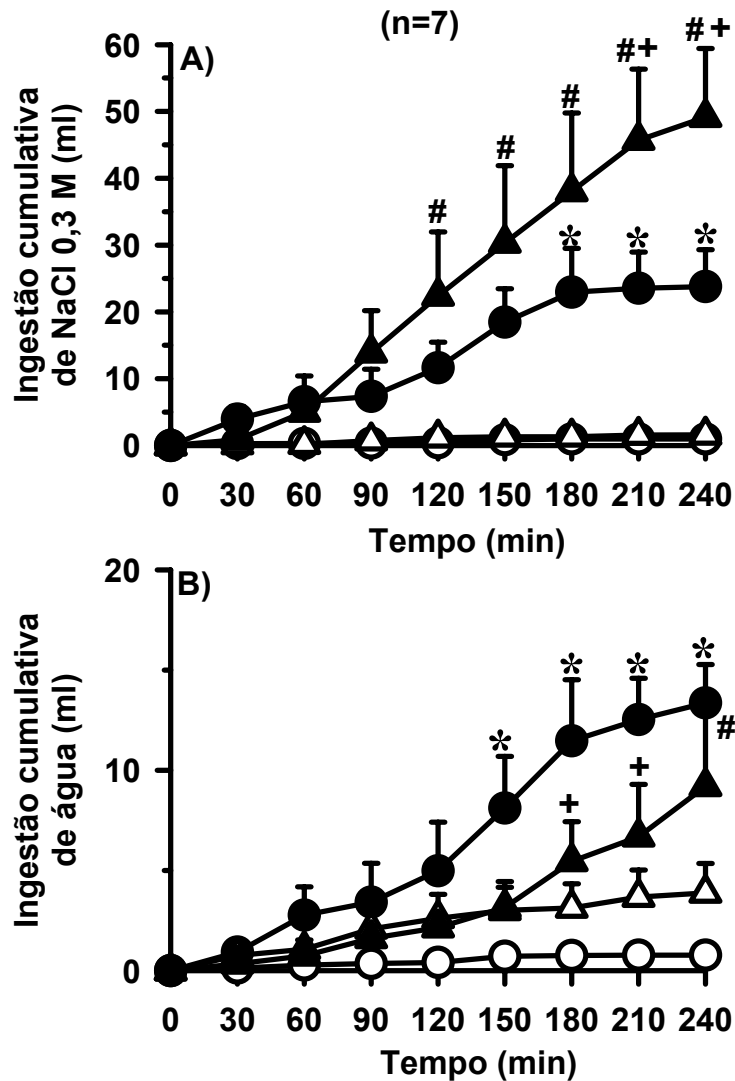


Figura 28: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados com lesão fictícia ou lesão aguda do NTSc (3 dias) que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais.

15. Efeitos da lesão da região AV3V sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos.

A lesão aguda da região AV3V (1 dia) aboliu tanto a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,278) = 64,7; p < 0,05$] (Figura 29A) quanto a de água [$F(3,278) = 12,6; p < 0,05$] (Figura 29B) induzidas pelas injeções bilaterais de baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL.

Em relação ao muscimol, a lesão aguda da região AV3V (3 dias) também aboliu tanto a ingestão de sódio [$F(3,272) = 27,1; p < 0,05$] (Figura 30A) quanto a de água [$F(3,272) = 17,4; p < 0,05$] (Figura 30B) induzidas pelo muscimol injetado bilateralmente no NPBL em ratos saciados. O grupo com lesão da região AV3V + salina apresentou em relação ao seu controle (lesão fictícia + salina) uma tendência em aumentar a ingestão de NaCl 0,3 M e aumentou significativamente a ingestão de água (Figura 30).

- lesão fictícia + salina
- lesão fictícia + baclofen
- △ lesão AV3V + salina
- ▲ lesão AV3V + baclofen

* diferente de lesão fictícia + salina

+ diferente de lesão AV3V + baclofen

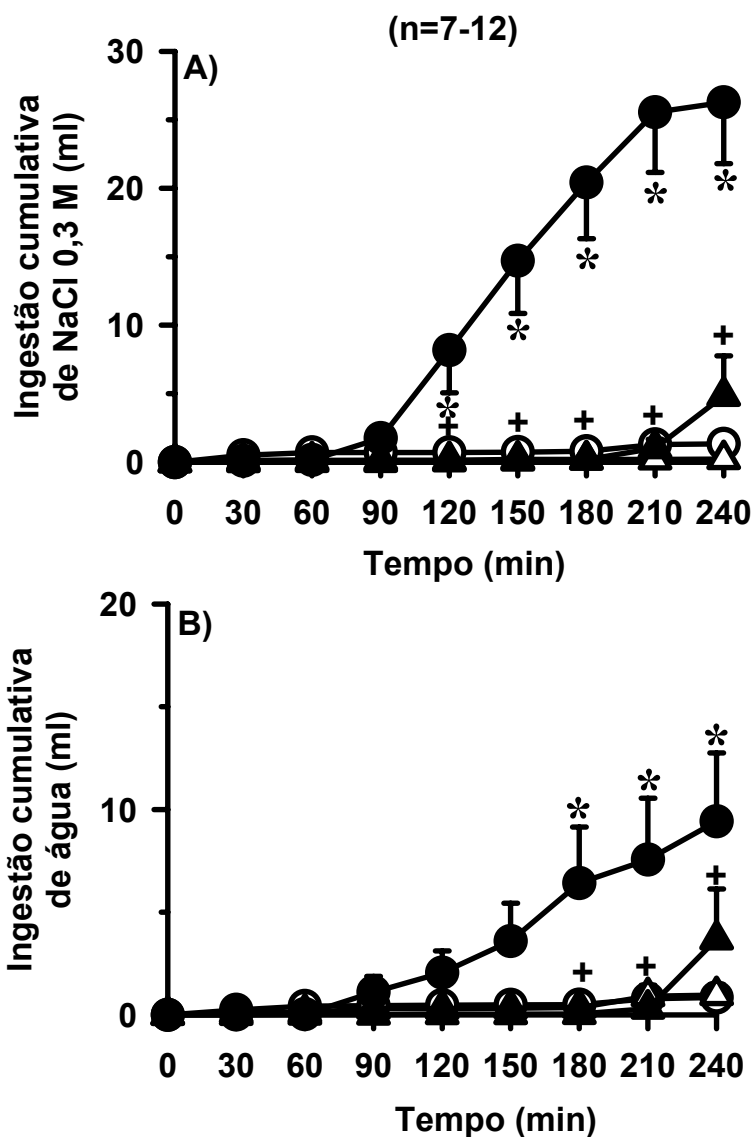


Figura 29: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados com lesão fictícia ou lesão aguda da região AV3V (1 dia) que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

- lesão fictícia + salina △ lesão AV3V + salina
- lesão fictícia + muscimol ▲ lesão AV3V + muscimol

* diferente de lesão fictícia + salina

+ diferente de lesão fictícia + muscimol

diferente de lesão AV3V + salina

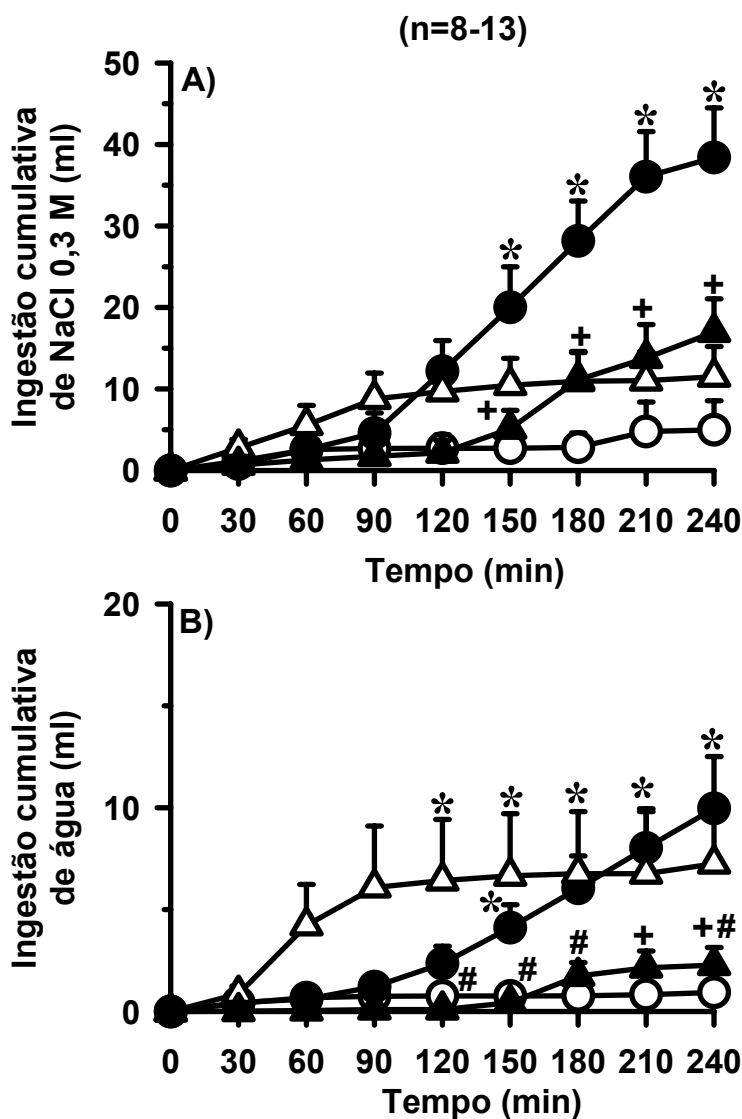
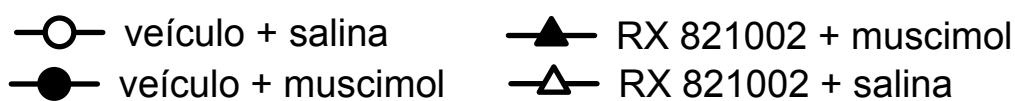


Figura 30: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados com lesão fictícia ou lesão aguda da região AV3V (3 dias) que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

16. Efeitos da associação de RX 821002 e muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,15) = 8,2, p < 0,05$] (Figura 31A) e [$F(3,18) = 3,7, p < 0,05$] (Figura 32A), respectivamente. RX 821002 (10 nmol/0,2 µl) reduziu o efeito natriorexigênico do muscimol nos últimos 90 minutos de experimento e do baclofen nos últimos 30 minutos de experimento (Figuras 31A e 32A, respectivamente). Todavia é importante mencionar que a associação RX 821002 + baclofen não foi diferente da associação veículo + salina ao longo de todo experimento.

Em relação à ingestão de água, muscimol, mas não baclofen, induziu ingestão de água [$F(3,15) = 9,9, p < 0,05$] (Figura 31B); [$F(3,18) = 1,9, p > 0,05$] (Figura 32B), respectivamente. ANOVA mostrou significância para a interação tratamento-tempo tanto para o grupo do muscimol quanto para o grupo do baclofen [$F(21,105) = 8,7, p < 0,05$] (Figura 31B); [$F(21,126) = 1,9, p < 0,05$] (Figura 32B), respectivamente. A injeção prévia de RX 10 nmol praticamente aboliu a ingestão de água induzida pelo muscimol (Figura 31B), porém não alterou a ingestão de água quando comparada ao grupo veículo + baclofen (Figura 32B). Na verdade, observou-se uma maior ingestão de água nos animais após a associação RX + baclofen em comparação com a associação veículo + salina (Figura 32B).



* diferente de veículo + salina

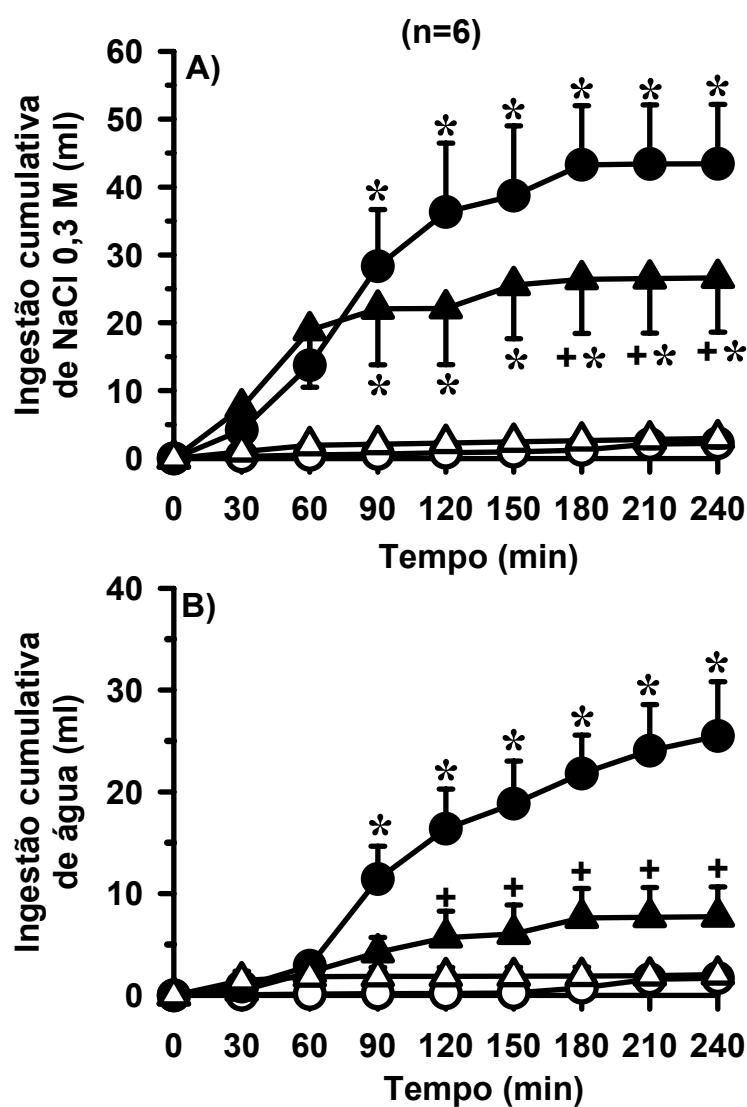


Figura 31: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou RX 821002 (10 nmol/0,2 μ l) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

○ veículo + salina ▲ RX 821002 + baclofen
 ● veículo + baclofen △ RX 821002 + salina

* diferente de veículo + salina

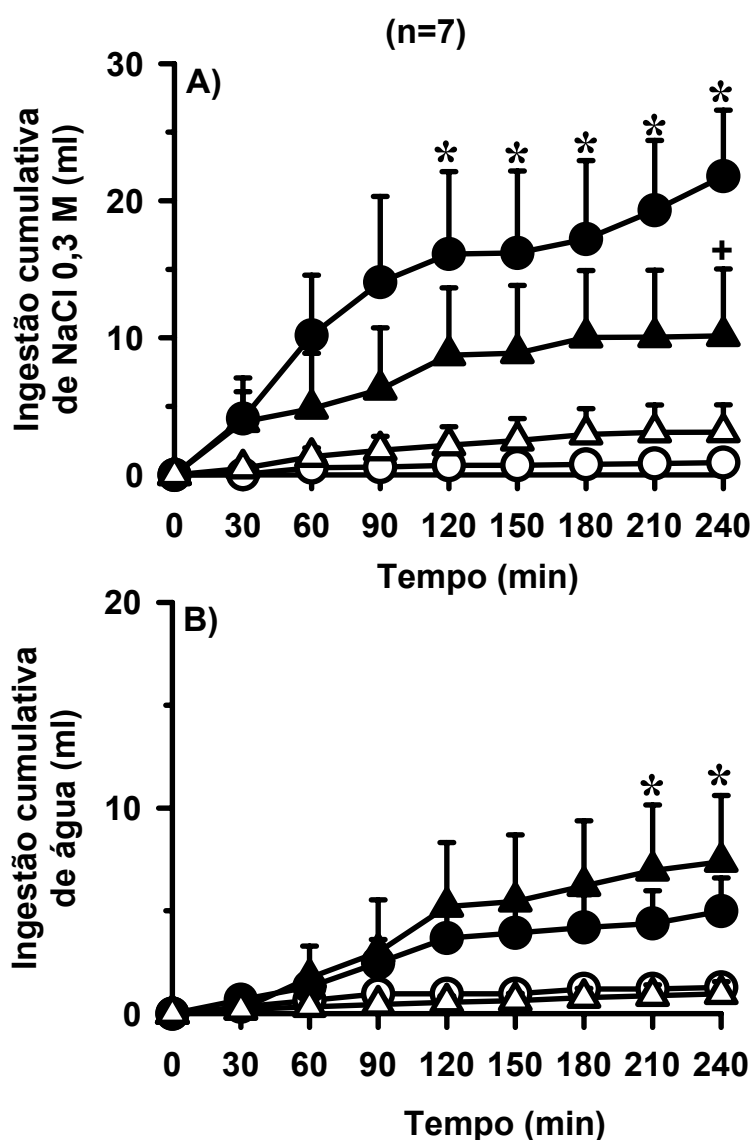


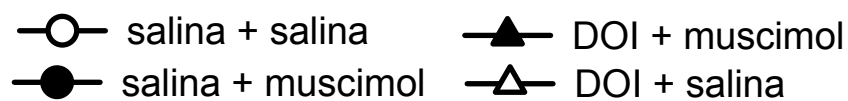
Figura 32: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou RX 821002 (10 nmol/0,2 μ l) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

17. Efeitos da associação de DOI e muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) injetado bilateralmente no NPBL em ratos saciados induziu ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,176) = 26,6; p < 0,05$] (Figura 33A) e de água [$F(3,176) = 9,1; p < 0,05$] (Figura 33B), sendo a ingestão de sódio induzida pelo muscimol abolida pela injeção prévia do agonista serotoninérgico dos receptores 5HT_{2A/2C}, DOI (5 µg/0,2 µl) (Figura 33A).

Em relação à ingestão de água, a associação DOI + muscimol não foi estatisticamente diferente das combinações salina + salina ou salina + muscimol (Figura 33B).

Injeções bilaterais de DOI (5 µg/0,2 µl) no NPBL não afetaram a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,24) = 8,4; p < 0,05$] (Figura 34A) e água [$F(3,24) = 4,9; p < 0,05$] (Figura 34B) induzidas pela injeção de baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) também no NPBL.



* diferente de salina + salina

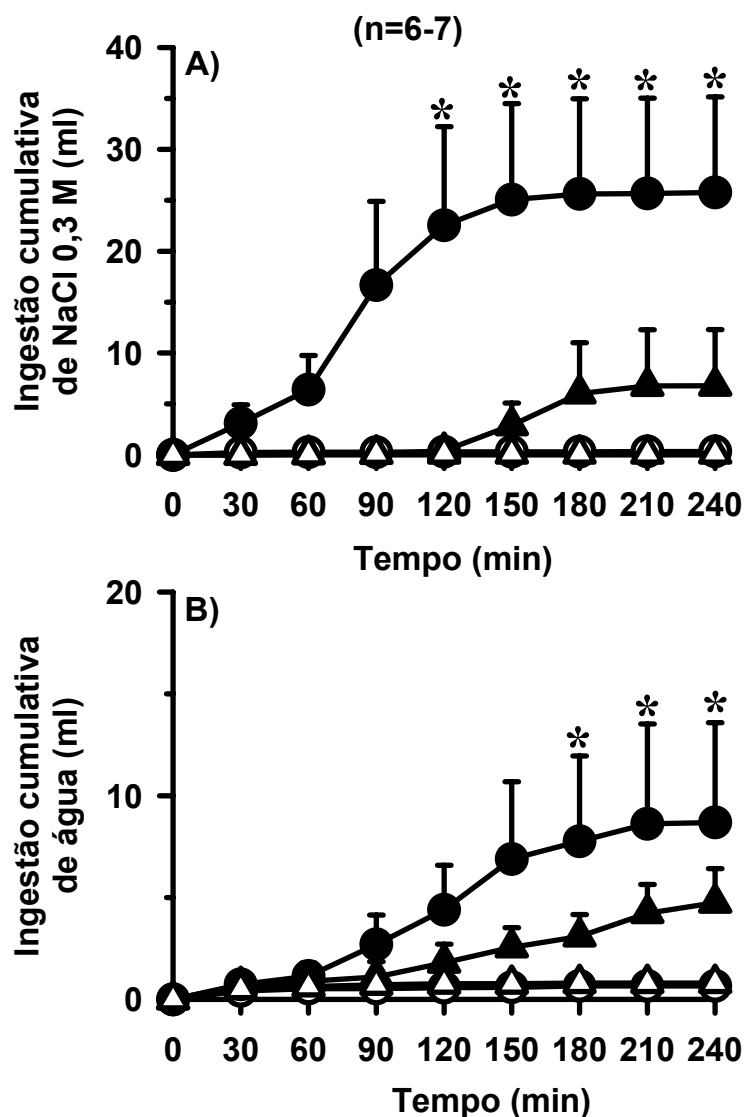


Figura 33: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de salina ou DOI (5 μ g/0,2 μ l) + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.



* diferente de salina + salina

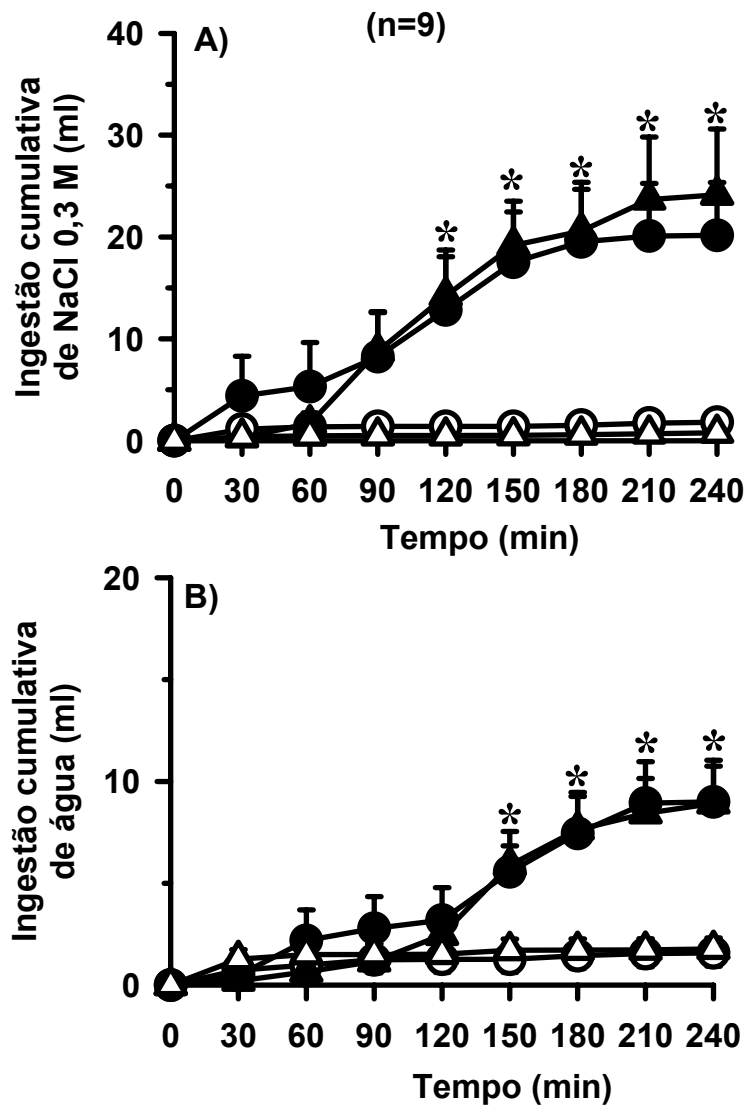


Figura 34: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de salina ou DOI (5 μ g/0,2 μ l) + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

18. Efeitos da associação de naloxona e muscimol ou baclofen injetados no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos normovolêmicos.

Em ratos saciados, injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,224) = 61,8; p < 0,05$] (Figura 35A); [$F(3,184) = 40,1; p < 0,05$] (Figura 35B); [$F(3,232) = 126,9; p < 0,05$] (Figura 35C), para os grupos de naloxona nas doses de 20, 40 e 60 µg/0,2 µl, respectivamente. Enquanto a injeção prévia de naloxona na dose de 60 µg/0,2 µl, aboliu, na dose de 40 µg/0,2 µl naloxona foi capaz apenas de reduzir parcialmente, ao longo de todo experimento, o efeito natriorexigênico do muscimol. Já na dose de 20 µg/0,2 µl, naloxona foi capaz apenas de reduzir por 90 minutos a ingestão de sódio induzida pelo muscimol injetado bilateralmente no NPBL. Para a ingestão de água, observou-se que as doses de 40 e 60 µg/0,2 µl de naloxona foram capazes de abolirem, enquanto a dose de 20 µg/0,2 µl, apenas reduziu, a ingestão de água induzida pelo muscimol [$F(3,224) = 53,9; p < 0,05$] (Figura 36A); [$F(3,184) = 9,8; p < 0,05$] (Figura 36B); [$F(3,232) = 82,6; p < 0,05$] (Figura 36C).

Em relação ao agonista de receptores GABA_B, injeções bilaterais de baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,200) = 22,7; p < 0,05$] (Figura 37A); [$F(3,200) = 21,1; p < 0,05$] (Figura 37B); [$F(3,192) = 30,7; p < 0,05$] (Figura 37C), para os grupos de naloxona nas doses de 20, 40 e 60 µg/0,2 µl, respectivamente. Enquanto naloxona, nas doses de 40 e 60 µg/0,2 µl aboliu, naloxona na dose de 20 µg/0,2 µl não alterou, o efeito natriorexigênico do baclofen injetado bilateralmente no NPBL (Figura 37). O antagonista opióide naloxona na dose de 20 µg/0,2 µl aumentou nos últimos 30 minutos de experimento a ingestão de água (Figura 38A) que acompanha a ingestão de sódio induzida pelo baclofen injetado no NPBL. Já naloxona nas doses de 40 e 60 µg/0,2 µl reduziu parcialmente ou aboliu, respectivamente, ao longo de todo experimento, a ingestão de água induzida pelo baclofen no NPBL (Figuras 38B e 38C, respectivamente).

No grupo do baclofen, a associação naloxona 40 µg + salina promoveu uma redução da ingestão de água quando comparada ao grupo controle (veículo + salina) (Figura 38B).

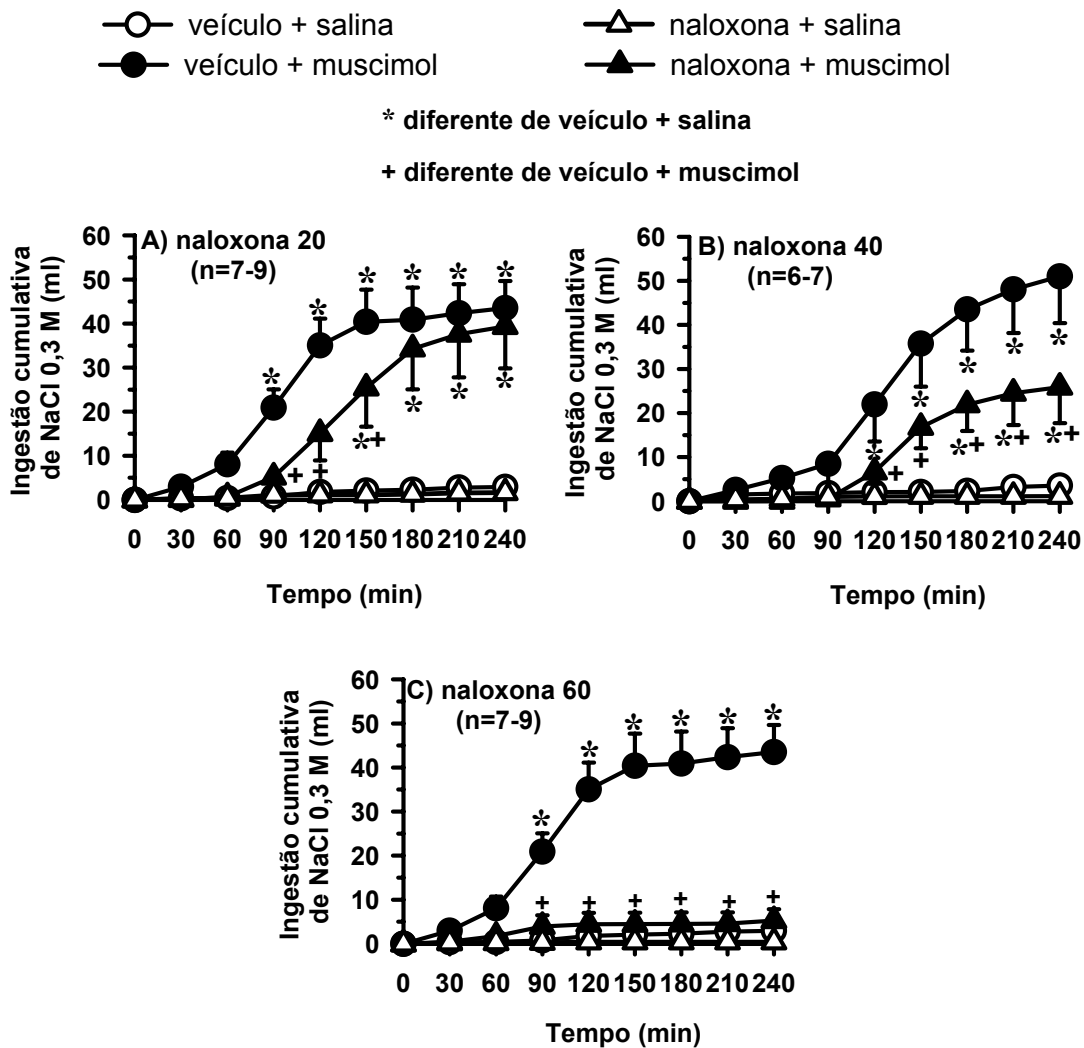


Figura 35: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou A) naloxona 20 µg/0,2 µl; B) naloxona 40 µg/0,2 µl; C) naloxona 60 µg/0,2 µl + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais.

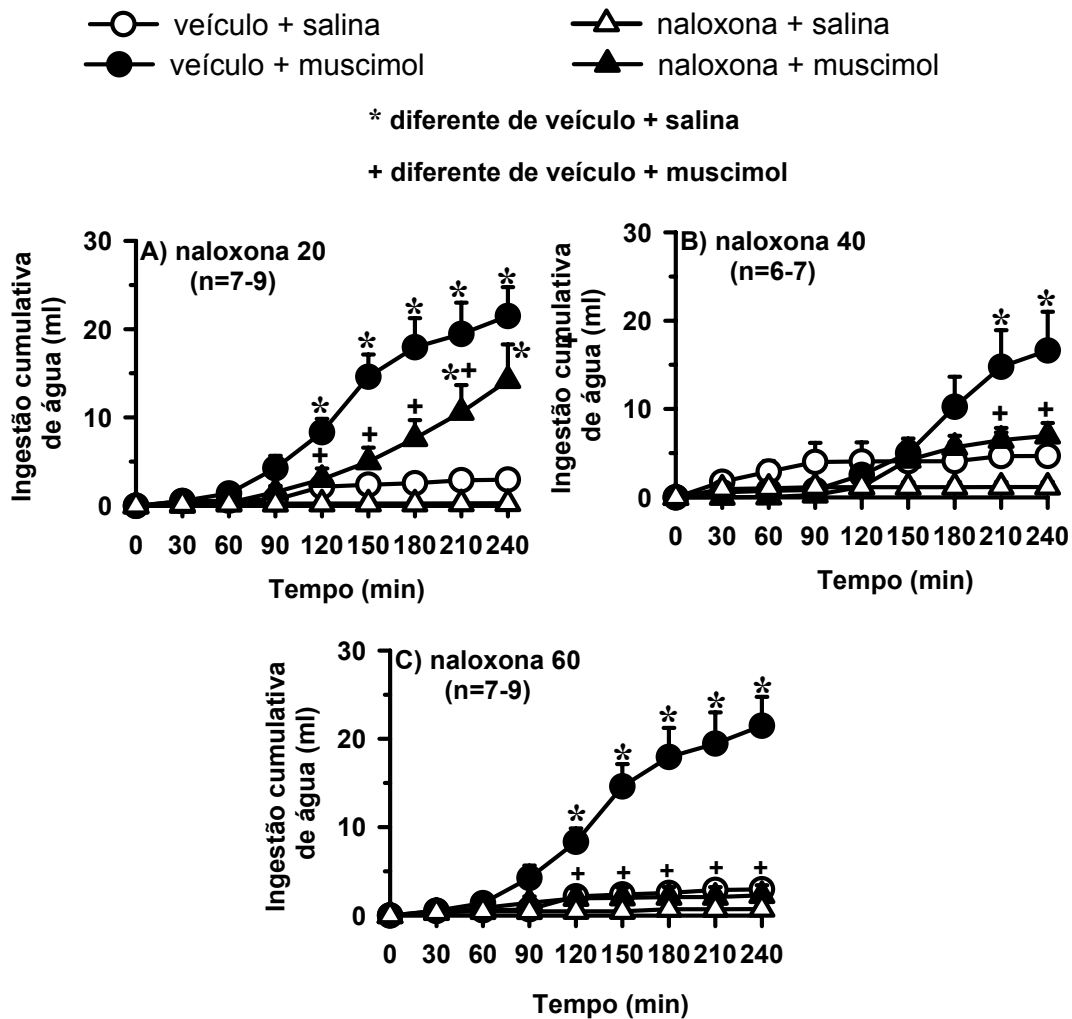


Figura 36: Ingestão cumulativa de água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou A) naloxona 20 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$; B) naloxona 40 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$; C) naloxona 60 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

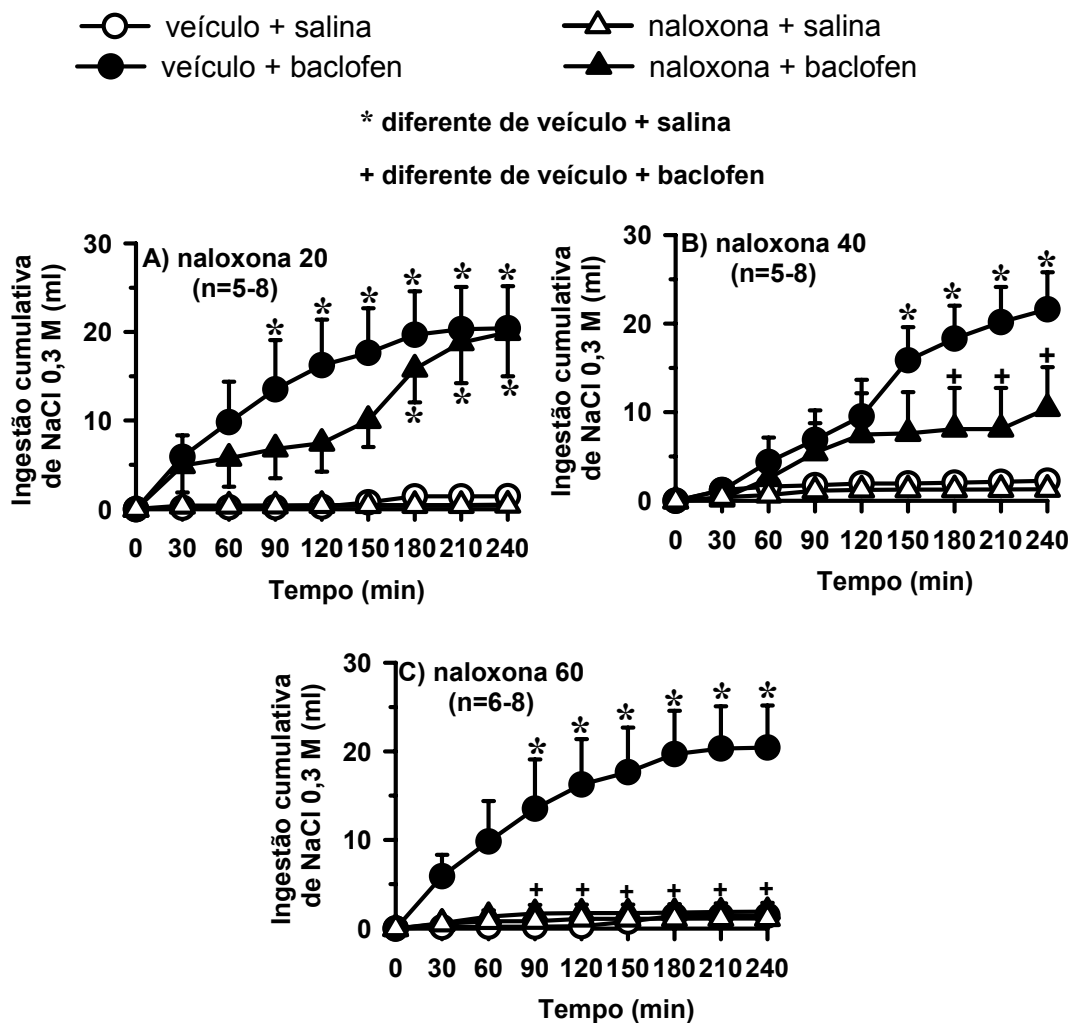


Figura 37: Ingestão cumulativa de NaCl 0,3 M em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou A) naloxona 20 µg/0,2 µl; B) naloxona 40 µg/0,2 µl; C) naloxona 60 µg/0,2 µl + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais.

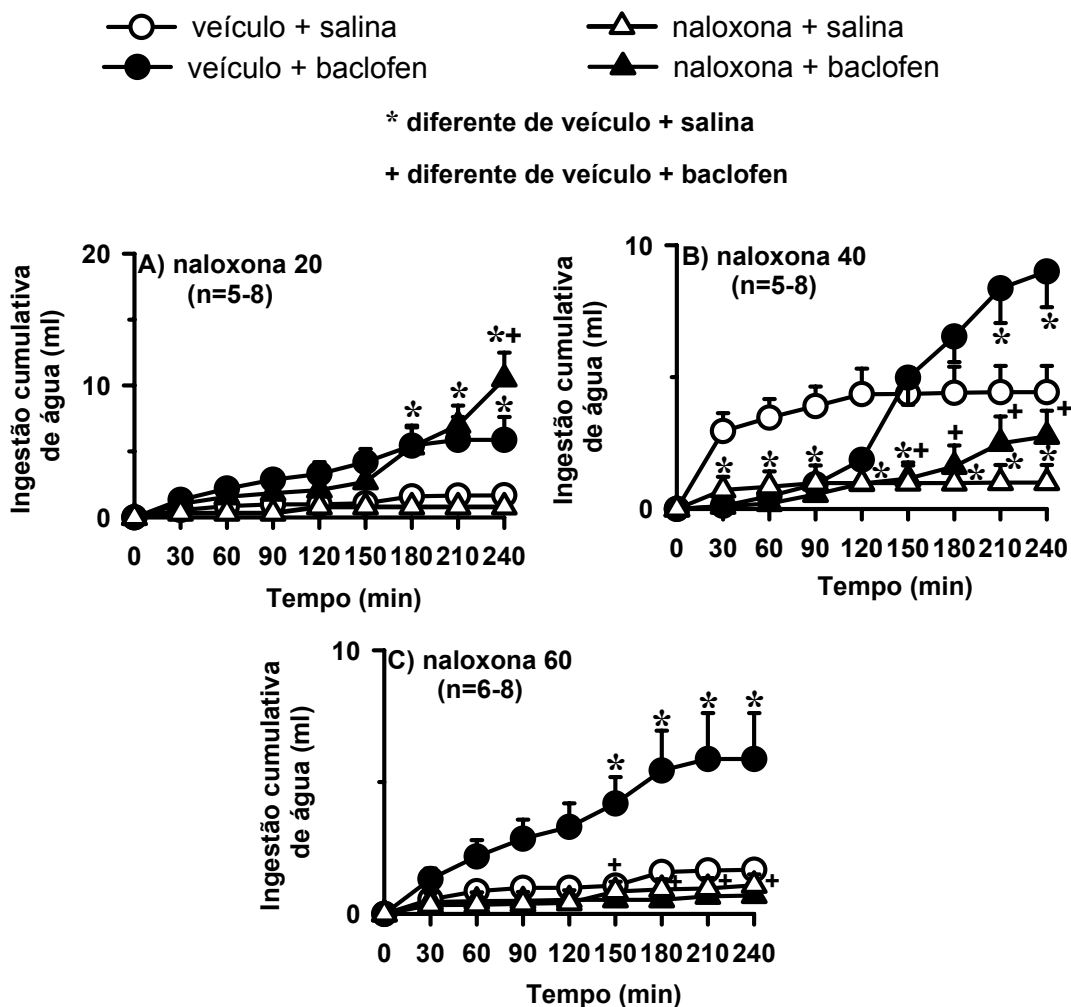


Figura 38: Ingestão cumulativa de água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou A) naloxona 20 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$; B) naloxona 40 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$; C) naloxona 60 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$ + salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μl) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

19. Efeitos da ativação de mecanismos opióides no NPBL sobre a ingestão de água e de NaCl 0,3 M em ratos saciados e normovolêmicos.

Injeções bilaterais do agonista de receptores opióides, β endorfina (2 nmol/0,2 μ l), no NPBL induziu ingestão de NaCl 0,3 M [$F(7,42) = 3,5; p < 0,05$] e água [$F(7,42) = 9,2; p < 0,05$] em ratos saciados (Figura 39) como indicado pela ANOVA através da interação significativa entre tratamento e tempo.

Em um outro grupo de ratos foi feita a associação naloxona (40 μ g/0,2 μ l) + β endorfina (2 nmol/0,2 μ l), sendo que injeções prévias de naloxona aboliram os efeitos da β endorfina sobre as ingestões de NaCl 0,3 M [$F(3,18) = 7,4; p < 0,05$] e água [$F(3,18) = 5,9; p < 0,05$] (Figura 40) em ratos saciados.

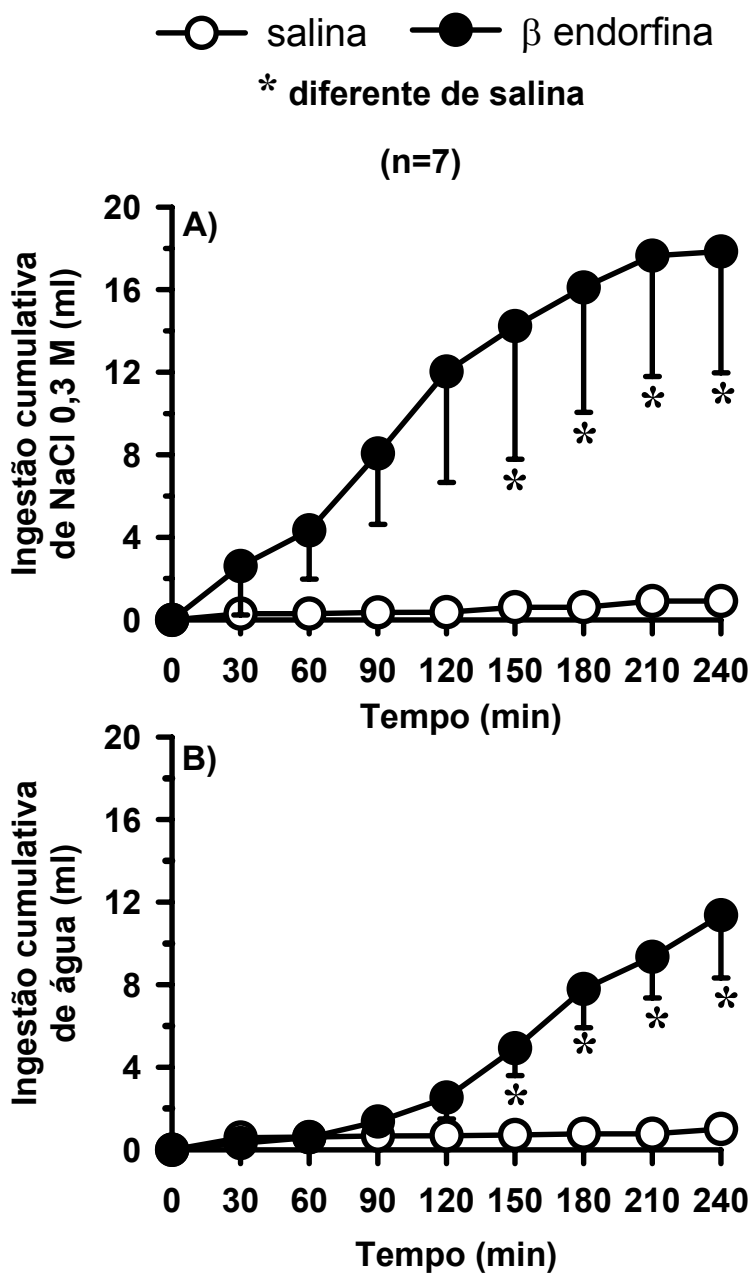


Figura 39: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de salina ou β endorfina (2 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

- veículo + salina △ naloxona + salina
 ● veículo + β endorfina ▲ naloxona + β endorfina

* diferente de veículo + salina

+ diferente de veículo + β endorfina

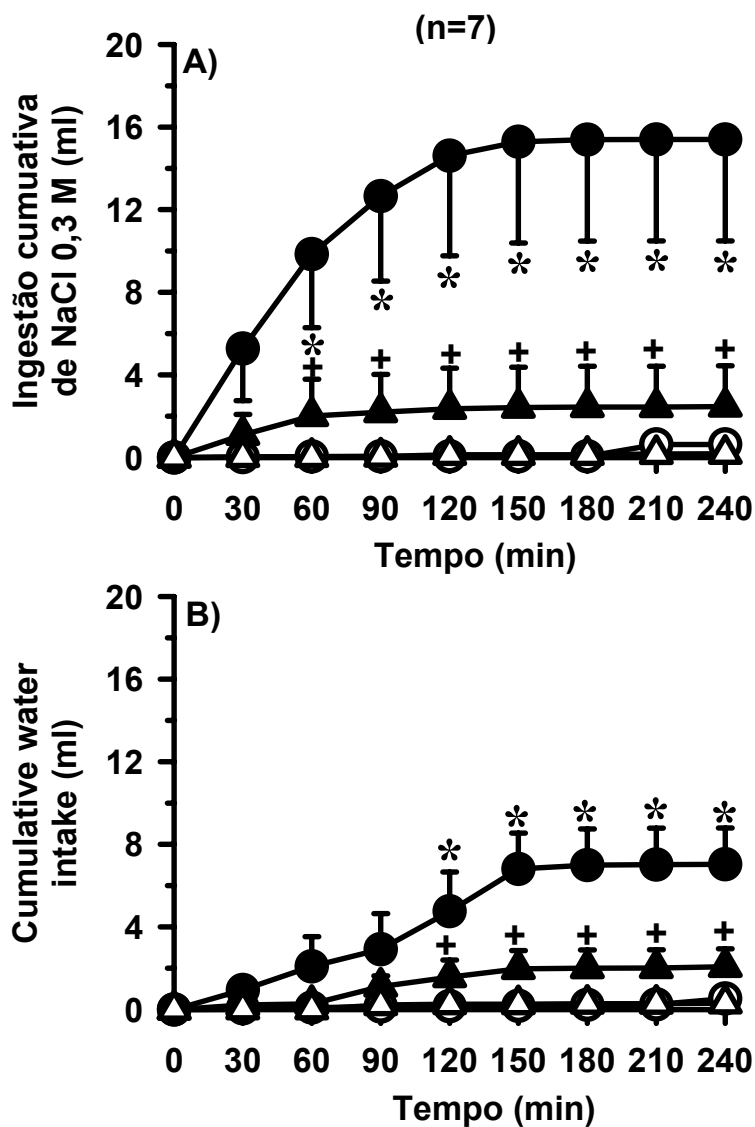


Figura 40: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos saciados que receberam injeções bilaterais de veículo ou naloxona (40 μ g/0,2 μ l) + salina ou β endorfina (2 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de ratos.

20. Efeitos da administração de β endorfina no NPBL sobre a ingestão de água e/ou sacarose 2% em ratos saciados e normovolêmicos.

Injeções bilaterais de β endorfina (2 nmol/0,2 μ l) no NPBL não induziu ingestão de água em ratos saciados e normovolêmicos, quando apenas água estava disponível para os animais [$F(1,7) = 2,1; p > 0,05$] (Tabela 3).

Quando foram oferecidas duas buretas para os animais: água e solução de sacarose 2%, injeções de β endorfina no NPBL também não alteraram nem a ingestão de água [$F(1,12) = 0,04; p > 0,05$] (Tabela 4) nem a de sacarose 2% [$F(1,12) = 0,4; p > 0,05$] (Tabela 4).

Tabela 3: Ingestão cumulativa (ml) de água em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou β -endorfina no NPBL.

tempo (min)	tratamento	
	salina	β -endorfina
	água	
30	0,3 \pm 0,1	0,5 \pm 0,2
60	0,4 \pm 0,1	1,3 \pm 0,8
90	0,4 \pm 0,1	2,2 \pm 1,3
120	0,6 \pm 0,2	3,3 \pm 1,4
150	0,9 \pm 0,3	3,9 \pm 1,9
180	1,2 \pm 0,4	4,1 \pm 1,9
210	1,6 \pm 0,4	4,2 \pm 1,9
240	1,7 \pm 0,4	4,2 \pm 1,9

Salina - 0,2 μ l; β -endorfina - 2 nmol/0,2 μ l. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n= 8.

Tabela 4: Ingestão cumulativa (ml) de água e sacarose 2% em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou β -endorfina no NPBL.

tempo (min)	tratamento	
	salina	β -endorfina
	água	
30	0,3 \pm 0,2	0,1 \pm 0,0
60	0,4 \pm 0,3	0,2 \pm 0,1
90	0,5 \pm 0,3	0,4 \pm 0,2
120	0,5 \pm 0,3	0,7 \pm 0,3
150	0,5 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3
180	0,5 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3
210	0,6 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3
240	0,6 \pm 0,3	0,8 \pm 0,3
	sacarose 2%	
30	1,1 \pm 0,4	0,4 \pm 0,2
60	1,4 \pm 0,5	0,5 \pm 0,3
90	1,7 \pm 0,6	1,5 \pm 0,6
120	2,3 \pm 0,8	3,5 \pm 1,3
150	2,4 \pm 0,8	4,3 \pm 1,4
180	2,8 \pm 0,8	4,5 \pm 1,4
210	2,8 \pm 0,8	4,5 \pm 1,4
240	2,8 \pm 0,8	4,6 \pm 1,4

Salina - 0,2 μ l; β -endorfina - 2 nmol/0,2 μ l. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n= 13.

21. Efeitos da administração de naloxona no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em ratos com depleção de sódio.

Injeções bilaterais no NPBL do antagonista opióide, naloxona, na dose de 40 µg/0,2 µl reduziu a ingestão de NaCl 0,3 M [$F(3,154) = 34,0; p < 0,05$] (Figura 41A) induzida pela depleção de sódio por 24 h ao longo de todo experimento (180 min). Naloxona nas doses de 20 e 60 µg promoveu uma redução que durou até os 150 min de experimento (Figura 41A).

Em relação à ingestão de água, apenas naloxona na dose 20 µg promoveu um pequeno aumento na ingestão de água que acompanha a ingestão de sódio no tempo de 150 min [$F(3,154) = 8,3; p < 0,05$] (Figura 41B).

- salina (n=6)
- naloxona 20 μg (n=7)
- △ naloxona 40 μg (n=6)
- ▲ naloxona 60 μg (n=7)

* diferente de salina

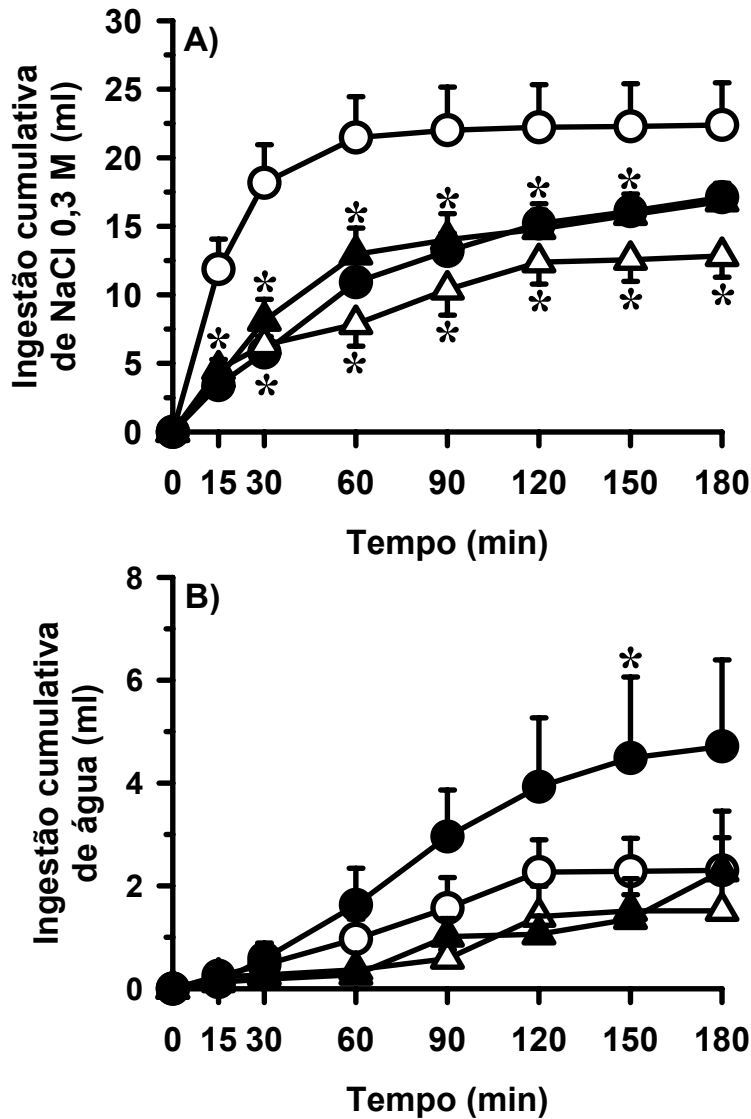


Figura 41: Ingestão cumulativa de: A) NaCl 0,3 M e B) água em ratos depletados de sódio por 24 h que receberam injeções bilaterais de veículo, naloxona (20, 40 e 60 $\mu\text{g}/0,2 \mu\text{l}$) no NPBL e tiveram livre acesso a água e NaCl 0,3 M. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

22. Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água (apenas água disponível) em ratos saciados ou privados de água por 24 h.

Em ratos saciados, injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL induziram uma pequena ingestão de água [$F(7,70) = 2,6; p < 0,05$] (Figura 42A), enquanto que injeções bilaterais de baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL não alteraram a ingestão de água [$F(1,5) = 0,6; p > 0,05$] (Figura 38B) em ratos saciados e normovolêmicos.

Em animais privados de água por 24 h, muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) injetado no NPBL aumentou a ingestão de água após 150 min de ingestão [$F(8,64) = 5,7; p < 0,05$] (Figura 42C) e o baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) promoveu um aumento na ingestão de água após 180 min [$F(8,72) = 25,7; p < 0,05$] (Figura 42D) como mostrado pela ANOVA através da interação significativa entre tratamento-tempo.

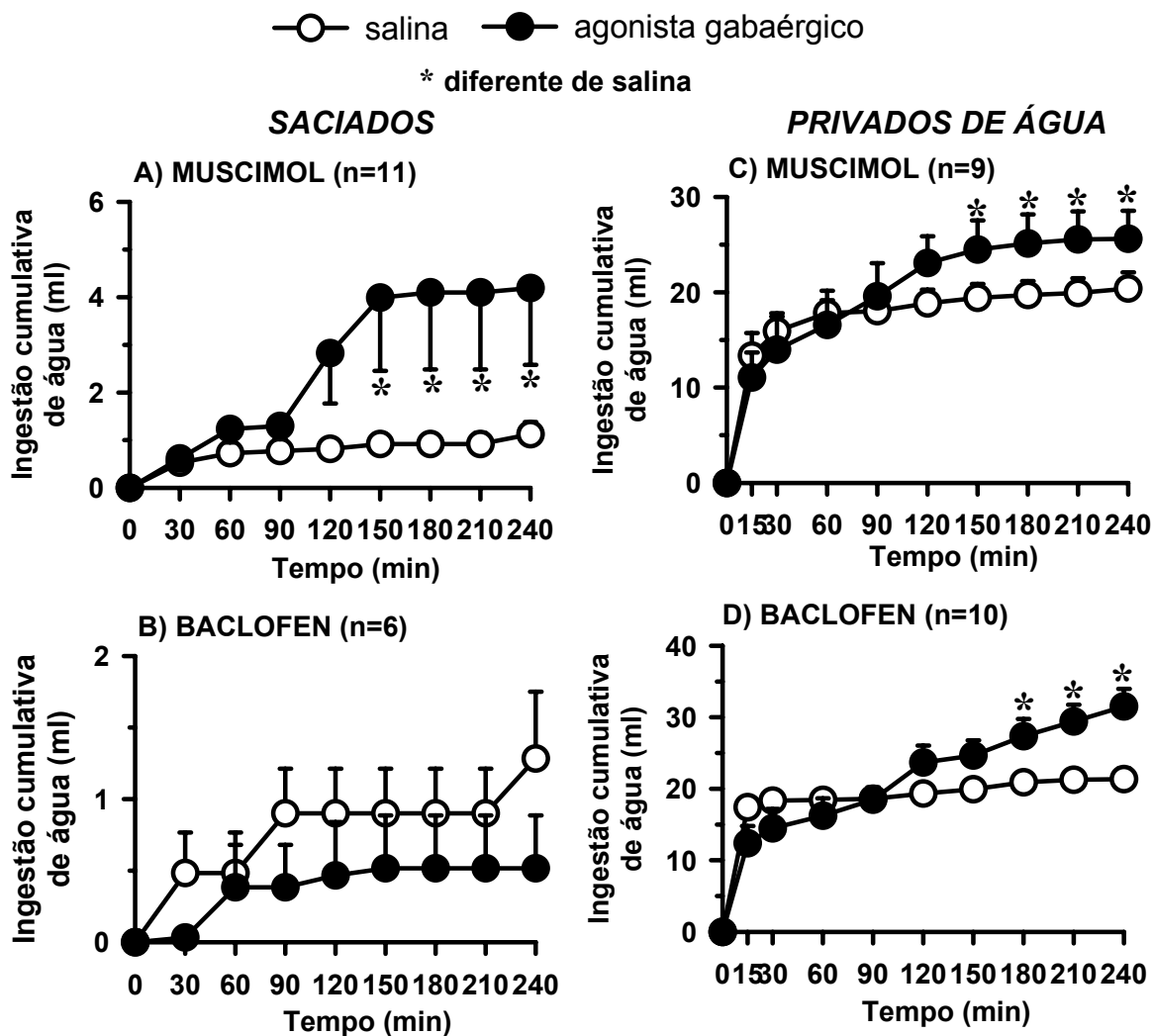


Figura 42: Ingestão cumulativa de água em ratos saciados (lado esquerdo) e privados de água por 24 h (lado direito) que receberam injeções bilaterais de salina, A) e C) muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) ou B) e D) baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso a água. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

23. Efeitos da administração de muscimol ou baclofen no NPBL sobre a ingestão de água, NaCl 0,3 M e alimento em ratos normovolêmicos e saciados ou privados de alimento por 24 h.

Em ratos saciados, injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M [$F(7,56) = 7,5; p < 0,05$] e de água [$F(7,56) = 2,3; p < 0,05$] (Figura 43), sem afetar a ingestão de alimento [$F(7,56) = 0,56; p > 0,05$] (Figura 43). Baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) injetado bilateralmente no NPBL também induziu ingestão de NaCl 0,3 M [$F(7,35) = 3,5; p < 0,05$] (Figura 44), porém não alterou a ingestão nem de água [$F(1,5) = 0,01; p > 0,05$] nem de ração [$F(1,5) = 0,1; p > 0,05$] (Figura 44).

Injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL induziu ingestão de NaCl 0,3 M [$F(7,35) = 2,9; p < 0,05$], sem alterar as ingestões de água [$F(1,5) = 1,1; p > 0,05$] e de ração [$F(1,5) = 4,8; p > 0,05$] (Figura 43) em animais privados de alimento. Por sua vez, em animais privados de ração, baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) injetado bilateralmente no NPBL, também induziu ingestão de NaCl 0,3 M [$F(7,35) = 2,5; p < 0,05$], ao mesmo tempo que reduziu as ingestões de água [$F(1,5) = 34,4; p < 0,05$] e de alimento [$F(1,5) = 12,4; p < 0,05$] (Figura 44).

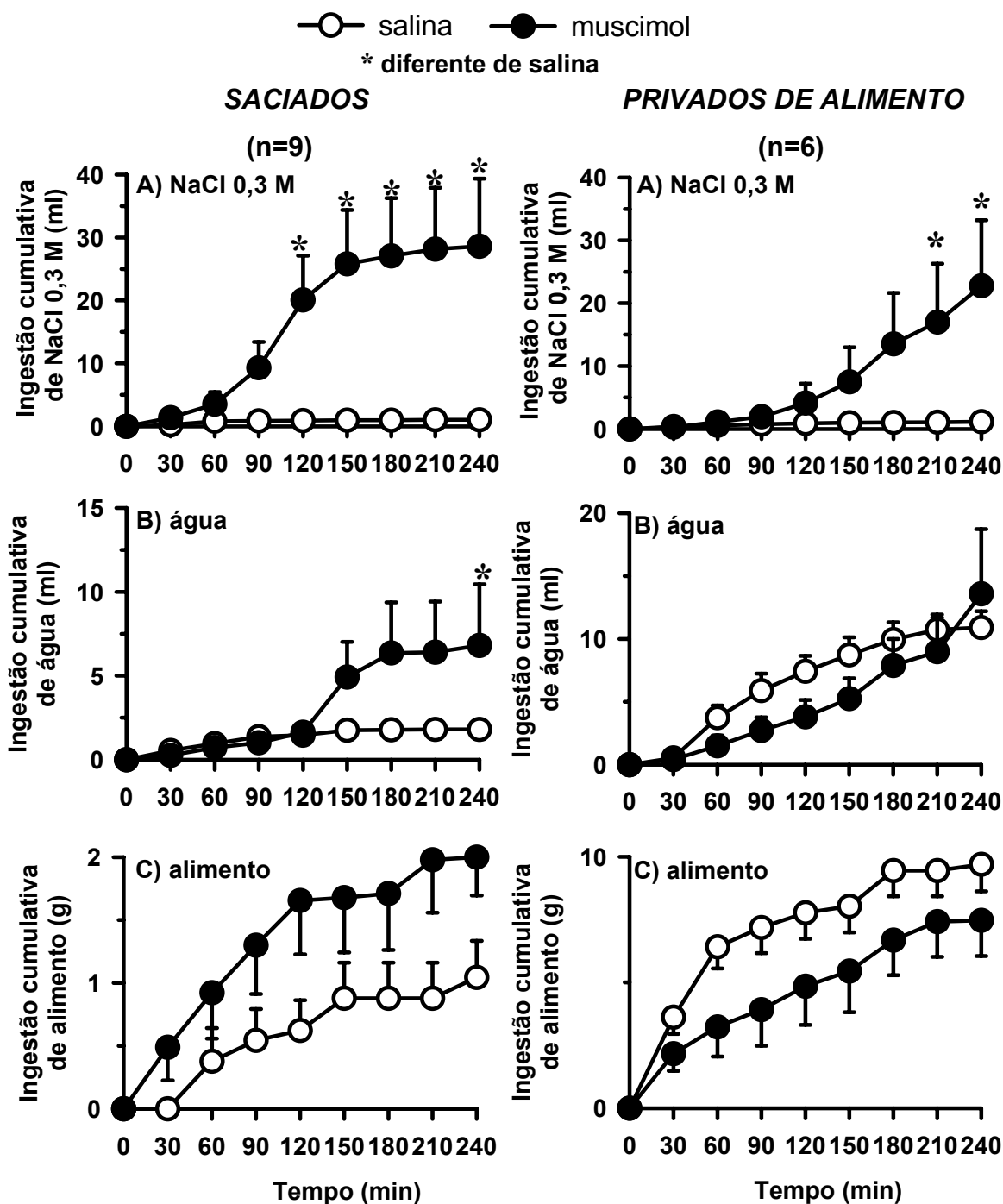


Figura 43: Ingestão cumulativa de A) NaCl 0,3 M; B) água e C) alimento em ratos saciados (painel da esquerda) e privados de alimento por 24 h (painel da direita) que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL e tiveram livre acesso ao NaCl 0,3 M, água e alimento. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

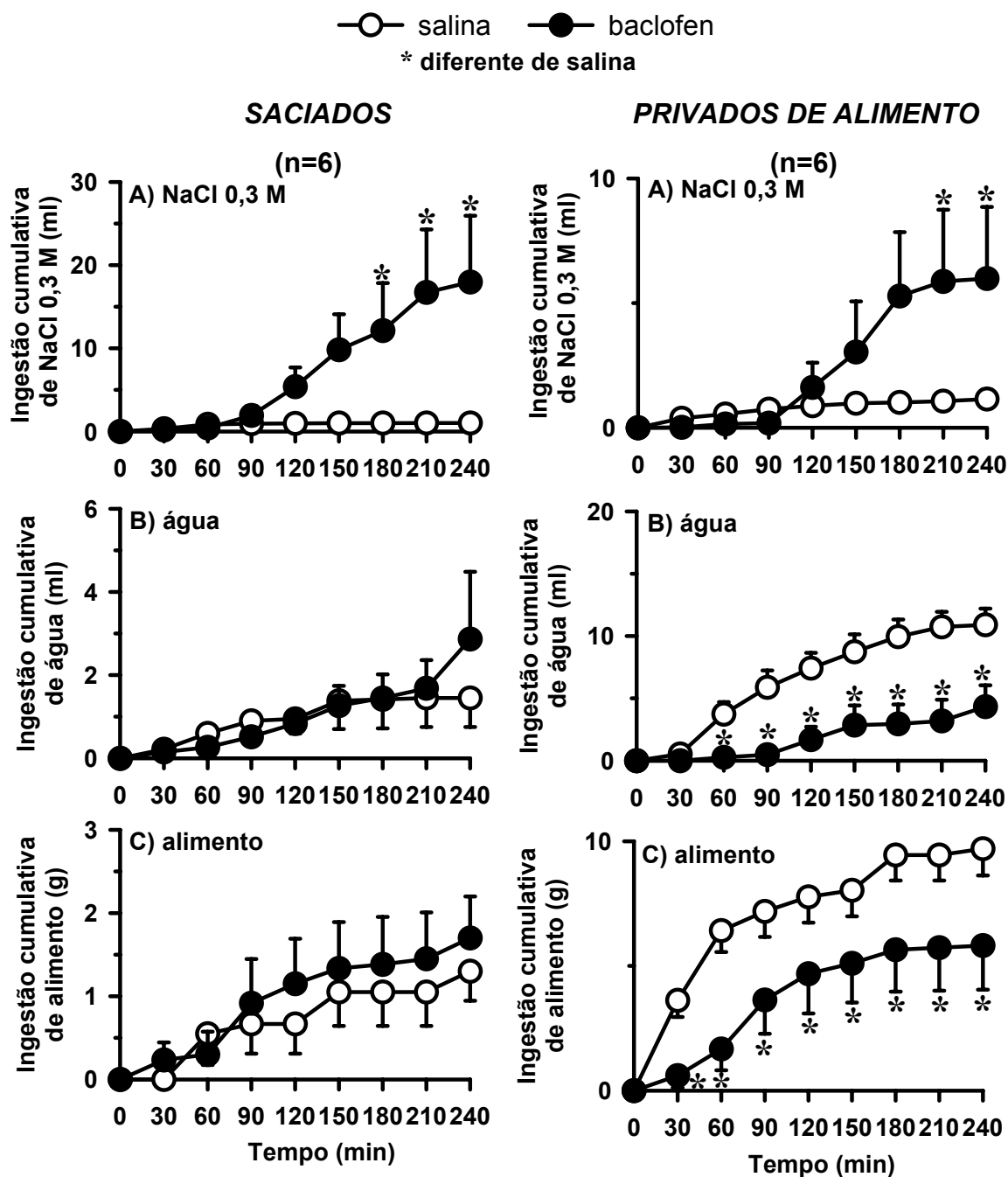


Figura 44: Ingestão cumulativa de A) NaCl 0,3 M; B) água e C) alimento em ratos saciados (painel da esquerda) e privados de alimento por 24 h (painel da direita) que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL e tiveram livre acesso ao NaCl 0,3 M, água e alimento. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais.

24. Efeitos da administração de muscimol e baclofen no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) basais em ratos saciados e normovolêmicos.

Os dados referentes aos efeitos de injeções bilaterais de muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) e baclofen (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL em relação à PAM e FC basais foram analisados em ratos normotensos (PAM basal $120 \pm 2,6$ mmHg; FC basal = 391 ± 22 bpm).

Muscimol, mas não baclofen, bilateralmente injetado no NPBL promoveu um aumento da PAM [$F(2,64) = 22,3; p < 0,05$] (Figura 45A). A FC não foi modificada por nenhum dos tratamentos [$F(2,64) = 4,9; p > 0,05$], (Figura 45B).

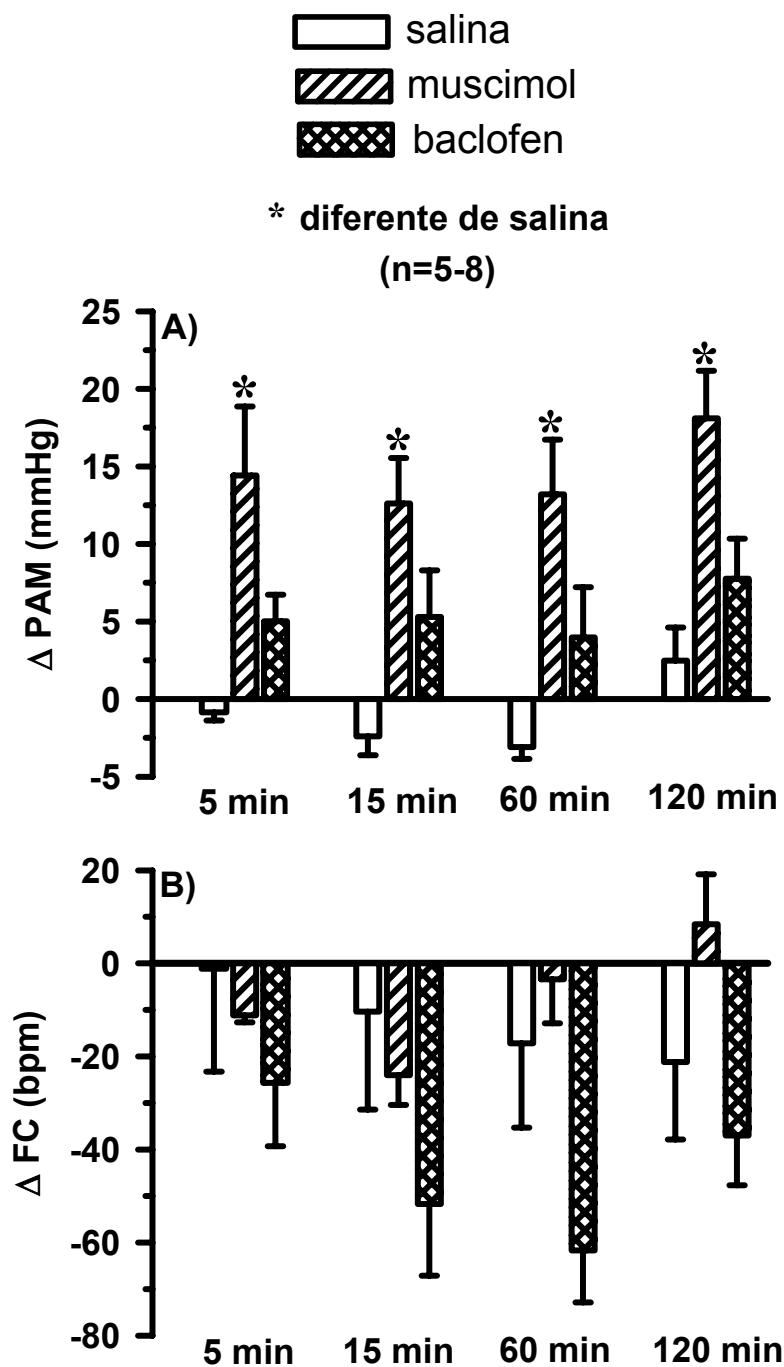


Figura 45: Variação da PAM (mmHg) e FC (bpm) após as injeções de salina, muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL de ratos saciados e normovolêmicos. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

25. Efeitos da administração de prazosin iv + muscimol no NPBL sobre a pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC).

Os experimentos foram realizados em animais normotensos (PAM basal $112 \pm 1,6$ mmHg; FC basal = 352 ± 16 bpm). Apenas a injeção de prazosin (1 mg/ kg) promoveu uma hipotensão ($97,6 \pm 1,6$ vs salina iv: $107,9 \pm 1,9$ mmHg) [$F(1,19) = 65,6; p < 0,05$] e uma taquicardia ($436,1 \pm 16,8$ vs salina iv: $3590 \pm 17,2$ mmHg) [$F(1,19) = 31,8; p < 0,05$].

Muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l), injetado bilateralmente no NPBL, promoveu uma aumento da PAM [$F(3,80) = 38,2; p < 0,05$] (Figura 46A) que foi abolido pelo tratamento prévio iv com o antagonista de receptores adrenérgicos α_1 , prazosin. Em relação à FC, não foram observadas alterações significativas [$F(3,80) = 0,6; p > 0,05$] (Figura 46B).

salina iv + salina NPBL
 salina iv + muscimol NPBL
 prazosin iv + salina NPBL
 prazosin iv + muscimol NPBL

* diferente de salina iv + salina NPBL

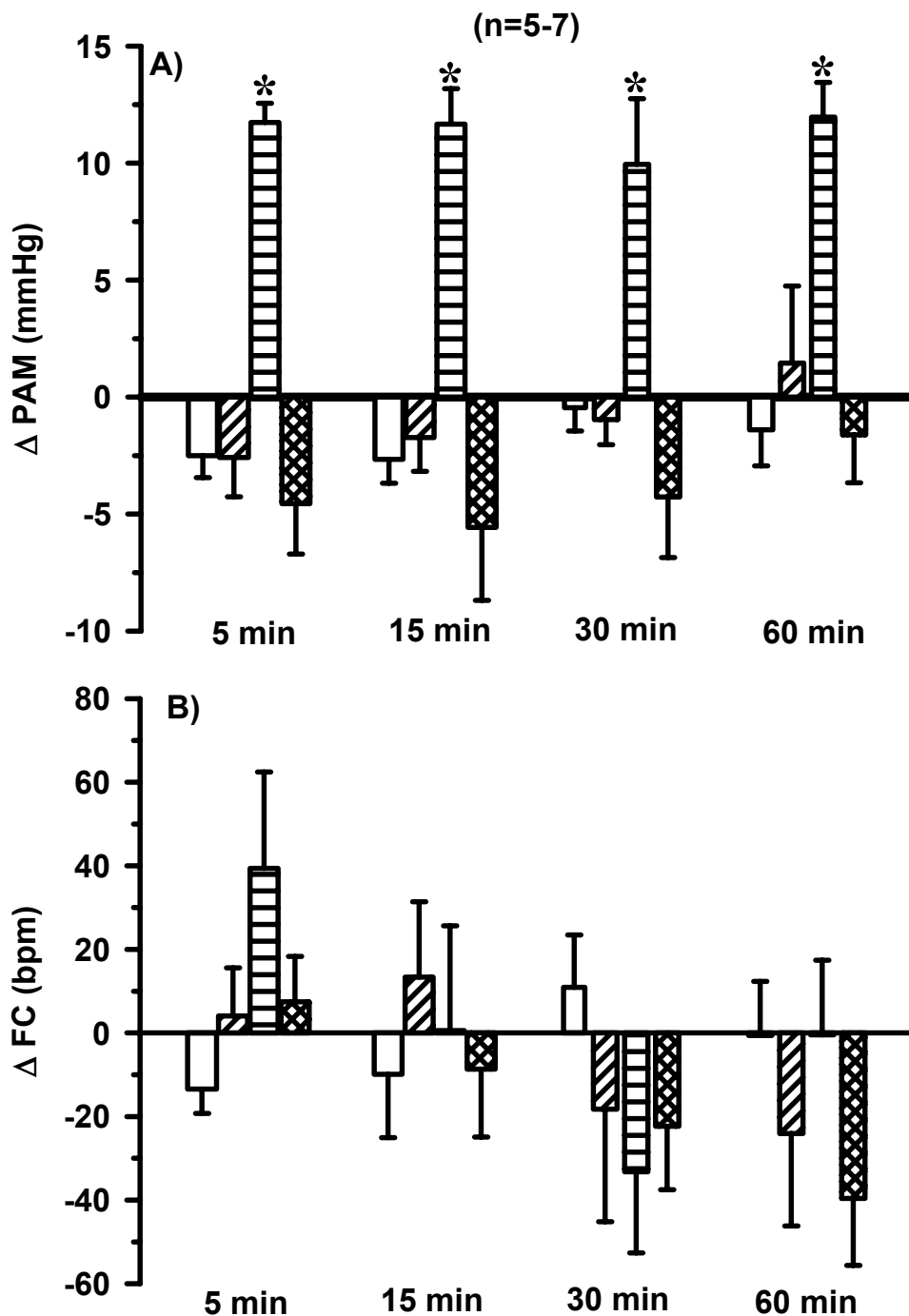


Figura 46: Variação da PAM (mmHg) e FC (bpm) após as injeções de salina ou prazosin iv + salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

26. Efeitos da administração de muscimol ou baclofen sobre a excreção urinária em ratos saciados e normovolêmicos.

Em animais que não tiveram acesso a água, NaCl 0,3 M ou ração durante o experimento, muscimol (0,5 nmol/0,2 µl) injetado bilateralmente no NPBL promoveu um pequeno aumento no volume urinário [$F(7,63) = 3,2; p < 0,05$] (Figura 47A), sem alterar a excreção renal de sódio [$F(1,9) = 1,6; p > 0,05$] (Figura 47B) e potássio [$F(1,9) = 1,8; p > 0,05$] (Figura 47C). Injeções bilaterais de baclofen no NPBL, não alteraram os parâmetros renais analisados [$F(1,4) = 1,9; p > 0,05$] (Figura 48A); [$F(1,4) = 1,3; p > 0,05$] (Figura 48B); [$F(1,4) = 0,7; p > 0,05$] (Figura 48C), respectivamente, volume urinário, excreção urinária de sódio e potássio.

Quando os animais receberam injeções bilaterais no NPBL e tiveram acesso à água e à solução de NaCl 0,3 M, mas não ração, observou-se que animais que receberam injeções bilaterais de muscimol no NPBL (0,5 nmol/0,2 µl) apresentaram um aumento no volume urinário [$F(2,8) = 10,2; p < 0,05$] (Figura 47D) e na excreção de sódio [$F(2,8) = 13,6; p < 0,05$] (Figura 47E) e potássio [$F(2,8) = 7,6; p < 0,05$] (Figura 47F). Quando estes mesmos animais receberam sobrecargas intragástricas de água + NaCl 0,3 M, na mesma quantidade que eles ingeriram, porém sem injeções no NPBL, e foram comparados aos animais que receberam injeções de muscimol e tiveram acesso à água e NaCl 0,3 M, observou-se apenas uma redução na excreção urinária de potássio (Figura 47F), porém não foram observadas alterações no volume urinário (Figura 47D) e excreção urinária de sódio (Figura 47E).

Para o teste com o baclofen (0,5 nmol/0,2 µl), quando os animais tiveram acesso à água e ao NaCl 0,3 M, observou-se também um aumento no volume urinário [$F(2,8) = 9,3; p < 0,05$] (Figura 48D) e na excreção de sódio [$F(2,8) = 10,8; p < 0,05$] (Figura 48E) e potássio [$F(2,8) = 12,9; p < 0,05$] (Figura 48F), sendo que o volume urinário (Figura 48D) e a excreção de sódio (Figura 48E) foram menores quando comparados ao tratamento com sobrecargas intragástricas (mesmo volume de água e NaCl 0,3 M ingeridos) sem injeções no NPBL.

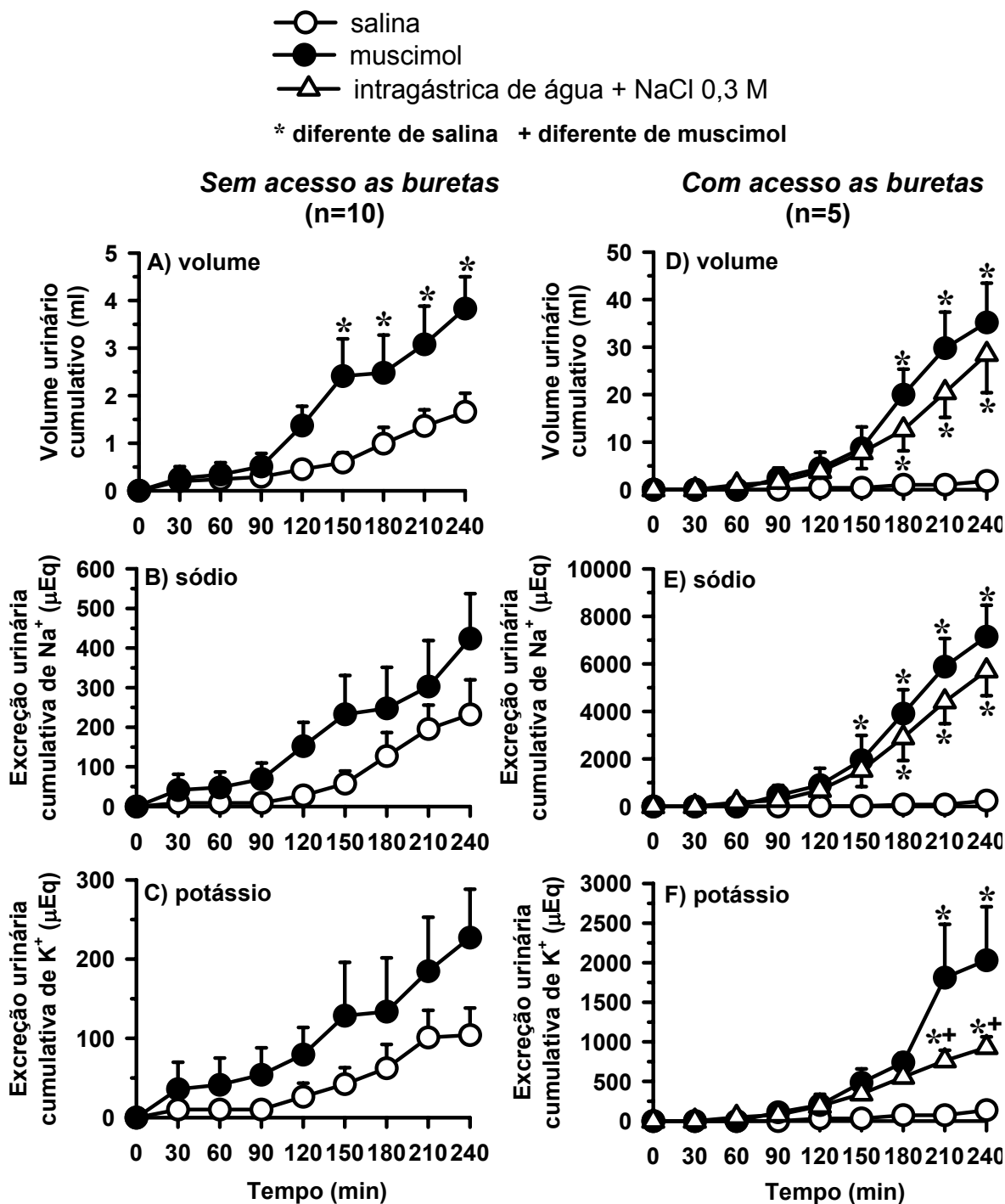


Figura 47: Excreção urinária cumulativa de volume; Na^+ e K^+ em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou muscimol (0,5 nmol/0,2 μl) no NPBL e não tiveram [A), B) e C)] ou tiveram acesso a água e NaCl 0,3 M [D), E) e F)]; e em ratos sem injeções no NPBL e que receberam sobrecargas intragástricas de água e NaCl 0,3 M [D), E) e F)]. Os resultados foram expressos como média \pm EPM, n = número de animais.

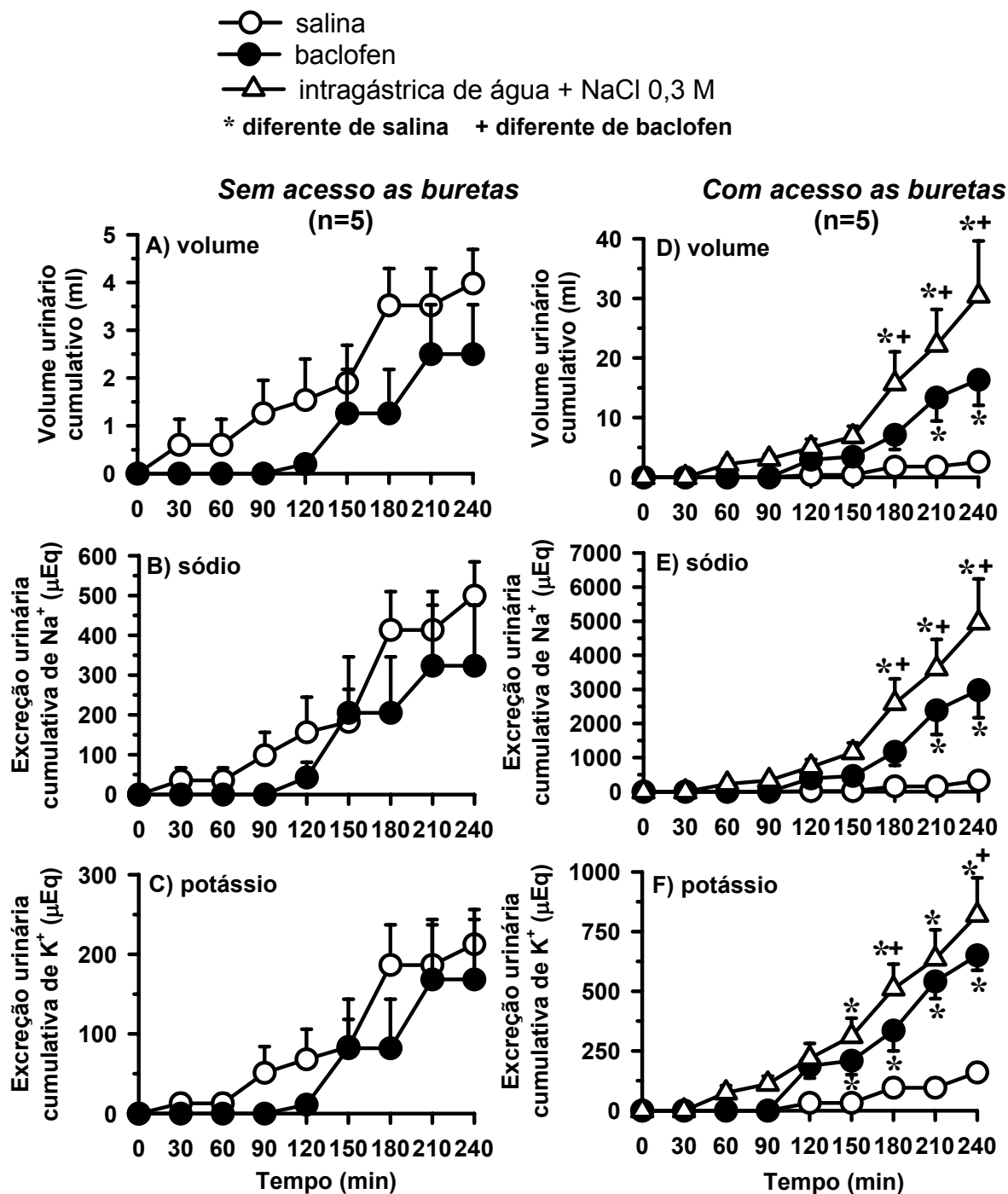


Figura 48: Excreção urinária cumulativa de volume; Na⁺ e K⁺ em ratos saciados e normovolêmicos que receberam injeções bilaterais de salina ou baclofen (0,5 nmol/0,2 μl) no NPBL e não tiveram [A), B) e C)] ou tiveram acesso a água e NaCl 0,3 M [D), E) e F)]; e em ratos sem injeções no NPBL e que receberam sobrecargas intragástricas de água e NaCl 0,3 M [D), E) e F)]. Os resultados foram expressos como média ± EPM, n = número de animais.

DISCUSSÃO

1. Efeitos da ativação gabaérgica no NPBL sobre o comportamento ingestivo.

Injeções bilaterais do agonista de receptores GABA_A (muscimol) e GABA_B (baclofen) no NPBL induzem ingestão de NaCl 0,3 M e de água em ratos saciados e normovolêmicos (Callera e cols, 2005). Nesta condição experimental, os efeitos do muscimol foram reduzidos após tratamento prévio com o antagonista de receptores GABA_A, bicuculina, mas não pelo antagonista de receptores GABA_B, CGP 35348, sugerindo que o muscimol estaria atuando especificamente em receptores GABA_A, e não interagiria com os receptores GABA_B para promover seus efeitos. Além disso, a ativação dos receptores GABA_A é importante mesmo uma hora após as injeções de muscimol no NPBL, uma vez que bicuculina injetada neste momento também foi capaz de reduzir o efeito natriorexigênico promovido pelo muscimol no NPBL. As ingestões de NaCl 0,3 M e água induzidas pelo baclofen injetado no NPBL foram reduzidas pela administração prévia de CGP 35348, sugerindo que o efeito natriorexigênico e dipsogênico do baclofen se devem à ativação de receptores GABA_B, os quais também são fundamentais para o efeito natriorexigênico do baclofen, mesmo uma hora após as injeções deste no NPBL. Interessantemente, no grupo de experimentos associando-se o antagonista de receptores GABA_A (bicuculina) e o agonista de receptores GABA_B (baclofen), o efeito natriorexigênico do baclofen foi completamente abolido pela administração prévia de bicuculina, sugerindo envolvimento dos receptores GABA_A na ingestão de sódio induzida pelo baclofen injetado no NPBL. Portanto, em ratos saciados e normovolêmicos a ingestão de solução de NaCl hipertônica induzida pelo muscimol injetado bilateralmente no NPBL envolve apenas a ativação de receptores GABA_A, enquanto que para o baclofen há o envolvimento tanto de receptores GABA_A quanto GABA_B. Estudos já mostraram que a administração intraperitoneal de baclofen promove uma hipotermia passageira seguida de uma marcante hipertermia (Zarrindast e Oveissi, 1988), bem como redução da ingestão de alimento (Zarrindast e cols., 1989), sendo que tanto o efeito anorético quanto hipotérmico do baclofen foram abolidos pela administração prévia de bicuculina, sugerindo um possível envolvimento de mecanismos relacionados aos receptores GABA_A em alguns dos efeitos do baclofen dependendo do protocolo experimental utilizado. Os neurônios gabaérgicos apresentam um sistema de captação de GABA ativo que remove o GABA após ele

ter sido liberado. Talvez, a ativação de receptores GABA_B possa inibir essa recaptação do GABA liberado, permitindo uma maior disponibilidade de GABA no meio sináptico que se ligaria aos receptores GABA_A exercendo, assim, um efeito semelhante ao do muscimol. Uma outra possibilidade poderia ser um efeito inespecífico do baclofen ligando-se diretamente nos receptores GABA_A.

Em animais depletados de sódio por 24 h (tratamento com furosemide sc + dieta deficiente de sódio por 24 h), os resultados mostraram que a ativação de mecanismos gabaérgicos no NPBL promove um efeito dual na ingestão de sódio, sendo que injeções bilaterais de muscimol e baclofen no NPBL reduziram inicialmente e facilitaram tardiamente a ingestão de NaCl 0,3 M durante o teste do apetite ao sódio. Tanto o efeito inibitório quanto facilitatório promovidos pelas injeções de muscimol no NPBL foram abolidos pelo tratamento prévio com bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) confirmando que os efeitos produzidos pelo muscimol na ingestão de sódio se devem à ativação de receptores GABA_A. A administração prévia do antagonista de receptores GABA_B, CGP 35348, prolongou o efeito inibitório, sem alterar o efeito facilitatório, do muscimol injetado no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio. Estes resultados sugerem que, na condição experimental estudada, a ativação dos receptores GABA_A no NPBL é necessária tanto para o efeito inibitório inicial quanto o facilitatório tardio produzidos pelo muscimol no NPBL. Estudos já mostraram um possível efeito dual decorrente da ativação de receptores GABA_A, sendo que em melanotrofos de *Xenopus laevis* a ativação de receptores GABA_A promoveria uma ação inibitória envolvendo canais de cloreto, enquanto que a ação estimulatória envolveria, direta ou indiretamente, a geração de AMPc (Jenks e cols., 1993). Já foi observado no porquinho da Índia, que o GABA apresenta uma ação dual na neurotransmissão da camada cinzenta superficial do colículo superior, sendo seu efeito excitatório mediado, possivelmente, por receptores GABA_A e seu efeito inibitório mediado tanto por receptores GABA_A quanto por receptores GABA_B (Arakawa e Okada, 1988). Em ratos saciados e normovolêmicos, não é possível observarmos um efeito inibitório, todavia há a indução da ingestão de sódio promovida pela injeção de muscimol no NPBL, a qual também é bloqueada pela administração de bicuculina.

Injeções prévias de CGP 35348 reduziram o efeito natriorexigênico do baclofen em ratos saciados e normovolêmicos. Todavia em animais depletados de

sódio, administração prévia de CGP 35348 aboliu o efeito inibitório e antecipou o efeito facilitatório do baclofen sobre a ingestão de NaCl 0,3 M. Já o tratamento prévio com bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) prolongou o efeito inibitório e bloqueou o efeito facilitatório do baclofen injetado bilateralmente no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M de ratos submetidos à depleção de sódio de 24 h, sugerindo que o efeito facilitatório do baclofen nesse caso seria devido à ativação de receptores GABA_A. Em ratos depletados de sódio, uma possível explicação seria que o efeito inibitório inicial seria um efeito direto do baclofen ativando auto-receptores GABA_B e conseqüentemente inibindo a liberação de GABA. Após 30 - 60 min, poderia ter passado o efeito do baclofen, e por conseqüência, haveria liberação de GABA endógeno que ativaria os receptores GABA_A promovendo assim a facilitação na ingestão de NaCl 0,3 M. Devido a inibição inicial, a quantidade de GABA endógeno liberada poderia ser num nível maior que o normal ou os receptores GABA_A poderiam estar sensibilizados e portanto, respondendo de uma forma mais ativa a um nível normal de GABA.

Estudos anteriores mostraram que ativação de receptores GABA_B diminui a liberação de GABA que pode ser através de uma redução do influxo de cálcio ou por inibição de mecanismo de liberação vesicular nas células de Purkinje cerebelar (Harvey e Stephens, 2004). Já foi verificado no *globus pallidus* que o baclofen pode atuar tanto em receptores GABA_B pré quanto pós sinápticos (Kaneda e Kita, 2005), sendo que na matéria cinzenta periaquedutal, ativando os receptores pós sinápticos, o baclofen inibe diretamente a atividade dos neurônios e pré sinapticamente inibe a liberação de GABA (Yang e cols., 2003). Estudos *in vitro* com cortes compreendendo a região subtalâmica mostraram que ao ser feita superfusão com baclofen ocorria uma redução significativa na freqüência de correntes pós sinápticas inibitórias mediadas por receptores GABA_A, sem efeitos na amplitude, o que sugere uma inibição pré-sináptica na liberação de GABA (Chen e Yung, 2005). Além disso, como observado nos interneurônios hipocâmpais CA3, receptores GABA_B pré-sinápticos podem estar localizados em terminais tanto excitatórios quanto inibitórios, sendo que sua ativação modula componentes essenciais no processo de liberação de neurotransmissores fundamentais para a transmissão nesses dois tipos de sinapses (Lei e McBain, 2003). Foi verificado ainda que o GABA poderia agir como um neurotransmissor inibitório tanto na porção gustatória quanto visceral do núcleo parabraquial, e que sua ação seria mediada em parte, pelos receptores GABA_A

(Kobashi e Bradley, 1998). Estudos já mostraram tanto a presença de receptores GABA_A quanto GABA_B no NPBL (Christie e North, 1988; Araki e cols., 1992). Portanto seria possível, que ao se ativar receptores GABA_B no NPBL pela administração de baclofen teríamos uma inibição da liberação de GABA e posteriormente, cessando esta inibição, haveria liberação de GABA que atuando em receptores GABA_A promoveria um aumento na ingestão de NaCl 0,3 M.

O fato da administração prévia de CGP 35348 antecipar o efeito facilitatório do baclofen sobre a ingestão de sódio pode ser devido ao fato de que ao se bloquear os receptores GABA_B pré sinápticos, o mecanismo de retroalimentação negativa para liberação de GABA estaria inibido e, portanto, teríamos uma maior quantidade de GABA endógeno disponível que teria os receptores GABA_A livres para atuarem, antecipando assim o aumento na ingestão de sódio. Por outro lado, a administração prévia de bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) prolongou o efeito inibitório do baclofen. Os resultados mostraram que apenas a administração dos antagonistas dos receptores GABA_A (bicuculina) e GABA_B (CGP 35348) não foi capaz de afetar a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por depleção de sódio de 24 h sugerindo que não haveria uma participação gabaérgica tônica na ingestão de sódio no protocolo estudado. Portanto, é possível que alterações na liberação de outros neurotransmissores presentes no NPBL possam ocorrer para que haja a ingestão normal de sódio em ratos depletados de sódio e a ativação de receptores GABA_B pós-sinápticos pode ter inibido a atividade desses neurônios promovendo assim um retardamento na ingestão de sódio, o que não ocorreria se os receptores GABA_A estivessem disponíveis. A ativação de receptores GABA_B pode modular a liberação de outros neurotransmissores como serotonina, noradrenalina e opióides (Bagdy e cols., 2000; Tanaka e cols., 2002; Sakamaki e cols., 2003; 2004; Ushigome e cols., 2004; Tomaszewska-Zaremba e Przekop, 2005).

Seria possível que o efeito inibitório da ativação de receptores GABA_A e GABA_B no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos depletados de sódio fosse devido ao fato de que ao se ativar mecanismos gabaérgicos no NPBL poderia ocorrer uma inibição de mecanismos angiotensinérgicos, por outro lado, o efeito facilitatório tardio, dependente da ativação de receptores GABA_A, poderia ser decorrente de uma inibição de mecanismos de saciedade, como o serotoninérgico, colecistocinérgico e ocitocinérgico.

Dados obtidos da literatura mostram que a administração sistêmica de muscimol e baclofen inibiu a ingestão de água induzida por privação hídrica (Ebenezer e cols., 1992; Houston e cols., 2002). Além disso, muscimol injetado icv reduz a ingestão de água induzida pela injeção de angiotensina II (ANG II) e carbacol icv (Unger e cols., 1983) e também reduz a ingestão de sal induzida pela injeção de renina na área preóptica (Abe e cols., 1988). Estudos anteriores mostraram uma participação importante da ANG II no apetite ao sódio induzido pela depleção de sódio (Fluharty e Epstein, 1983; Sakai e cols., 1986; Weiss e cols., 1986). Portanto, estes dados sugerem que ativação gabaérgica reduz os efeitos da ANG II e que esta está envolvida na ingestão de sódio induzida por depleção de sódio, assim, seria possível, que inicialmente a ativação gabaérgica no NPBL poderia estar inibindo mecanismos angiotensinérgicos e, portanto, teríamos uma inibição inicial da ingestão de NaCl 0,3 M. Tardamente, estes mecanismos angiotensinérgicos poderiam ser liberados e conseqüentemente, desencadear a ingestão de sódio, uma vez que, resultados do laboratório mostraram que a administração de losartan (antagonista de receptores AT1) no ventrículo lateral reduz o efeito facilitatório sobre a ingestão de NaCl 0,3 M observada após injeção de muscimol no NPBL em ratos saciados (dados não publicados).

Já em relação ao efeito facilitatório tardio sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, seria possível que a ativação de receptores GABA_A iniba mecanismos relacionados com a saciedade, que seriam desencadeados quando os animais ingerem sódio. Mecanismos serotoninérgicos presentes no NPBL e ocitocinérgicos em áreas prosencefálicas têm um efeito inibitório sobre a ingestão de sódio (Blackburn e cols., 1992; Blackburn e cols., 1995; Verbalis e cols., 1995; Stricker e Verbalis, 1996; Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; De Gobbi e cols., 2000; Sato e cols., 1997; Fitts e cols., 2003; Rigatto e cols., 2003). Ademais, ratos depletados de sódio através do método de diálise peritoneal que tiveram acesso a solução de NaCl expressaram dupla marcação para serotonina e c-fos (a proteína c-fos é um indicador de atividade neuronal) ao longo do sistema da rafe e imunorreatividade para c-fos e ocitocina nas subdivisões ocitocinérgicas parvo e magnocelular do núcleo paraventricular (NPV) e núcleo supra-óptico (NSO) (Franchini e Vivas, 1999; Franchini e cols., 2002), sugerindo que mecanismos serotoninérgicos e ocitocinérgicos inibitórios podem estar sendo ativados quando ratos hipovolêmicos ingerem solução de sódio.

Seria possível uma interação entre mecanismos gabaérgicos, serotoninérgicos, ocitocinérgicos e colecistocinérgicos no controle da ingestão. Foi observado que em ratos normovolêmicos, a ingestão de NaCl 0,3 M induzida por injeções de muscimol, mas não baclofen, no NPBL foi praticamente abolida quando os ratos foram previamente tratados com DOI (hidrobrometo de 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina), um agonista de receptores serotoninérgicos do tipo 5HT_{2A/2C}, no NPBL. Em relação à ocitocina, estudos mostraram que a ativação gabaérgica reduz a atividade de neurônios ocitocinérgicos e também a secreção de ocitocina (Engelmann e cols., 2004; Li e Stern, 2004). Já, em relação à colecistocinina (CCK), foi observado que a administração sistêmica de baclofen atenua o efeito inibitório da CCK sobre a ingestão de alimento (Ebenezer, 1996). Estes dados sugerem que a ativação gabaérgica pode interagir ou influenciar a atividade de outros mecanismos relacionados com o comportamento ingestivo.

Em resumo, o efeito inibitório sobre a ingestão de NaCl 0,3 M observado em animais depletados de sódio após a ativação gabaérgica no NPBL pode ser decorrente tanto da ativação de receptores GABA_A quanto GABA_B, porém o efeito facilitatório tardio parece envolver apenas a ativação dos receptores GABA_A que poderia ser dependente da liberação endógena de GABA. Já em animais saciados e normovolêmicos parece que a ativação tanto de receptores GABA_A quanto GABA_B podem participar do efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL.

Injeções apenas dos antagonistas gabaérgicos (bicuculina ou CGP 35348) não afetaram a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos saciados ou induzida pela depleção de sódio por 24 h, sugerindo que não haveria uma participação gabaérgica tônica no controle da ingestão de sódio. Todavia no estudo de ingestão não regulatória de NaCl 0,3 M, na qual os animais foram treinados a ingerirem sódio apenas 2 h por dia, observou-se que o bloqueio dos receptores GABA_B, mas não GABA_A, reduziram a ingestão de sódio, sugerindo uma possível participação tônica dos receptores GABA_B no controle da ingestão de sódio. A administração do antagonista de receptores GABA_B (CGP 35348) foi capaz de reduzir o efeito natriorexigênico do agonista de receptores GABA_B (baclofen) injetado bilateralmente no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos, todavia em ratos depletados de sódio, o antagonista facilitou o efeito do agonista. Parece que dependendo da condição experimental estudada, normovolemia (saciados) ou hipovolemia (depletados), a contribuição dos

receptores GABA_B para a ingestão de sódio pode ser diferente. Numa situação de saciedade na qual a ingestão de sódio não está sendo estimulada, a ativação dos receptores GABA_B no NPBL é importante para se induzir a ingestão de NaCl. Já numa situação na qual a ingestão de sódio foi previamente estimulada (depleção de sódio por 24 h), os receptores GABA_B parecem não estar envolvidos no efeito facilitatório sobre a ingestão de sódio. Já em relação aos receptores GABA_A, a ativação destes parece ser fundamental para que haja ingestão de sódio independente do animal estar saciado ou depletado de sódio.

O protocolo de depleção de sódio por 24 h tem como objetivo induzir apetite ao sódio (ingestão de solução hipertônica de NaCl, no caso, NaCl 0,3 M), sendo que a ingestão de água associada à ingestão de NaCl 0,3 M é variável. Algo semelhante ocorre em ratos saciados, sendo que a ingestão de água observada após a ativação gabaérgica no NPBL é variável e pode ser ou um efeito direto do muscimol e baclofen injetados no NPBL ou um efeito secundário da ingestão de sódio. Para se obter um resultado preciso sobre os efeitos da ativação gabaérgica no NPBL sobre a ingestão de água, seria necessário fazer protocolos que induzissem ingestão de água, como por exemplo, privação hídrica de 24 h, isoproterenol sc ou sobrecarga intragástrica de salina hipertônica (NaCl 2 M).

Em animais saciados e normovolêmicos que tiveram acesso apenas à água, mas não ao sódio, injeções bilaterais de muscimol no NPBL, induziram uma pequena ingestão de água (Callera e cols., 2005), enquanto que o baclofen injetado no NPBL não alterou a ingestão de água. Estes resultados sugerem que a ingestão de água em animais saciados decorrente da ativação gabaérgica no NPBL, que ocorre juntamente com a ingestão de sódio, parece ser um efeito secundário à ingestão de NaCl 0,3 M.

Tanto injeções do agonista de receptores GABA_A (muscimol), quanto dos receptores GABA_B (baclofen), promoveram um aumento na ingestão de água induzida pela privação hídrica de 24 h após 150-180 min do início do teste.

A privação hídrica de 24 h leva o animal a uma condição de desidratação que resulta em uma redução do volume (hipovolemia) e aumento da osmolalidade dos líquidos corporais, alterando, assim, tanto o balanço hídrico, quanto o balanço de eletrólitos (McKinley e cols., 1983; Weisinger e cols., 1985), ou seja, a privação hídrica levaria tanto a um quadro de desidratação intracelular (indução da sede)

quanto extracelular (indução da ingestão de solução de NaCl), sendo uma combinação da ativação do sistema renina-angiotensina e osmorreceptores (Fitzsimons, 1985; Johnson e Edwards, 1990). Assim, na privação hídrica haveria sinais tanto para ingestão de água quanto de sódio. Talvez, para que a ativação gabaérgica (muscimol e baclofen) no NPBL aumente a ingestão de água seja necessário que o sinal para ingestão de sódio esteja ativado e/ou desinibido.

Em resumo, a ingestão de água observada em ratos saciados após ativação gabaérgica no NPBL parece ser secundária à ingestão de sódio. Dependendo do protocolo estudado (privação hídrica), muscimol e baclofen podem promover um efeito semelhante sobre a ingestão de água.

Para se estudar a especificidade dos efeitos do muscimol e baclofen injetados no NPBL sobre a ingestão de sódio, foram também realizados protocolos nos quais se mediu além das ingestões de NaCl 0,3 M e água, também a ingestão de alimento, em duas condições experimentais diferentes: ratos saciados e ratos privados de alimento por 24 h.

Em ratos saciados, injeções bilaterais de muscimol no NPBL promoveram uma ingestão de sódio 2 h após o início do experimento e ingestão de água no final do experimento sem afetar a ingestão de alimento. Já em animais privados de ração por 24 h, observou-se uma ingestão de sódio 3 h após o início do teste, sem serem notadas alterações na ingestão de água ou alimento. Estes resultados reforçam a idéia de que o efeito do muscimol no NPBL poderia ser específico para o sódio. Interessantemente, nos animais privados, a ingestão de sódio só se iniciou mais tardiamente (1 h após quando comparada aos animais saciados), o que pode ser devido ao fato dos animais privados de alimento procurarem primeiro saciar esta necessidade que é acompanhada pela ingestão de água, para então ingerirem o sódio.

Em relação às injeções bilaterais de baclofen no NPBL, foi observado em ratos saciados, uma indução da ingestão de NaCl 0,3 M, sem alterações na ingestão de água ou alimento. Já em animais privados de alimento por 24 h, baclofen injetado no NPBL também induziu ingestão de sódio e promoveu uma redução da ingestão de água e de alimento ao longo de todo o experimento. Assim como ocorreu nos animais que receberam muscimol, quando os animais foram privados de ração,

houve uma redução na ingestão de sódio induzida pelo baclofen injetado bilateralmente no NPBL.

Estudos anteriores mostraram o envolvimento do NPBL no controle da ingestão de alimento, bem como do papel do núcleo parabraquial na formação de associações oro-viscerosensoriais (Lee e cols., 1998; Sclafani e cols., 2001; Trifunovic e Reilly, 2001; Simansky e Nicklous, 2002). Os mecanismos gabaérgicos também participam do controle da ingestão de alimento, sendo que muscimol ou baclofen injetados na porção externa do núcleo accumbens promovem uma intensa ingestão de alimento, sem afetar a ingestão de água, em ratos saciados (Stratford e Kelley, 1997). Além disso, injeção sistêmica de baclofen promove aumento da ingestão tanto de dietas líquidas quanto sólidas em ratos (Ebenezer, 1995) e já foi observado que há liberação de GABA em regiões da zona incerta quando os animais privados de alimento vêm e ingerem alimento, o mesmo ocorrendo em animais fisiologicamente depletados de sódio que vêm e ingerem soluções de sal, sendo que nestes animais a liberação de GABA em resposta à visão e à ingestão do alimento foi significativamente reduzida (Kendrick e cols., 1991).

Estes dados da literatura mostram um envolvimento do NPBL e de mecanismos gabaérgicos no controle da ingestão de alimento, porém quando muscimol foi injetado no NPBL tanto ratos saciados quanto privados de alimento apresentaram uma intensa ingestão de sódio, sem alterações na ingestão de alimento, reforçando a sugestão de que a ativação de receptores GABA_A no NPBL não promove uma ativação generalizada do comportamento ingestivo. Os resultados também sugerem que a administração de baclofen no NPBL pode promover efeitos diferentes de acordo com o comportamento ingestivo e o protocolo estudado. Todavia, independente do animal estar ou não privado de ração, baclofen injetado no NPBL induz ingestão de sódio.

Em resumo, quando há disponibilidade de alimento durante o experimento, embora haja um pequeno aumento na ingestão de água, parece que o efeito mais proeminente do muscimol injetado no NPBL seja a indução da ingestão de sódio. Todavia, injeções de baclofen no NPBL parecem promover uma facilitação da ingestão de sódio, enquanto inibem as ingestões de água e de alimento.

Em animais depletados de sódio, para se verificar a especificidade dos efeitos de injeções bilaterais de muscimol e baclofen no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M, foi feito um teste no qual os animais tiveram disponíveis três buretas contendo:

NaCl 0,3 M, água e sacarose 2%. Os resultados mostraram que quando sacarose estava disponível o efeito inibitório da ativação gabaérgica no NPBL sobre a ingestão de sódio desapareceu. Injeções bilaterais de muscimol no NPBL aumentaram as ingestões de NaCl 0,3 M e água, sem alterar a ingestão de sacarose 2%. Em relação ao baclofen, não foram observadas diferenças estatísticas em relação ao controle para nenhuma das ingestões analisadas (NaCl 0,3 M, água e sacarose 2%). Estes resultados sugerem que os efeitos observados sobre a ingestão de NaCl 0,3 M promovidos pela ativação gabaérgica no NPBL não são decorrentes de uma facilitação generalizada do comportamento ingestivo.

Há relatos na literatura que mostram que a ativação gabaérgica em diferentes áreas cerebrais pode aumentar a ingestão de soluções de sacarose. Assim, injeções de muscimol na parte externa do núcleo accumbens promovem um grande aumento na ingestão de sacarose, sem afetar as ingestões de água, salina ou sacarina (Basso e Kelley, 1999); quando injetado na área tegmental ventral, muscimol aumenta o número total de resposta de reforço à sacarose (Hodge e cols., 1996), enquanto que a administração sistêmica de baclofen atenua esta resposta de reforço à sacarose (Anstrom e cols., 2003). Além disso, o núcleo parabraquial parece estar envolvido no controle da ingestão de sacarose, pois estudos mostraram que injeção de midazolam (agonista de receptores benzodiazepínicos) no núcleo parabraquial (NPB) aumentou o consumo de solução de sacarose 3% em ratos não privados (Higgs e Cooper, 1996) e que também há expressão da proteína c-fos no núcleo parabraquial lateral e medial após ingestão voluntária de sacarose (Streefland e cols., 1996). Estes dados, juntamente com os obtidos no presente trabalho, mostram que apesar do fato do NPBL e do mecanismo gabaérgico participarem do controle da ingestão de sacarose, em animais depletados de sódio a ativação gabaérgica do NPBL altera a ingestão de sódio, sem alterar a ingestão de sacarose, reforçando a idéia de que os efeitos do muscimol no NPBL possam ser específicos para o sódio na condição experimental estudada. Todavia, a presença da sacarose, afetou o efeito facilitatório do baclofen sobre a ingestão de sódio.

2. Efeitos da ativação gabaérgica no NPBL sobre a expressão da proteína c-fos e a atividade de neurônios serotoninérgicos e ocitocinérgicos.

2.1 Estudo da expressão da proteína c-fos em animais saciados e normovolêmicos submetidos à ativação gabaérgica no NPBL sem acesso à solução de NaCl 0,3 M e água.

Foram estudados os efeitos da administração de salina, muscimol ou baclofen no NPBL sobre a expressão da proteína c-fos. Os resultados mostraram que dentre as áreas do bulbo analisadas houve expressão da proteína c-fos no NTSc, tanto para animais tratados com muscimol quanto com baclofen. Nem baclofen, nem muscimol induziram expressão de c-fos na AP. Na ponte, houve aumento da expressão de c-fos após as injeções de salina, muscimol ou baclofen no NPBL comparado com o controle sem injeções centrais, porém não houve diferença estatística entre os três tratamentos. Interessantemente, as áreas prosencefálicas conhecidas por estarem envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico como: OVLT, NPOMd, NPV, NSO e Amg não apresentaram aumentos na expressão da proteína c-fos e além disso, ocorreu uma redução na expressão da proteína c-fos no NPOMv em animais tratados com muscimol ou baclofen no NPBL. No OSF, apenas o tratamento com baclofen no NPBL reduziu a expressão de c-fos em relação ao controle (sem injeções no NPBL), mas não em relação ao grupo salina.

O NPBL é uma área responsável por integrar informações, sendo que recebe projeções aferentes da AP e da porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm) e faz conexões com áreas prosencefálicas envolvidas no controle do balanço hidroeletrólítico, como núcleos específicos do hipotálamo e amígdala (Ciriello e cols., 1984; Shapiro e Miselis, 1985; Herbert e cols., 1990; Krukoff e cols., 1993; Jhamandas e cols., 1996), portanto, o NPBL poderia integrar as informações ascendentes do NTSm e AP que por sua vez poderiam influenciar a atividade das áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico. Sabendo-se que a ativação gabaérgica no NPBL induz ingestão de água e sódio, seria possível que este tratamento ativasse algumas das áreas cerebrais que já se sabe estarem envolvidas com o controle da ingestão de água e/ou sódio como o OSF, região AV3V, hipotálamo e amígdala (Wolf, 1967; Simpson e Routtemberg, 1973; Covian e cols., 1975; Brody e Johnson, 1980; Mangiapane e Simpson, 1980; Schulkin e Fluharty, 1985; Schulkin e cols., 1989; Galaverna e cols., 1991), porém, não foi observado um aumento de expressão da proteína c-fos nessas áreas, apenas um redução no NPOMv. O fato de não ter ocorrido alteração na expressão da proteína c-fos nas outras áreas prosencefálicas estudadas, inclusive, algumas

que fazem parte da região AV3V, não exclui a participação delas na resposta de ingestão promovida pela injeção de muscimol ou baclofen no NPBL. É possível que outros genes possam estar sendo ativados, bem como o tempo aguardado (2 h) para que houvesse a expressão de c-fos não tenha sido suficiente, embora, esteja em torno do período em que os animais iniciam a ingestão de sódio. Outra interpretação é que não seria necessária ativação dessas áreas prosencefálicas para a ingestão de sódio e água produzida pelas injeções de muscimol ou baclofen no NPBL, ou então, que a ativação basal dessas áreas por níveis normais de ANG II presentes já seria suficiente para induzir ingestão de água e NaCl na presença de muscimol ou baclofen no NPBL.

Relatos da literatura mostram que tanto o NPBL quanto o NTS estão envolvidos e podem interagir entre si no controle da ingestão (Edwards e Ritter, 1989; Flynn e cols., 1991; Jhamandas e Harris, 1992; Otake e cols., 1992; Kobashi e cols., 1993; Grabauskas e Bradley, 1996; Di Lorenzo e Monroe, 1997; Hochstenbach e cols., 1993; Carlson e cols., 1997; Hochstenbach e Ciriello, 1997; Carlson e cols., 1998; Houpt e cols., 1998; Zittel e cols., 1999; Schreihofer e cols., 2000; Len e Chan, 2001; Masubushi e cols., 2004) e os resultados obtidos através do estudo imunohistoquímico mostrados no presente estudo sugerem que a ativação neuronal do NTS possa estar envolvida na ingestão de sódio induzida pelas injeções bilaterais de muscimol e baclofen no NPBL.

Todavia é importante ressaltar que tanto o NTS quanto o NPBL estão envolvidos no controle da regulação cardiovascular. Estudos já mostraram que alterações na PA podem induzir expressão da proteína c-fos no NTS (Murphy e cols., 1994; Graham e cols., 1995; Li e Dampney, 1995; Xie e cols., 2000). Portanto, ativação de receptores GABA no NPBL poderia levar a alterações da PAM e, conseqüentemente, a expressão de c-fos observada no NTS poderia ser um resultado da alteração da PAM e não um efeito direto da ativação de receptores GABA no NPBL. Resultados apresentados nesta tese mostraram que injeções bilaterais de muscimol, mas não baclofen, no NPBL promoveram um aumento da PAM basal o qual poderia estar contribuindo para a expressão da proteína c-fos no NTS.

Em resumo, em ratos saciados sem acesso ao sódio, a inibição da atividade do NPBL através da ativação gabaérgica neste núcleo promove um aumento da atividade no NTSc e uma redução na atividade do NPOMv.

2.2 Estudo da expressão da proteína c-fos e da atividade de neurônios ocitocinérgicos e serotoninérgicos em animais saciados e depletados de sódio que tiveram ativação gabaérgica (muscimol) no NPBL e com livre acesso à solução de NaCl 0,3 M e água

Apenas a depleção de sódio (ratos tratados com o diurético furosemide + dieta deficiente de sódio + água por 24 h, sem injeções centrais) e sem acesso a água e NaCl promoveu um aumento na atividade do OSF e uma redução na expressão da proteína c-fos no NSO, NPBL, RDa, RMna, RPn e RPa indicando que as alterações de atividade dessas áreas poderiam facilitar a ingestão de sódio nos animais depletados. Quando animais depletados de sódio que receberam salina no NPBL tiveram acesso à solução hipertônica de NaCl e água, foi observado um maior aumento na atividade do OSF, bem como um aumento na expressão da proteína c-fos no NPV, NSO, NMA, NPBL, NPBM e AP. No NPV e NSO, observou-se um aumento na atividade de neurônios ocitocinérgicos, e a ingestão de sódio em animais depletados também promoveu um aumento na atividade de neurônios serotoninérgicos na RPa. Estes resultados sugerem que estas áreas poderiam estar sendo ativadas ou pelo aumento da osmolaridade decorrente da ingestão de NaCl hipertônico ou pela expansão de volume.

Estudos anteriores já haviam demonstrado que apenas a depleção de sódio por 24 h promove expressão de c-fos no OSF (100% dos animais estudados) e no OVLT (40 % dos animais estudados) (Rowland e cols., 1996), sugerindo que essas áreas (OSF e OVLT) estariam envolvidas na ingestão de NaCl induzida pela depleção. Houpt e cols. (1998) mostraram que a expressão da proteína c-fos no OSF devido à depleção permanece aumentada mesmo 90 min após o acesso ao sódio voltando aos níveis basais (sem depleção) após 12 h. Já no presente estudo, não foram observadas alterações na expressão da proteína c-fos no OVLT, porém ocorreu um aumento na expressão de c-fos no OSF que foi aumentada após o acesso ao sódio.

Vários estudos sugerem um papel inibitório da ocitocina em relação à ingestão de sódio. Injeção icv de ocitocina inibe o apetite ao sódio induzido por colóide (Stricker e Verbalis, 1996) e parece que receptores ocitocinérgicos centrais estariam primariamente envolvidos na inibição da ingestão de sódio mediada por osmolaridade (Blackburn e cols., 1995). Estudo de Blackburn e cols. (1992) mostrou que administração de pequenas doses de ANG II ativa neurônios ocitocinérgicos no

NPV e sugere que algumas das vias ocitocinérgicas centrais ativadas poderiam mediar um efeito inibitório que limitaria a ingestão de sódio induzida pela ANG II. Já foi observado que em camundongos knockout para ocitocina há um aumento de três vezes na ingestão de NaCl 2% induzida por polietilenoglicol (PEG) quando comparados ao controle (Rigatto e cols., 2003). Injeção de antagonista da ocitocina promoveu ingestão tanto de água quanto de sódio, além de aumentar a expressão da proteína c-fos no OVLT e NPOM (Fitts e cols., 2003), sugerindo uma atividade inibitória tônica da ocitocina que uma vez bloqueada poderia aumentar a atividade no OVLT e NPOM estimulando a ingestão de água e sódio. Os resultados mostraram um aumento na expressão da proteína c-fos no NPV e NSO, bem como na atividade dos neurônios ocitocinérgicos, quando os animais depletados de sódio tiveram acesso à solução hipertônica de NaCl. Assim sendo, seria possível que quando animais depletados de sódio ingerem solução de NaCl 0,3 M haveria um aumento da osmolaridade que poderia ativar os neurônios ocitocinérgicos com o objetivo de limitar a ingestão de sódio. Já em ratos depletados de sódio sem acesso ao NaCl, observou-se uma redução apenas na atividade do NSO, mas não nos neurônios ocitocinérgicos, sugerindo que uma redução na atividade deste núcleo também possa contribuir para a ingestão de NaCl desencadeada pela depleção de sódio.

Analisando o complexo amigdalóide, vários estudos já mostraram a importância da amígdala para o controle da ingestão de água e sódio. Lesões eletrolíticas bilaterais do complexo amigdalóide podem aumentar ou diminuir a ingestão de NaCl 1,5% dependendo da dimensão e da porção do complexo amigdalóide que foi danificada pela lesão (Gentil e cols., 1968). Lesão da região medial do complexo amigdalóide (NMA) foi capaz de abolir a ingestão de NaCl induzida por mineralocorticóides (Nitabach e cols., 1989; Zhang e cols., 1993), assim como lesão bilateral do NCA reduz a ingestão de NaCl induzida por diferentes protocolos (Galaverna e cols., 1991; Galaverna e cols., 1993; Seeley e cols., 1993; Zardetto-Smith e cols., 1994; Ganaraj e Jeganathan, 1998), além da ingestão não estimulada de NaCl (Seeley e cols., 1993), sugerindo que o NCA exerceria um papel excitatório no comportamento ingestivo. Lesões realizadas bilateralmente no NBLA aumentaram a ingestão de alimento e água, enquanto que lesões bilaterais do NCA levaram a uma redução do comportamento ingestivo (Ganaraj e Jeganathan, 1998), reforçando a idéia de que o NCA teria uma ação excitatória sobre o comportamento

ingestivo (Galaverna e cols., 1991; Galaverna e cols., 1993; Seeley e cols., 1993; Zardetto-Smith e cols, 1994; Ganaraj e Jeganathan, 1998) e sugerindo uma função inibitória do NBLA sobre a ingestão (Ganaraj e Jeganathan, 1998). No presente estudo, apenas a depleção de sódio mostrou uma tendência em reduzir a expressão da proteína c-fos em todos os subnúcleos da amígdala analisados (NCA, NBLA e NMA), com uma tendência em retornar a atividade destes núcleos aos níveis basais (animais saciados) quando animais depletados de sódio tiveram acesso ao NaCl, todavia esse aumento na expressão da proteína c-fos foi significativo apenas no NMA. Portanto, seria possível, que na condição experimental realizada, o aumento da osmolaridade ou expansão de volume decorrentes da ingestão de sódio levaria a ativação do NMA, talvez com o intuito que restringir uma ingestão excessiva.

Os resultados mostraram que apenas a depleção de sódio por 24 h mostrou uma tendência em reduzir a atividade da AP e estatisticamente houve um aumento na expressão da proteína c-fos na AP quando animais depletados de sódio com acesso ao NaCl foram comparados aos animais depletados sem acesso ao NaCl, mas não em relação aos animais saciados. Já em relação ao NTS, apenas a porção lateral do NTSc apresentou um aumento da atividade em animais depletados de sódio com acesso ao sódio em comparação aos animais saciados. Estes resultados estão de acordo com estudos prévios que mostraram que apenas a depleção de sódio não foi suficiente para alterar significativamente a imunorreatividade para a proteína c-fos no NTS ou AP, sendo que em ambos os núcleos a expressão da proteína c-fos foi aumentada após a ingestão de sódio (Haupt e cols, 1998; Franchini e Vivas, 1999; Franchini e cols., 2002), sugerindo que AP e NTS seriam ativados em situações nas quais os animais ingerem solução de NaCl.

Vários estudos já mostraram um papel inibitório da serotonina para a ingestão de água e sódio (Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; De Gobbi e cols., 2000; Lima e cols., 2004), sendo que a depleção de serotonina cerebral aumenta a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio por 24 h (Lima e cols., 2004). Franchini e cols (2002) mostraram que ratos depletados de sódio através da técnica de diálise peritoneal e que tiveram acesso à solução de NaCl apresentaram um aumento na expressão da proteína c-fos e na atividade de neurônios serotoninérgicos na RDa, RDm, RMna, RMnm, RPa. Estes resultados sugerem que ativação de neurônios serotoninérgicos no sistema da rafe poderia participar do controle do apetite ao sódio. Nos presentes resultados, observou-se que a depleção

por si só, reduziu a atividade na RDa, RMna, RPn e RPa, sem alterar a atividade dos neurônios serotoninérgicos, porém quando os animais tiveram acesso à solução de NaCl a atividade da RDa e RPn voltaram aos níveis basais (saciados), enquanto que a atividade da RMna e RPa se manteve reduzida. Interessantemente, embora a atividade da RPa tenha se mantido reduzida nos animais depletados após a ingestão de sódio, houve um aumento da atividade de neurônios serotoninérgicos. Estes resultados condizem com estudos prévios, sugerindo um envolvimento do sistema da rafe na regulação do apetite ao sódio, além de sugerir que enquanto a redução da atividade da RDa, RMna, RPn e RPa, podem estar envolvidas na promoção da ingestão de sódio induzida pela depleção, a recuperação da atividade na RDa, RPn e a ativação de neurônios serotoninérgicos na RPa podem estar relacionados com os mecanismos envolvidos na inibição da ingestão.

Em relação ao NPB, estudos já mostraram a presença de neurônios responsivos à distensão gástrica desde áreas rostrais até áreas mais caudais do complexo parabraquial (Baird e cols., 2001). Salina hipertônica administrada intragástrica ou intravenosamente promove um aumento na expressão da proteína c-fos no NPB e/ou NPBL (Hochstenbach, 1993; Kobashi e cols., 1993; Carlson e cols., 1997), sugerindo que a atividade do NPB poderia ser alterada de acordo com mudanças na concentração de sódio plasmática, bem como pela distensão gástrica. Os presentes resultados mostraram uma redução na atividade do NPBL apenas com a depleção de sódio, todavia quando os animais puderam ingerir sódio a atividade no NPBL voltou aos níveis basais, sendo que o NPBM apresentou uma maior atividade em ratos depletados de sódio com acesso ao NaCl quando comparados aos animais depletados sem acesso ao sódio, mas não em relação aos animais saciados. É importante mencionar que apenas a administração de salina no NPBL, promove um aumento na expressão da proteína quando comparados aos animais saciados que não receberam injeções no NPBL, assim, uma vez que os animais depletados sem acesso ao sódio não receberam injeções de salina, seria possível que a redução na expressão da proteína c-fos observada no NPBL se deva ao fato de que a comparação tenha sido feita com um grupo de animais saciados que receberam injeções de salina no NPBL.

Sumariando, em ratos depletados de sódio ocorreu uma redução na expressão da proteína c-fos no NSO, RDa, RMna, RPn e RPa; bem como um

aumento na atividade do OSF, sugerindo que estas áreas poderiam estar envolvidas em promover a ingestão de sódio nos animais depletados. Por outro lado, o aumento na expressão da proteína c-fos no NPV, NSO, NMA e NPBM, bem como na atividade de neurônios ocitocinérgicos no NPV e NSO; e serotoninérgicos na RPa, quando os animais tiveram acesso à solução hipertônica de sódio e água, sugerem que estas áreas poderiam participar da limitação do processo ingestivo, impedindo uma ingestão excessiva de sódio e/ou água.

Ativação gabaérgica no NPBL promove um aumento na ingestão de sódio tanto em ratos saciados quanto depletados de sódio, o que poderia levar a alteração na atividade de áreas cerebrais envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrolítico.

Injeções bilaterais de muscimol no NPBL em ratos saciados produziram uma ingestão de sódio de aproximadamente 25 ml em 3 h (nos animais que receberam salina no NPBL a ingestão foi aproximadamente 0,5 ml de NaCl/3 h), além de um aumento na expressão da proteína c-fos no NPV e NSO, porém não em neurônios caracterizados como ocitocinérgicos. Também foi observado um aumento na atividade de neurônios serotoninérgicos na RPn. Em relação às outras áreas estudadas, verificou-se um aumento da expressão da proteína c-fos no BNSTv, NPOMd, NBLA, NCA, NMA, NPBM, AP, NTSr, NTSc e NTScI.

Como observado anteriormente em animais depletados de sódio, a ingestão de solução hipertônica de NaCl promoveu um aumento na atividade do NPV, NSO, NMA e NPBM, bem como na atividade de neurônios ocitocinérgicos no NPV e NSO; e serotoninérgicos na RPa; além de recuperar a atividade na RDa e RPn; e manter reduzida a expressão da proteína c-fos na RPa, sugerindo que a ingestão de sódio alteraria a atividade destas áreas. Como apenas a ingestão de sódio é capaz de promover expressão da proteína c-fos, seria possível que a expressão observada nos animais saciados que receberam muscimol no NPBL e tiveram acesso ao sódio seja devido ao sódio ingerido e não à ativação gabaérgica no NPBL, assim, foram comparados animais depletados tratados com salina e animais saciados tratados com muscimol no NPBL, por apresentarem uma ingestão final semelhante (depletado + salina: 18 ± 4 vs saciado + muscimol: 25 ± 6 ml/3 h). Ratos saciados tratados com muscimol no NPBL e com livre acesso ao sódio, apresentaram um aumento na expressão da proteína c-fos no NSO e NPV, porém não em neurônios caracterizados como ocitocinérgicos, sugerindo que, embora haja ingestão de sódio,

quando muscimol foi injetado no NPBL, não houve a esperada ativação dos mecanismos ocitocinérgicos inibitórios. Em relação ao sistema da rafe, embora tenha havido ingestão de sódio, apenas foi observado um aumento na atividade de neurônios serotoninérgicos na RPn, sendo que não foram observadas alterações nas outras áreas analisadas deste sistema. Quando comparados com o grupo de animais depletados que recebeu salina no NPBL, animais saciados tratados com muscimol apresentaram uma maior atividade de neurônios serotoninérgicos na RDa e RPn, bem como uma menor atividade de neurônios serotoninérgicos na RPa. Houve também um aumento na expressão da proteína c-fos na RMna, BNSTv, NPOMd, NBLA, NCA, NMA, NPBM, NTSr, NTSc e NTScl, bem como uma diminuição da expressão da proteína c-fos no OSF. Seria possível que nas áreas nas quais o grupo de animais saciados tratados com muscimol foi diferente do grupo de ratos depletados tratados com salina, poderia estar sendo observado um efeito do muscimol injetado no NPBL sob a expressão da proteína c-fos, embora seja importante ressaltar que são situações fisiológicas diferentes.

Sumariando, em animais saciados tratados com muscimol e com acesso ao sódio, a expressão de c-fos observada pode ser decorrente da injeção de muscimol no NPBL, da estimulação orosensorial produzida pela solução hipertônica de NaCl, da ativação de mecanismos relacionados com a pós ingestão ou de alterações na concentração plasmática de sódio. Ratos saciados tratados com muscimol e que não tiveram acesso ao sódio apresentaram alteração de atividade apenas em duas áreas cerebrais, um aumento na expressão da proteína c-fos no NTSc e uma redução no NPOMv, porém quando os animais tiveram acesso ao sódio, várias outras áreas apresentaram um aumento de atividade como o NPOMd, amígdala, AP e NTSc (considerando-se apenas as áreas que foram analisadas em comum nas duas situações), além do fato de que desapareceu a redução observada na atividade do NPOMv. Já se comparando ratos tratados com muscimol no NPBL que tiveram ou não acesso ao sódio, observou-se que os animais com acesso ao sódio apresentaram maior expressão da proteína c-fos no NPOMd, OVLT, NPV, NSO, amígdala e AP, sugerindo que a ativação dessas áreas possivelmente seja devido a ingestão de solução hipertônica de NaCl. Além disso, apesar de ingerirem sódio, o grupo de animais saciados tratados com muscimol não apresentou o aumento esperado na atividade de neurônios ocitocinérgicos e de neurônios serotoninérgicos na RPa, o que poderia ser um efeito do muscimol, que ao retardar a ativação dos

mecanismos inibitórios ocitocinérgico e serotoninérgico poderia estar contribuindo para a ingestão de sódio.

Em animais depletados de sódio, injeções bilaterais de muscimol no NPBL promoveram um aumento na ingestão de sódio (34 ml/3 h) quando comparados aos animais depletados que receberam injeções de salina no NPBL (18 ml/3 h). Já em relação à expressão da proteína c-fos, o grupo de ratos depletados tratados com muscimol apresentou um aumento da atividade no NSO (mas não em neurônios ocitocinérgicos), NPOMd, NPBL, NTSc e NTScI, sugerindo que alterações na atividade dessas áreas possam estar envolvidas no efeito natriorexigênico do muscimol injetado no NPBL. Todavia, é importante mencionar, que a ingestão do grupo de animais depletados tratados com muscimol é maior que do grupo de animais depletados tratados com salina, e o efeito na expressão da proteína c-fos também poderia estar sendo decorrente da ingestão de solução hipertônica de sódio.

Comparando-se os grupos de animais saciados e depletados tratados com muscimol, embora só tenha aparecido uma diferença significativa em relação à ingestão de sódio na primeira hora, o grupo depletado tratado com muscimol apresentou uma maior atividade de neurônios ocitocinérgicos no NPV e NSO e menor atividade de neurônios serotoninérgicos na RDa, RPn, bem como uma maior atividade de neurônios serotoninérgicos na RPa. Houve também uma menor expressão da proteína c-fos na RDa, RMna, RPn, BNSTv, NBLA, NCA e uma maior expressão no OSF no grupo depletado comparado com o grupo saciado sendo ambos tratados com muscimol no NPBL. Embora a ingestão final tenha sido estatisticamente semelhante entre os grupos depletados e saciados tratados com muscimol no NPBL, houve diferenças na expressão da proteína c-fos em algumas áreas cerebrais sugerindo que de acordo com a condição fisiológica do animal (saciado ou depletado de sódio) o efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL pode envolver a ativação ou inibição de áreas cerebrais diferentes. As diferenças observadas também podem ter sido decorrentes das diferenças temporais para que a ingestão ocorresse ou a própria ingestão de sódio possa promover uma maior ou menor alteração da atividade de áreas cerebrais dependendo da condição experimental estudada.

Analisando os três grupos que apresentaram ingestão de sódio, a saber, depletados tratados com salina e muscimol no NPBL e saciados tratados com

muscimol no NPBL não foram observadas diferenças na expressão da proteína c-fos na AP, enquanto que animais tratados com muscimol no NPBL, independente de estarem saciados ou depletados, apresentaram uma maior atividade do NTSc e NTScI quando comparados ao grupo de animais depletados tratados com salina no NPBL. Em relação aos subnúcleos da amígdala (NBLA, NMA e NCA), animais saciados tratados com muscimol apresentaram maior expressão de c-fos do que os animais depletados, talvez devido ao fato, de que a depleção por si só apresenta uma tendência em reduzir a expressão da proteína c-fos nestes subnúcleos. Animais depletados e saciados tratados com muscimol, em comparação com os animais depletados tratados com salina, apresentaram maior atividade do NPBL e NPBM, respectivamente. A atividade do NPOMd é menor em animais depletados tratados com salina em comparação aos animais tratados com muscimol. Em relação ao OSF, animais saciados tratados com muscimol apresentaram menor expressão quando comparados aos animais depletados (tanto os tratados com salina quanto os tratados com muscimol), talvez devido ao fato de que a depleção por si só promova expressão de c-fos no OSF.

É importante mencionar que em algumas das áreas analisadas observou-se tendências de redução ou ativação, porém o baixo número de animais pode ter dificultado o aparecimento de diferenças estatísticas. Todavia, considerando-se os resultados obtidos em animais saciados que tiveram ou não acesso ao sódio, pode-se considerar que o aumento na atividade do NTSc independe do animal ingerir ou não sódio, todavia não há mais uma redução na atividade do NPOMv quando os animais tiveram acesso ao sódio, sugerindo que uma redução na atividade do NPOMv poderia ser importante para induzir a ingestão de sódio, porém quando os animais ingerem sódio, a atividade dessa área voltaria aos níveis basais, talvez com o intuito de limitar a ingestão.

3. Participação do NTSc e região AV3V no efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados

3.1 Lesão aguda do NTSc sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados

Baseando-se nos estudos imunohistoquímicos, no qual ativação gabaérgica no NPBL induziu expressão da proteína c-fos no NTSc, foi verificada a participação desta área no efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL. Os resultados apresentados mostraram que lesão do NTSc aumentou a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela ativação gabaérgica (baclofen e muscimol) no NPBL de ratos saciados. Em relação à ingestão de água, a lesão promoveu um aumento e uma redução da ingestão de água que acompanha a ingestão de sódio induzida, respectivamente, pelo baclofen e muscimol. Estes resultados sugerem que o NTSc teria um papel inibitório importante sobre o efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL e estão de acordo com os resultados obtidos no estudo da expressão da proteína c-fos em animais sem acesso ao sódio, uma vez que dentre as áreas analisadas, somente o NTSc apresentou aumento na expressão da proteína c-fos após tratamento com baclofen e muscimol no NPBL em ratos saciados.

Dados da literatura mostraram o envolvimento de áreas bulbares em processos relacionados ao comportamento ingestivo, sendo que estudos mostraram que há subpopulações no NTS que são ativadas pela CCK ou pela ingestão de alimento e estão envolvidas na regulação de curta duração da ingestão de alimento (Zittel e cols., 1999) e a lesão crônica do NTS aumenta a resposta dipsogênica da ANG II sistêmica (Schreihofe e cols., 2000). Foi observado ainda que animais depletados de sódio que tiveram acesso a solução de NaCl expressaram c-fos no NTS (Haupt e cols., 1998) e que ratos submetidos a uma dieta rica em sal (8%) apresentam um aumento das respostas mediadas pelos receptores GABA_A e GABA_B no NTS (Masubushi e cols., 2004). O NTSr, por sua vez, apresenta interações sinápticas complexas, sendo que a entrada de fibras aferentes gustatórias geram uma mistura complexa de potenciais excitatórios (glutamato) e inibitórios (interneurônios gabaérgicos – primariamente sinapses GABA_A), sugerindo uma complexa interação sináptica no processamento da informação gustatória (Grabauskas e Bradley, 1996). Estes dados mostram um papel importante do NTS no controle do comportamento de ingestão.

Relatos sugerem uma interação entre o NPB e áreas bulbares em relação ao comportamento de ingestão. Lesão do NPB e bloqueio do NTS prejudicam a expressão comportamental do apetite ao sal (Flynn e cols., 1991). Ademais, lesão da AP promove um aumento na ingestão de alimentos altamente palatáveis, sendo

este efeito abolido se os animais tiverem lesão do NPBL (Edwards e Ritter, 1989). Estudos sugerem ainda uma conectividade funcional para transferência de informações em relação ao sabor entre o NTS e NPB (Di Lorenzo e Monroe, 1997), além da existência de conexões recíprocas entre o NTS e NPB, indicando a presença tanto de projeções excitatórias quanto inibitórias para o núcleo pontino (Jhamandas e Harris, 1992). Dados mostraram que o subnúcleo medial do NTS envia projeções para o NPB (Hochstenbach e Ciriello, 1997), sendo que o NTSc envia projeções para o NPB lateral e medial e KF (Otake e cols., 1992). Também há um estudo sugerindo uma projeção descendente gabaérgica direta do subnúcleo Koelliker-Fuse (KF) e áreas ao redor do complexo do NPB para o NTS, sendo que a inibição de atividade do NPB, através da administração de lidocaína, diminui a concentração de GABA no NTS (Len e Chan, 2001). Portanto, seria possível que a ativação gabaérgica no NPBL através desta projeção descendente possa estar alterando a atividade de neurônios do NTS.

Administração endovenosa ou intragástrica de salina hipertônica promove a expressão da proteína c-fos no NTS e no NPB (Hochstenbach e cols, 1993; Kobashi e cols., 1993; Carlson e cols., 1997; 1998), sugerindo um possível aumento de atividade destas duas áreas frente a um aumento na concentração de sódio. Assim, seria possível que a ingestão de sódio induzida pela ativação de receptores GABA no NPBL possa estar ativando mecanismos inibitórios para a ingestão de sódio no NTSc e uma vez feita a lesão dessa área, estes mecanismos inibitórios estariam abolidos e, portanto, ratos com lesão do NTSc tratado com muscimol ou baclofen no NPBL iriam ingerir uma quantidade maior de NaCl 0,3 M quando comparados ao seus respectivos controles (lesão fictícia + muscimol ou baclofen).

Em resumo, associando os resultados obtidos através do estudo imunohistoquímico e de lesão em ratos saciados temos que há um aumento da expressão da proteína c-fos no NTSc cuja lesão potencializa o efeito natriorexigênico do muscimol e baclofen injetados bilateralmente no NPBL, indicando um efeito inibitório do NTSc sobre a ingestão de sódio induzida pela ativação gabaérgica no NPBL.

3.2 Lesão aguda da região AV3V sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados

Os resultados mostraram que lesão aguda da região AV3V aboliu tanto o efeito natriorexigênico quanto a ingestão de água promovidos por injeções bilaterais de baclofen (1º dia de lesão) e muscimol (3º dia de lesão), sugerindo que a integridade da região AV3V é importante para a completa expressão do comportamento ingestivo desencadeado pela ativação gabaérgica no NPBL.

A região AV3V (anteroventral do 3º ventrículo) compreende o OVLT, núcleo preóptico mediano e núcleo preóptico periventricular, sendo que a integridade desta região é importante para a ingestão de água induzida por ANG II, salina hipertônica e carbacol (Buggy e Johnson, 1977; Brody e Johnson, 1980; Johnson, 1985; Colombari e cols., 1992, 1992a; Gonçalves e cols., 1992; Valladão e cols., 1992; Johnson e Gross, 1993). Estudos mostraram que a região AV3V também é importante para a ingestão de sódio, sendo que a ingestão diária de NaCl hipertônico estava reduzida em ratos com lesão da região AV3V que foram alimentados com uma dieta deficiente de sódio (Buggy e Bealer, 1987). Além disso, animais com lesão da região AV3V tiveram uma redução na ingestão de salina hipertônica no teste de apetite ao sódio quando submetidos a uma depleção aguda de sódio ou decorrente da administração icv de renina (Fitts e cols., 1990; De Luca e cols., 1992; Vivas e Chiaraviglio, 1992). Portanto, observa-se que a região AV3V é importante tanto para o controle da ingestão de sódio quanto para a ingestão de água. Injeção de ANG II na região AV3V induziu ingestão de água e de NaCl 3%, sugerindo que a região AV3V é importante para a ingestão de salina hipertônica induzida por ANG II (Camargo e cols., 1991). Estudos ainda mostraram que infusão de ANG II no ventrículo cerebral induz ingestão de água e expressão da proteína c-fos no NPBL, sendo estes efeitos reduzidos pela lesão da região AV3V (Xu e Herbert, 1995), sugerindo que a integridade da região AV3V é necessária para que a ativação angiotensinérgica central promova alteração na atividade do NPBL. Por outro lado, a lesão da região AV3V não altera a expressão da proteína c-fos no NPBL decorrente da infusão de salina hipertônica (Hochstenbach e Ciriello, 1996), sugerindo que a capacidade de alterações na osmolalidade plasmática e/ou concentração de sódio afetar a atividade do NPBL independente da região AV3V. Resultados recentes (dado não publicado) mostraram que a administração prévia de losartan (antagonista de receptores angiotensinérgicos do tipo AT1) no ventrículo lateral reduziu o efeito natriorexigênico decorrente das injeções bilaterais de muscimol no NPBL. Portanto, em virtude destes dados, verifica-se a importância da

região AV3V e uma possível interação funcional entre o NPBL e a região AV3V no controle da ingestão de sódio e água, sendo possível que ao lesar a região AV3V, mecanismos neurais importantes (por exemplo, vias angiotensinérgicas), necessários para o desencadeamento do comportamento das ingestões de sódio e de água decorrente da ativação gabaérgica no NPBL, poderiam estar sendo danificados, e conseqüentemente, haveria uma inibição dos comportamentos ingestivos estudados.

É importante ressaltar que os experimentos agudos foram realizados durante a fase de adipsia (duração de ~ 7 dias) promovida pela lesão da região AV3V (Brody e Johnson, 1980; De Luca e Menani, 1996), sendo que no 1º dia após a lesão da região AV3V, os ratos receberam injeção de salina seguida 4 h após por injeções de baclofen no NPBL, e um protocolo semelhante foi realizado no 3º dia após a lesão, quando foram realizadas injeções de muscimol no NPBL. Curiosamente, os animais com lesão da região AV3V (3º dia) que receberam injeções de salina no NPBL tiveram uma indução na ingestão de água em comparação com o grupo lesão fictícia + salina, e apresentaram uma tendência em aumentar também a ingestão de NaCl 0,3 M, porém esta, não foi significativa. Seria possível que ratos com lesão aguda da região AV3V que já foram submetidos a um experimento prévio (1º dia de experimento com baclofen) embora ainda se encontrem numa situação de adipsia, ingiram água e sódio, após serem manipulados e na ausência de alimento, ou seja, quando se encontram numa situação de experimento. Além disso, após o primeiro dia de lesão, buretas contendo solução de sacarose 10% (solução palatável) foram oferecidas aos animais na tentativa de evitar uma desidratação muito severa nesses animais com adipsia. No momento do experimento, estas buretas foram retiradas e apenas buretas contendo água e NaCl 0,3 M foram oferecidas aos animais, talvez, o fato de retirar e não retornar a sacarose, possa ter feito que num primeiro momento os animais bebesses água e NaCl 0,3 M (as ingestões ocorreram praticamente dentro dos primeiros 90 min após manipulação).

Embora o estudo imunohistoquímico mostre que, ou não houve alteração da atividade, ou até diminuição da atividade de áreas que fazem parte da região AV3V, a lesão da região AV3V inibe a ingestão de sódio induzida pela ativação de receptores GABA no NPBL, sugerindo que a região AV3V exerceria um papel facilitatório para o desencadeamento deste comportamento ingestivo.

Associando-se os resultados referentes à lesão do NTSc e a região AV3V sobre a ingestão de NaCl 0,3 M e água induzida pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados, é possível se sugerir uma interação entre essas três áreas. O NPBL recebe aferências do NTS/AP e envia projeções para áreas prosencefálicas envolvidas no controle do equilíbrio hidroeletrólítico. Estudos anteriores mostraram que o NTS/AP teria um papel inibitório sobre a ingestão de sódio, enquanto que a região AV3V, uma região prosencefálica, teria um efeito facilitatório sobre a ingestão de sódio, sendo que, a lesão do NTSc potencializou, enquanto que a lesão da região AV3V aboliu, o efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL.

A ativação gabaérgica no NPBL inibiria a atividade deste núcleo, eliminando os sinais inibitórios para a ingestão de sódio provenientes do NPBL para as áreas prosencefálicas, induzindo assim a ingestão de sódio. Quando o animal ingere sódio, haveria uma expansão de volume e aumento da osmolaridade que ativariam sensores periféricos (baroreceptores arteriais, cardiopulmonares, receptores gustatórios e viscerais) que enviariam sinais para o NTS/AP com o intuito de inibir a ingestão de sódio. Portanto, a lesão da região AV3V aboliria a ingestão, enquanto que a lesão do NTS facilitaria a ingestão de sódio induzida pela ativação gabaérgica no NPBL (Figura 49).

É importante mencionar, que como a lesão do NTS potencializou a ingestão de sódio, isso sugere que o NTS estaria freando a ingestão induzida pelo muscimol ou baclofen no NPBL. Como a atividade do NPBL, estaria inibida pela ativação gabaérgica, esta inibição da ingestão seria por uma via independente do NPBL, que poderia se projetar diretamente para áreas prosencefálicas relacionadas com a ingestão de sódio.

Em relação à região AV3V apenas a ativação gabaérgica no NPBL, praticamente não alterou a atividade desta região, sugerindo que a retirada do mecanismo inibitório poderia estar levando a liberação de um mecanismo facilitador basal que associado à retirada do mecanismo inibitório para outras áreas, poderia ser o responsável pela ingestão de sódio, por meio da ativação de outras áreas cuja atividade não foi analisada pelo estudo imunoistoquímico.

4. Interação entre diferentes mecanismos neuronais no NPBL no controle da ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados

4.1 Interação entre mecanismos adrenérgicos α_2 e gabaérgicos

Em relação à ingestão de NaCl 0,3 M, observou-se que a administração prévia de RX 821002 (10 nmol - antagonista receptores adrenérgicos α_2) reduziu parcialmente o efeito natriorexigênico do muscimol (últimos 90 min de experimento) e do baclofen (últimos 30 min de experimento). Em relação à ingestão de água, RX 82110 aboliu a ingestão de água em animais tratados com muscimol e não afetou a ingestão de água em animais tratados com baclofen. É importante ressaltar que quase a totalidade da água ingerida é decorrente da ingestão de NaCl hipertônico, e não um efeito direto da ativação gabaérgica no NPBL, sendo que o muscimol no NPBL induz uma ingestão de água de ~ 4 ml, enquanto que o baclofen, não altera a ingestão de água em ratos saciados. Portanto, parece que a ativação de mecanismos adrenérgicos α_2 no NPBL participa do efeito natriorexigênico desencadeado pela ativação gabaérgica no NPBL, sendo mais evidente esta participação, nos animais tratados com muscimol em comparação aos tratados com baclofen.

Estudos anteriores já haviam demonstrado um envolvimento de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL no controle da ingestão de sódio, sendo que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL em ratos tratados com furosemide sc + captopril sc (inibidor da enzima conversora de ANG II, em baixas doses) promove uma ingestão de NaCl 0,3 M final semelhante a dos ratos saciados que receberam muscimol ou baclofen no NPBL, sendo este efeito abolido pela administração prévia de RX 821002 (10 nmol) (Andrade e cols., 2004). Foi observado que a administração prévia de bicuculina (antagonista de receptores GABA_A) no NPBL reduz parcialmente o efeito da moxonidina (agonista de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos) sobre a ingestão de sódio induzida pelo tratamento com furosemide sc + captopril sc (Andrade e cols., 2004a), sugerindo que parte dos efeitos da moxonidina no NPBL depende da ativação gabaérgica e os presentes resultados mostram que os efeitos produzidos pela ativação gabaérgica no NPBL também dependem parcialmente da ativação dos receptores adrenérgicos α_2 .

Dados anteriores já demonstraram uma interação entre receptores adrenérgicos α_2 e mecanismos gabaérgicos. Ativação gabaérgica pode modular a liberação de noradrenalina no núcleo préóptico mediano (Sakamaki e cols., 2003; 2004) e no OSF (Tanaka e cols., 2002) e ativação de receptores GABA_B na região

do núcleo infundibular do hipotálamo ventromedial diminui o tônus noradrenérgico (Tomaszewska-Zaremba e Przekop, 2005). Também já foi observado que ativação de receptores adrenérgicos α_2 em neurônios pré-sinápticos gabaérgicos (localizados na região parvocelular do núcleo paraventricular hipotalâmico) diminui a frequência de correntes sinápticas inibitórias espontâneas (Han e cols., 2002). Portanto, verifica-se que há uma interação entre mecanismos gabaérgicos e adrenérgicos α_2 , sendo que a ativação de um mecanismo pode modular a atividade do outro.

4.2 Interação entre mecanismos serotoninérgicos e gabaérgicos

Injeções bilaterais do agonista de receptores serotoninérgicos 5HT_{2A/2C}, DOI (5 µg) inibiu as ingestões de NaCl 0,3 M e água induzidas pela injeções de muscimol no NPBL, ou seja, a ativação dos receptores serotoninérgicos 5HT_{2A/2C} do NPBL inibe os efeitos da ativação gabaérgica no mesmo núcleo. Uma possível interpretação para esses efeitos seria que a ativação gabaérgica poderia estar inibindo o mecanismo serotoninérgico do NPBL, cuja atividade seria revertida pelas injeções de DOI no NPBL. Todavia, administração do agonista serotoninérgico não alterou o efeito natriorexigênico e a ingestão de água observados após a administração de baclofen no NPBL, o que sugere dois mecanismos diferentes para a indução da ingestão de água e sódio pela ação do muscimol e baclofen no NPBL.

Há relatos na literatura mostrando uma interação entre mecanismos serotoninérgicos e gabaérgicos. Em fatias do hipocampo foi observado que a serotonina, através dos receptores 5HT₄ exerce uma modulação complexa no sistema gabaérgico podendo inibir ou aumentar a liberação de GABA (Bianchi e cols., 2002). Além disso, estudos mostraram que aferências do cortex prefrontal medial pode inibir os neurônios serotoninérgicos no núcleo dorsal da rafe através da ativação de interneurônios gabaérgicos (Celada e cols., 2001).

A serotonina é conhecida como um neurotransmissor envolvido na saciedade e estudos anteriores mostraram o papel da serotonina no NPBL para o controle da ingestão de água e de sódio (Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; De Gobbi e cols., 2000). Injeções bilaterais de metisergida (antagonista de receptor serotoninérgico) no NPBL aumentaram a ingestão de água e de solução hipertônica de NaCl induzidas por depleção de sódio, tratamento com injeções subcutâneas do

diurético furosemide + captopril e tratamento com deoxicorticosterona (DOCA - composto esteróide com propriedades semelhantes a aldosterona), enquanto que a administração do agonista serotoninérgico DOI promoveu redução dessa ingestão (Menani e cols., 1996; Menani e cols., 1998; De Gobbi e cols., 2000), sugerindo a presença de um mecanismo serotoninérgico inibitório para o controle da ingestão de água e de sódio presente no NPBL.

Sabendo-se que há interações entre os mecanismos serotoninérgicos e gabaérgicos e que ambos estão presentes no NPBL exercendo efeitos opostos, é possível que a ativação dos receptores GABA_A no NPBL possa estar inibindo a atividade dos neurônios serotoninérgicos diminuindo assim a disponibilidade de serotonina, inativando, portanto, uma via conhecida por ser inibitória para a ingestão de sódio, e conseqüentemente, podendo, juntamente com outros fatores, desencadear o processo ingestivo. Assim sendo, quando se faz a administração do agonista serotoninérgico, a via inibitória seria novamente ativada, inibindo assim, a ingestão de sódio induzida pela ativação de receptores GABA_A no NPBL. Todavia, a administração de metisergida (antagonista serotoninérgico) no NPBL que também inibiria a atividade de mecanismos serotoninérgicos relacionados com a saciedade não induz ingestão de sódio em ratos normovolêmicos como o muscimol faz, talvez devido ao fato de que o muscimol também afetaria outros mecanismos que não seriam atingidos apenas pelo bloqueio promovido pela metisergida. Uma outra possibilidade seria que talvez o muscimol não afete a atividade basal do mecanismo serotoninérgico para induzir ingestão de sódio, mas sim altere a atividade de outros mecanismos responsáveis pela indução da ingestão. Todavia quando há uma ativação do mecanismo serotoninérgico além dos níveis basais, através da administração do agonista serotoninérgico DOI, o efeito inibitório do mecanismo serotoninérgico poderia se sobrepôr ao efeito facilitatório sobre a ingestão de sódio decorrente da ativação gabaérgica no NPBL. Assim, o efeito do muscimol não seria devido a uma redução da atividade do mecanismo serotoninérgico no NPBL e por isso, seu efeito não seria mimetizado pela metisergida.

O mesmo não pode ser inferido para o tratamento com baclofen, sugerindo que o efeito natriorexigênico do baclofen não dependeria da inibição do sistema serotoninérgico no NPBL.

4.3 Interação entre mecanismos opióides e gabaérgicos

Os resultados mostraram que naloxona (antagonista de receptores opióides) injetada no NPBL reduziu de maneira dose dependente a ingestão NaCl 0,3 M e água induzida pelo muscimol ou baclofen no NPBL sendo que a maior dose da naloxona (60 μ g) aboliu tanto o efeito natriorexigênico quanto a ingestão de água observados após a ativação gabaérgica no NPBL, confirmando o envolvimento de mecanismos opióides na ingestão de sódio e água desencadeada pela ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados.

Já havia sido demonstrada uma interação entre mecanismos opióides e gabaérgicos para o controle da ingestão de alimento sendo que na região da área tegmental ventral a administração prévia de naltrexona reduziu a ingestão de alimento promovida pelo baclofen e no núcleo accumbens a ingestão de alimento promovida pelo muscimol (Znamensky e cols., 2001; Echo e cols., 2002). Além disso, receptores opióides do tipo μ presentes no NPBL estão envolvidos no controle da ingestão alimentar (Wilson e cols, 2003), sugerindo um papel importante do mecanismo opioidérgico no NPBL para o controle da ingestão alimentar. Mecanismos opióides podem modular a liberação de GABA, sendo que a ativação de receptores opióides pode inibir (Bergevin e cols., 2002; Hjelmstad e Fields, 2003) ou promover (Kawamata e cols., 2002) a liberação de GABA. Por outro lado, na região do núcleo infundibular do hipotálamo ventromedial, a ativação de receptores GABA_B diminui o tônus β endorfinérgico, enquanto que a inibição dos receptores GABA_B, aumenta a concentração extracelular de β endorfina (Tomaszewska-Zaremba e Przekop, 2005).

Em suma, baseando-se em dados da literatura e nos resultados apresentados, verifica-se que tanto mecanismos opióides quanto gabaérgicos estão presentes no NPBL e que há uma interação entre eles, assim sendo, os efeitos da ativação gabaérgica no NPBL sobre a ingestão de sódio e de água (decorrente da ingestão de NaCl hipertônico) dependem da ativação de mecanismos opióides, ou seja, é possível que a ativação de receptores GABA_A e GABA_B no NPBL leve a liberação de opióides que atuando em seus respectivos receptores colaborem ou promovam a ingestão de sódio em ratos saciados.

Considerando-se as interações estudadas entre a ativação gabaérgica e os mecanismos adrenérgicos α_2 , serotoninérgicos e opioidérgicos, dentre outras possibilidades, um possível mecanismo para explicar essas interações poderia ser como o esquematizado na Figura 49.

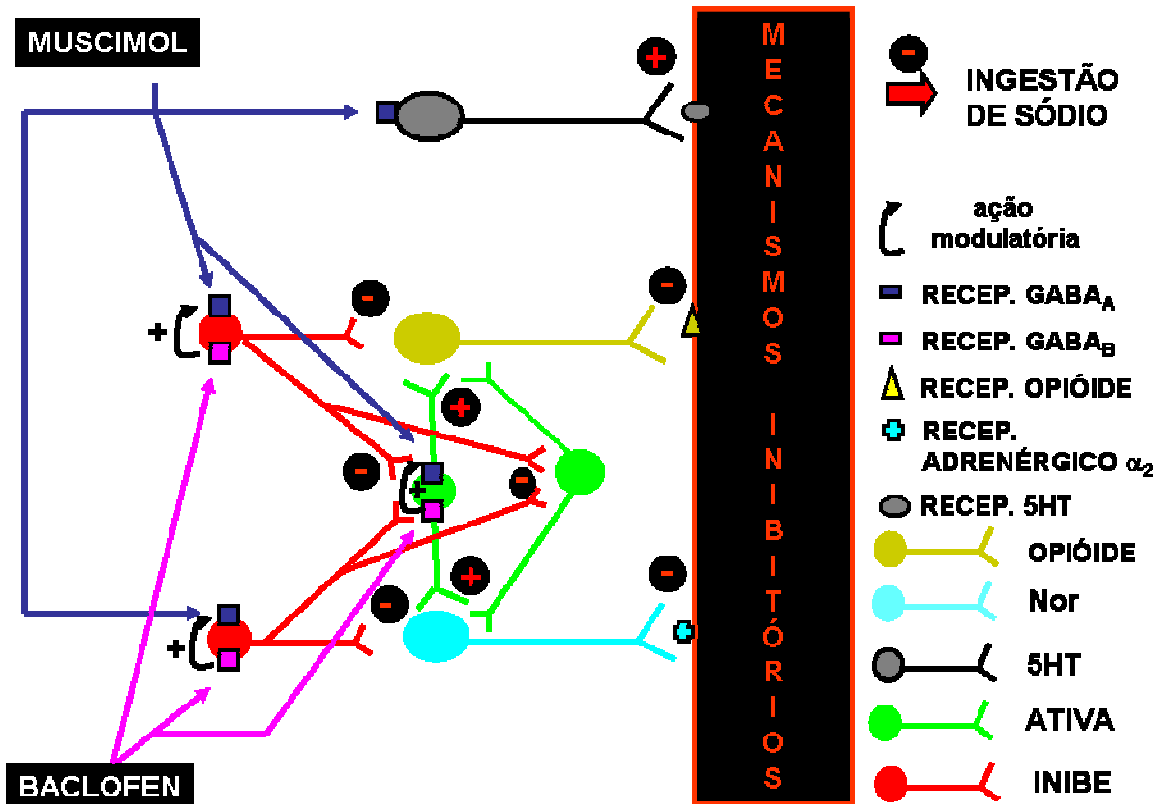


Figura 49: Esquema ilustrando uma possível interação entre os diferentes neurotransmissores envolvidos no efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados e normovolêmicos.

Em ratos saciados os mecanismos inibitórios presentes no NPBL estariam ativados e, portanto o animal não iria ingerir sódio. Os estudos de interação sugerem que a ativação gabaérgica estaria levando a ativação de mecanismos opioides e receptores adrenérgicos α_2 que poderiam estar reduzindo a atividade desses mecanismos inibitórios e assim liberando a ingestão de sódio. Uma possibilidade seria que os neurônios opioides (em amarelo), bem como os noradrenérgicos (em azul), estariam sob o controle tanto de um sinal inibitório (em vermelho) quanto de sinais facilitatórios (em verde). O neurônio inibitório (em vermelho) não seria gabaérgico, embora tivesse sua atividade regulada pelo GABA. Em relação aos neurônios facilitatórios, um teria sua atividade regulada pelo GABA, porém o outro não possuiria receptores gabaérgicos (Figura 49).

Injeções bilaterais de muscimol no NPBL levariam a ativação de receptores GABA_A presentes nos neurônios inibitórios, inibindo a atividade destes, e conseqüentemente retirando tanto a inibição direta sobre a atividade do neurônio opióide e noradrenérgico, quanto a inibição sobre o neurônio facilitador, o que poderia levar a liberação de opióides que atuariam em seus receptores, bem como de noradrenalina que ativando receptores adrenérgicos α_2 , reduziriam a atividade dos mecanismos inibitórios no NPBL, induzindo a ingestão de sódio. Além disso, muscimol poderia ativar receptores GABA_A presentes em terminações de neurônios 5HT, reduzindo a liberação de 5HT e assim reduzindo a atividade de um mecanismo inibitório para a ingestão de sódio (Figura 49).

O baclofen, por sua vez, atuaria por um via semelhante a do muscimol, e a ativação de receptores GABA_B também poderia reduzir a atividade do neurônio inibitório para a liberação dos mecanismos opióides e adrenérgicos α_2 . Para que haja o efeito natriorexigênico do baclofen, é necessário que os receptores GABA_A sejam ativados. Para tanto, baclofen poderia ativar os receptores GABA_B que poderiam modular positivamente a atividade de neurônios GABA_A. É importante mencionar que a inibição de mecanismos serotoninérgicos talvez não seja necessária para a indução da ingestão de sódio induzida pelo baclofen (Figura 49).

5. Mecanismos opióides no NPBL no controle da ingestão de NaCl 0,3 M, água e sacarose em ratos saciados

Os resultados obtidos com a associação naloxona (antagonista opióide) + agonistas gabaérgicos (muscimol e baclofen) no NPBL, sugerem que a ativação de receptores gabaérgicos no NPBL poderia promover a liberação de opióides e estes, por sua vez, induziriam a ingestão de NaCl 0,3 M em ratos saciados. Se esta hipótese for verdadeira, é esperado que a administração de uma agonista opióide no NPBL induzisse ingestão de sódio em ratos saciados. Injeções bilaterais de β endorfina (agonista opióide) no NPBL de ratos saciados induziram ingestão de sódio e de água de uma forma temporalmente semelhante às ingestões promovidas pela ativação gabaérgica no NPBL. Tanto a ingestão de sódio quanto de água observada após ativação opióide no NPBL foi abolida após a administração do antagonista opióide, naloxona, na dose de 40 μ g (dose capaz de reduzir ou abolir,

respectivamente, o efeito natriorexigênico do muscimol e baclofen injetados no NPBL), sugerindo que tanto a ingestão de NaCl 0,3 M quanto de água induzida pelas injeções bilaterais de β endorfina no NPBL se deve à ativação de receptores opióides. Além disso, o efeito da β -endorfina injetada no NPBL parece ser específico para a ingestão de solução hipertônica de NaCl, já que não foram observadas alterações na ingestão de sacarose 2%. A ingestão de água observada quando os animais têm acesso ao NaCl 0,3 M, parece ser secundária à ingestão de sódio, uma vez que em animais saciados que não tiveram acesso ao sódio, β -endorfina não induziu ingestão de água.

Segundo Goodman e Gilman (1996), a β endorfina (derivada do pro-opiomelanocortina) pode se ligar tanto em receptores do tipo mu quanto delta, isto tanto periférica quanto centralmente. Estudos mostraram a presença de receptores mu e delta no núcleo parabraquial (NPB) (Christie e North, 1988; Xia e Haddad, 1991). Além disso, foi observada imunorreatividade para encefalina na região dorsolateral do NPB (Milner e cols., 1984) e a presença de neurônios imunorreativos para encefalina no NTS que se projetam para o NPB (Maley e Panneton, 1988). Estes dados sugerem a presença de mecanismos opióides no NPB.

Os mecanismos opióides participam do controle da ingestão de água e de solução hipertônica de NaCl, sendo que β endorfina injetada no núcleo paraventricular, hipotálamo ventromedial, *globus pallidus*, mas não no hipotálamo lateral, estimula a ingestão de água (Gosnell e cols., 1986) e quando injetada icv inibe a resposta pressora e a ingestão de água induzida pela ANG II, sendo sua ação mais duradoura e potente que a das encefalinas (Summy-Long e cols., 1981). Além disso, administração periférica de naloxona reduz a ingestão de NaCl 1,5% induzida por estresse ou por ANG II icv em camundongos e curiosamente, a morfina, aumenta a preferência do camundongo por uma solução normalmente aversiva de NaCl 3%, sem alterar, as ingestões de NaCl menos concentradas, mais palatáveis (Kuta e cols., 1984). Outros estudos mostraram que administração de antagonistas opióides reduz a ingestão de água induzida por injeção central ou periférica de ANG II (Brown e cols., 1981; Siviy e cols., 1981; Rowland, 1982; Yu e cols., 1997). Administração sistêmica de naloxona (antagonista opióide) reduziu de forma dose dependente a ingestão de salina hipo e hipertônica (Cooper e Gilbert, 1984), enquanto que a administração central de naltrexona (outro antagonista opióide)

reduziu a ingestão de salina hipotônica, mas não a ingestão de salina hipertônica induzida por privação hídrica (Bodnar e cols., 1995). Estes estudos sugerem um papel importante de mecanismos opióides no controle da ingestão de água e de solução de NaCl hipertônico.

Em suma, há evidências da existência de mecanismos opióides no NPBL e do envolvimento dos mecanismos opióides no controle da ingestão de água e de NaCl, e os presentes resultados mostram que a ativação de mecanismos opióides presentes no NPBL induz ingestão de NaCl 0,3 M e água em ratos saciados.

Ademais, administração prévia do antagonista de receptores opióides, naloxona, foi capaz de reduzir a ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio de 24 h, sugerindo a presença de um mecanismo opióide tônico no NPBL no controle da ingestão de sódio na condição experimental estudada.

Associando-se os resultados prévios obtidos com as interações entre mecanismos opióides e gabaérgicos em ratos saciados e normovolêmicos, bem como o envolvimento de um mecanismo opioidérgico tônico no controle da ingestão de sódio induzida pela depleção de sódio por 24 h, uma possível explicação para o efeito dual (inibitório e facilitatório) decorrente da ativação gabaérgica no NPBL sobre a ingestão de sódio em ratos depletados de sódio por 24 h, poderia ser como a ilustrada na Figura 50.

A Figura 50 mostra que em animais saciados, os mecanismos inibitórios do NPBL, como por exemplo, serotonina (5HT) e colecistocinina (CCK) estariam ativados, inibindo a ingestão de sódio, e seria possível que mecanismos facilitadores da ingestão, como o opioidérgico, estivessem inibidos. Quando os animais são depletados de sódio, haveria uma redução na atividade dos mecanismos 5HT e CCK, reduzindo a ativação dos mecanismos inibitórios promovendo assim a ingestão de sódio. Além disso, os estudos com naloxona, mostraram a presença de um mecanismo opióide ativo durante a depleção de sódio. Portanto, a retirada de sinais positivos associada à ativação de sinais negativos para os mecanismos inibitórios, promoveria no final a ingestão de sódio.

Mas como a ativação de receptores gabaérgicos poderia afetar a ingestão nos animais depletados?

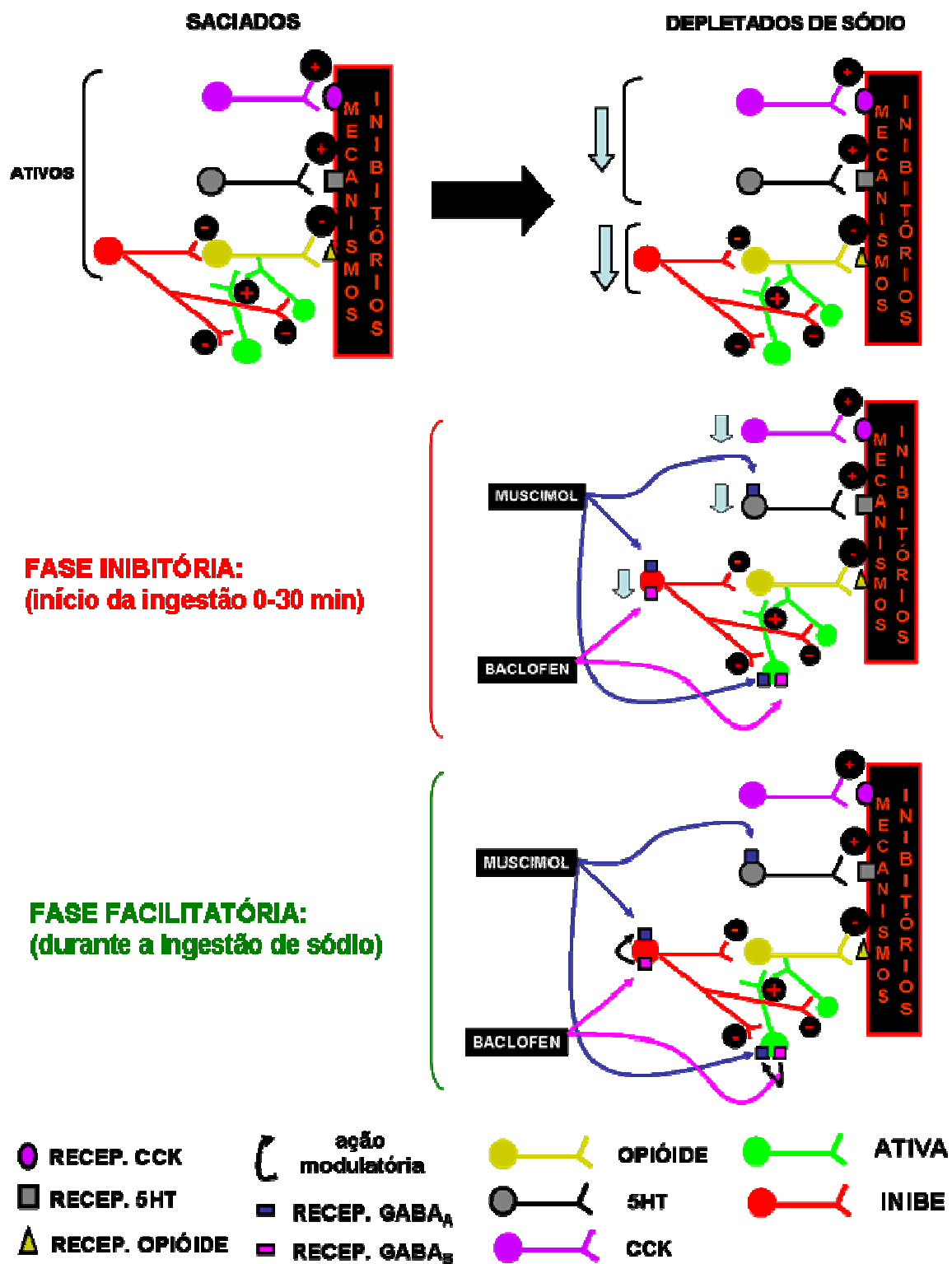


Figura 50: Esquema ilustrando uma possível hipótese para o efeito dual decorrente da ativação gabaérgica no NPBL sobre a ingestão de sódio em ratos depletados de sódio por 24 h.

A atividade do neurônio opioide estaria novamente sobre a influência tanto de sinais inibitórios (em vermelho) quanto de sinais facilitatórios (em verde), e os sinais facilitatórios também poderiam estar sendo regulados pelos inibitórios. A depleção promoveria uma redução da atividade dos sinais inibitórios, e conseqüentemente os sinais facilitatórios e o neurônio opioide seriam ativados, havendo liberação de opióides que atuando em seus receptores reduziria a atividade do mecanismo inibitório final para a ingestão.

Ao se administrar muscimol, haveria a ativação de receptores GABA_A, que estariam presentes tanto nos neurônios inibitórios quanto facilitatórios. Todavia a atividade dos inibitórios já estaria reduzida, assim o principal efeito do muscimol seria observado nos receptores GABA_A presentes no neurônio facilitatório. Inibindo a atividade do neurônio facilitatório, haveria uma redução na atividade do mecanismo facilitador para a ingestão, e por isso os animais tratados com muscimol teriam uma ingestão inicial menor que os animais controle (fase inibitória). Além disso, a ativação de receptores GABA_A também poderia reduzir ainda mais a atividade de neurônios 5HT cuja atividade já está reduzida nos animais depletados.

A ativação dos receptores GABA_A reduz, mas não abole a ingestão, e essa ingestão pode ser devida à atividade de mecanismos 5HT e CCK que permanecem reduzidos ou devido a presença do outro neurônio facilitador para a atividade do neurônio opioide, que não possuiria receptores gabaérgicos, e, portanto, não sofreria a ação inibitória dada pelo muscimol. A ativação dos receptores GABA_B, promovida pelo baclofen, teria um efeito inicial semelhante ao do muscimol.

Conforme os ratos depletados ingerem sódio, ocorreria uma alteração do sistema, sendo que a atividade da 5HT e CCK não estaria mais reduzida, bem como o mecanismo inibitório para o neurônio opioide voltaria a ser ativo, tentando limitar uma ingestão excessiva. Como muscimol está disponível no sistema, os receptores GABA_A estariam ativados. Assim, o mecanismo inibitório para o neurônio opioide que deveria ser ativado, permaneceria inibido. Além disso, muscimol poderia estar inibindo a atividade do neurônio 5HT, retardando a atividade desse mecanismo inibitório para a ingestão de sódio. Esses fatores de ativação de mecanismo facilitador e redução da atividade de mecanismo inibitório, associada ao fato de que a própria ingestão de sódio é um fator facilitador para que ocorra a ingestão de solução hipertônica de sódio, poderiam levar a ingestão exacerbada final produzida pelo muscimol injetado no NPBL em ratos depletados.

O efeito do baclofen é semelhante ao do muscimol, uma vez que seu efeito facilitatório sobre a ingestão de sódio depende da ativação de receptores GABA_A. Assim, seria possível que baclofen ao ativar os receptores GABA_B poderia modular de forma positiva a atividade dos neurônios GABA_A.

6. Efeitos da ativação gabaérgica no NPBL sobre a PAM e FC basais e excreção urinária

Ativação gabaérgica no NPBL induz ingestão de sódio que ocorre em torno de 90-120 min após as injeções de muscimol ou baclofen no NPBL. Seria possível que esse atraso para o início da ingestão, se devesse a outras alterações causadas pela ativação gabaérgica, por exemplo, alterações na PAM e excreção urinária, que por sua vez promoveriam a ingestão de sódio, ou seja, a ingestão de NaCl não seria um efeito direto da ativação gabaérgica no NPBL, mas sim secundário. Uma redução na PAM mimetizaria uma situação de hipovolemia e/ou um aumento na excreção de sódio, poderia levar à ingestão de sódio.

Foram analisadas, em ratos normotensos e saciados que receberam injeções bilaterais de muscimol e baclofen no NPBL e não tiveram acesso ao NaCl durante o experimento, alterações na PAM e FC. A análise da variação da PAM e FC mostrou que injeções bilaterais de muscimol (agonista de receptores GABA_A) no NPBL promoveram um aumento da PAM basal, sem alterações na FC, sendo que este efeito foi observado 5 min após as injeções de muscimol e perdurou por no mínimo 2 h. Já em relação ao baclofen (agonista de receptores GABA_B) injetado bilateralmente no NPBL não foram observadas alterações nem na PAM nem na FC.

O NPBL tem um papel importante na regulação cardiovascular. Aumentos ou diminuições na pressão sanguínea promovem expressão da proteína c-fos no NPBL (Li e Dampney, 1995; Rocha e Herbert, 1996; Xie e cols., 2000). Em ratos anestesiados, foi observado que o NPBL lateral e medial poderiam atuar como regiões de integração central de entrada de informações cardiovasculares, sendo que neurônios presentes no NPBL lateral e medial respondem à ativação do quimiorreflexo, enquanto que subnúcleos de neurônios no NPBL integram informações de quimio e barorreflexo (Hayward e Felder, 1995), além disso, quando neurônios do NPBL são ativados, há uma redução da capacidade do barorreflexo para regular os aumentos da PA mediados por atividade simpática (Hayward e

Felder., 1998). Administração de glutamato e estimulação elétrica do NPBL, KF e proximidades em ratos anestesiados promoveu um aumento da PAM, em torno de 14 ± 8 mmHg (Ward, 1988), e inibição da atividade do NPBL, através da injeção de lidocaína 10%, aumentou a PAM basal (23 ± 3 mmHg) em ratos acordados (Menani e cols., 1995). Estes dados sugerem um papel importante do NPB, e do NPBL, no controle cardiovascular.

Estudos mostram, ainda, que a maior parte das aferências que chegam ao NPBL são provenientes do NTS, que é uma estrutura localizada na superfície dorsal do bulbo que recebe informações de receptores viscerais de sítios cardiovasculares, respiratórios e gastrointestinais (Ter Horst e Streefland, 1994; Mosqueda-Garcia, 1996). As aferências dos barorreceptores carotídeos e aórticos (barorreflexo), dos quimiorreceptores carotídeos (quimiorreflexo) e as aferências das fibras C cardiopulmonares (reflexo Bezold-Jarish) fazem sua primeira sinapse no NTS, que por sua vez, conecta-se com o NPBL. Além de conectar-se com o NTS, o NPBL também recebe aferências da AP que estaria envolvida na regulação cardiovascular e no controle do equilíbrio hidroeletrólítico (Shapiro e Miselis, 1985; Marshall, 1994; Sapru, 1994; Mosqueda-Garcia, 1996; Machado e cols., 1997). Há relatos mostrando que o NPB medial e KF se projetam para o NTSc e que o NPB, principalmente, NPBL se projeta para o bulbo ventrolateral (Krukoff e cols., 1993). Além disso, há evidências de eferências excitatórias e inibitórias que se projetam do NPB para AP/NTS (Papas e Ferguson, 1991).

Em resumo, o NPBL participa da regulação de reflexos cardiovasculares e interage com o NTS, portanto, a ativação de receptores GABA_A (muscimol) ou GABA_B (baclofen) no NPBL poderia levar a aumentos da PAM. Os resultados sugerem que o aumento da PAM promovido pelo muscimol injetado bilateralmente no NPBL se deve a um aumento da atividade simpática, uma vez que administração endovenosa de prazosin (antagonista de receptores α_1) abole esta resposta hipertensora.

Este aumento ou ausência de alteração na PAM observado após administração de muscimol ou baclofen, respectivamente, no NPBL descarta a possibilidade de que o efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL se deva a uma eventual facilitação da ingestão causada pela redução da PAM mimetizando uma situação de hipovolemia.

Em relação à excreção urinária em ratos saciados e sem acesso ao sódio ou a água, muscimol injetado bilateralmente no NPBL induziu apenas um pequeno aumento no volume urinário, que poderia ser secundário ao aumento da PAM, sem alterar a excreção urinária de sódio e potássio. Já o baclofen injetado no NPBL não alterou nenhum dos parâmetros renais analisados. Estes resultados sugerem que a ingestão de sódio em ratos saciados induzida pela ativação gabaérgica no NPBL não é secundária a alterações na excreção urinária.

Quando foi permitido aos animais ingerirem sódio e água, observou-se um aumento do volume urinário, bem como na excreção urinária de sódio e potássio, tanto para os animais que receberam muscimol quanto para os animais que receberam baclofen no NPBL. Estes animais foram submetidos a um outro tratamento no qual eles não receberam injeções centrais, mas sim, sobrecarga intragástrica de NaCl 0,3 M e água na mesma quantidade que eles ingeriram quando receberam as injeções de muscimol ou baclofen no NPBL. Nesta situação experimental, observou-se que os animais que receberam muscimol no NPBL apresentaram uma maior excreção de potássio, sem diferenças em relação ao volume urinário e excreção de sódio, quando comparados ao experimento em que receberam sobrecarga intragástrica de NaCl, sugerindo que o volume ingerido decorrente da injeção de muscimol no NPBL estaria sendo excretado, ou seja, o muscimol no NPBL não estaria afetando os parâmetros renais. Já em relação ao baclofen, observou-se que embora o volume ingerido seja semelhante entre os animais que receberam baclofen no NPBL e os animais que receberam sobrecarga intragástrica, observou-se uma redução no volume urinário excretado e na excreção urinária de sódio quando os animais receberam baclofen em comparação ao experimento no qual os animais receberam sobrecarga. Estes resultados sugerem que ao mesmo tempo em que o baclofen injetado no NPBL induziria ingestão de sódio, poderia estar reduzindo a excreção urinária.

SINOPSE

1. *Mecanismos gabaérgicos no NPBL - comportamento ingestivo, estudo imunohistoquímico, alterações da PAM e excreção urinária.*

1.1 Em ratos saciados e normovolêmicos, muscimol (agonista de receptores GABA_A) e baclofen (agonista de receptores GABA_B) injetados bilateralmente no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M acompanhada de um aumento na ingestão de água, sendo que os efeitos do muscimol foram reduzidos pelo tratamento prévio com bicuculina (antagonista de receptores GABA_A), mas não pelo tratamento com CGP 35348 (antagonista de receptores GABA_B). Já os efeitos do baclofen foram abolidos tanto pelas injeções prévias de CGP 35348 quanto pela bicuculina.

1.2 Em ratos depletados de sódio por 24 h, injeções bilaterais de muscimol e baclofen no NPBL, promoveram uma redução inicial e uma facilitação tardia da ingestão de NaCl 0,3 M. Bicuculina, mas não CGP 35348, aboliu tanto o efeito inibitório quanto facilitatório do muscimol injetado no NPBL sobre a ingestão de sódio. CGP 35348 aboliu o efeito inibitório, enquanto que a bicuculina aboliu o efeito facilitatório do baclofen sobre a ingestão de sódio.

1.3 Inibição de receptores GABA_A (bicuculina) e GABA_B (CGP 35348) não alterou nem a ingestão de NaCl 0,3 M nem de água em animais saciados ou depletados de sódio. Todavia, injeções de CGP 35348, mas não de bicuculina no NPBL, reduziram a ingestão de NaCl 0,3 M em animais que foram treinados a ingerirem solução hipertônica de NaCl 0,3 M apenas 2 h por dia.

1.4 Os estudos da proteína c-fos e da dupla marcação cfos + neurônios ocitocinérgicos ou serotoninérgicos mostraram que:

1.4.1 Ratos saciados sem acesso ao sódio e tratados com muscimol e baclofen no NPBL apresentaram um aumento na expressão da proteína c-fos no NTSc e uma redução no NPOMv, porém quando animais tratados com muscimol no NPBL tiveram acesso ao sódio, várias outras áreas apresentaram um aumento de atividade como NPOMd, Amg, AP e NTSc (considerando-se apenas as áreas que

foram analisadas em comum nas duas situações), além do fato de que desapareceu a redução observada na atividade do NPOMv. Comparando-se ratos tratados com muscimol no NPBL que tiveram ou não acesso ao sódio, observou-se que os animais com acesso ao sódio apresentaram aumento da proteína c-fos no NPOMd, OVLT, NPV, NSO, Amg e AP.

1.4.2 Apenas a depleção de sódio por 24 h levou a uma redução da proteína c-fos no NSO, RDa, RMna, RPn e RPa; bem como um aumento na atividade do OSF. Por outro lado, quando os animais, depletados de sódio por 24 h, tiveram acesso ao NaCl 0,3 M e água, foi observado um aumento da proteína c-fos no NPV, NSO, NMA e NPBM, bem como na atividade de neurônios ocitocinérgicos no NPV e NSO; e serotoninérgicos na RPa.

1.4.3 Quando tiveram livre acesso ao sódio, ratos depletados de sódio e tratados com muscimol apresentaram um aumento da atividade no NSO (mas não em neurônios ocitocinérgicos), NPOMd, NPBL, NTSc e NTScI quando comparados aos animais depletados tratados com salina no NPBL.

1.5 Enquanto a lesão aguda do NTSc aumentou, lesão aguda da região AV3V reduziu, a ingestão de sódio induzida pelas injeções de baclofen (1º dia após lesão) e muscimol (3º dia após lesão) no NPBL. Em relação à ingestão de água, a lesão do NTSc promoveu um aumento e uma redução da ingestão de água que acompanha a ingestão de sódio induzida, respectivamente, pelo baclofen e muscimol, já a lesão da região AV3V aboliu a ingestão de água nos dois tratamentos estudados.

1.6 Quando apenas água, mas não NaCl 0,3 M, foi disponibilizado para os animais, muscimol injetado bilateralmente no NPBL induziu uma pequena ingestão, enquanto baclofen não alterou, a ingestão de água. Tanto muscimol quanto baclofen injetados no NPBL promoveram um pequeno aumento na ingestão de água induzida por privação hídrica por 24 h.

1.7 Quando alimento, NaCl 0,3 M e água, estiveram disponíveis para os animais, injeções de muscimol no NPBL induziram ingestão de NaCl 0,3 M e água; e baclofen induziu apenas ingestão de sódio, sendo que a ingestão de alimento permaneceu inalterada após ativação gabaérgica no NPBL em ratos saciados. Já em animais privados de alimento por 24 h, muscimol e baclofen induziram ingestão de sódio,

porém muscimol não alterou as ingestões de alimento e água, enquanto que baclofen reduziu tanto a ingestão de alimento quanto de água;

1.8 Quando animais depletados de sódio tiveram além das buretas de água e NaCl 0,3 M também buretas de sacarose 2% disponíveis, observou-se apenas o efeito facilitatório do muscimol sobre a ingestão de sódio e água, sendo que tanto o efeito inibitório quanto facilitatório do baclofen desapareceram. Em nenhum dos tratamentos verificou-se alteração na ingestão de sacarose 2%.

1.9 Injeções de muscimol no NPBL promoveram um aumento da PAM dependente de ativação simpática, mas baclofen não a alterou. Não foram observadas alterações na FC em animais tratados com muscimol ou baclofen no NPBL.

1.10 Analisando-se as respostas renais verificou-se que muscimol injetado bilateralmente no NPBL em ratos saciados e sem acesso ao sódio e água durante o experimento induziu apenas um pequeno aumento no volume urinário, que poderia ser secundário ao aumento da PAM, sem alterações na excreção urinária de sódio e potássio, enquanto que o baclofen injetado no NPBL não alterou nenhum dos parâmetros renais analisados. Quando se comparou o volume e a excreção urinária de sódio e potássio dos animais que receberam muscimol no NPBL e tiveram acesso ao sódio e água com as mesmas respostas destes animais quando sem receberem injeções centrais foram submetidos a sobrecarga intragástrica de NaCl 0,3 M e água nas mesmas quantidades que haviam ingerido quando receberam as injeções de muscimol no NPBL, observou-se que o tratamento com muscimol no NPBL aumentou a excreção de potássio, sem alterar o volume urinário e excreção de sódio. Já em relação ao baclofen, observou-se uma redução no volume urinário excretado e na excreção urinária de sódio quando os animais receberam baclofen em comparação ao experimento no qual os animais receberam sobrecarga.

2. Interação entre mecanismos gabaérgicos, adrenérgicos α_2 , serotoninérgicos e opioidérgicos.

2.1 Injeções prévias de RX 821002 (antagonista de receptores adrenérgicos α_2) no NPBL, promoveram uma redução parcial, enquanto tratamento prévio com DOI

(agonista serotoninérgico) e naloxona (antagonista de receptores opióides) também no NPBL aboliu o efeito natriorexigênico decorrente da injeção de muscimol no mesmo núcleo.

2.2 Em relação à ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo baclofen bilateralmente injetado no NPBL, tratamento prévio com RX 821002 promoveu uma redução parcial, enquanto naloxona aboliu a ingestão de sódio induzida pelo baclofen. Injeções prévias do agonista serotoninérgico DOI não alteraram o efeito natriorexigênico do baclofen.

3. Mecanismos opióides no NPBL e comportamento ingestivo

3.1 Em ratos saciados e normovolêmicos, a ativação de mecanismos opióides no NPBL através da injeção bilateral de β -endorfina (agonista opióide) induziu ingestão de NaCl 0,3 M e de água de uma maneira temporalmente semelhante às ingestões promovidas pela ativação gabaérgica no NPBL, sendo estes efeitos abolidos após a administração prévia do antagonista opióide (naloxona).

3.2 Em ratos depletados de sódio por 24 h, naloxona injetada bilateralmente no NPBL foi capaz de reduzir a ingestão de NaCl 0,3 M.

3.3 β -endorfina injetada no NPBL não induziu ingestão de sacarose 2% (quando água e sacarose estiveram disponíveis para os animais), nem de água (quando apenas água esteve disponível para os animais) em ratos saciados.

CONCLUSÕES

1. Tanto a ativação de receptores GABA_A quanto GABA_B no NPBL induzem ingestão de solução hipertônica de NaCl em ratos saciados. Todavia, em animais depletados de sódio, a ativação inicial de receptores gabaérgicos promove uma inibição do comportamento ingestivo, enquanto que o efeito facilitatório tardio sobre a ingestão de sódio dependeria apenas da ativação de receptores GABA_A na condição experimental estudada.

2. Embora a ativação gabaérgica no NPBL promova uma facilitação da ingestão de NaCl 0,3 M, aparentemente não há uma participação tônica de mecanismos gabaérgicos na ingestão de NaCl 0,3 M induzida pela depleção de sódio por 24 h. Porém, haveria uma participação tônica dos receptores GABA_B, mas não GABA_A, no NPBL sobre o controle da ingestão de sódio em animais treinados a ingerirem sódio apenas 2 h por dia.

3. O efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL não seria secundário a uma redução na PAM nem a um aumento na excreção urinária, podendo ser um efeito direto do muscimol ou baclofen injetados no NPBL. Ademais, a ativação gabaérgica no NPBL parece não promover uma ativação generalizada do comportamento ingestivo, sendo que os efeitos do muscimol parecem ser mais específicos para o sódio. Já o efeito facilitatório do baclofen para ser mais evidente para a ingestão de sódio, enquanto o efeito inibitório parece afetar outros comportamentos ingestivos (ingestão de alimento e água) dependendo da condição fisiológica do animal. Além disso, a grande ingestão de água observada nos animais saciados seria secundária ao aumento da concentração de sódio decorrente da intensa ingestão de solução hipertônica de NaCl.

4. Baseando-se nos estudos imunohistoquímicos, pode-se concluir que:

4.1 em animais saciados que tiveram ou não acesso ao sódio, o aumento na atividade do NTSc independe do animal ingerir ou não sódio, embora este aumento possa estar sendo influenciado pelo aumento da PAM basal. Todavia não há mais uma redução na atividade do NPOMv quando os animais tiveram acesso ao sódio,

sugerindo que uma redução na atividade do NPOMv poderia ser importante para induzir a ingestão de sódio, porém quando os animais ingerem sódio, a atividade dessa área voltaria aos níveis basais, talvez com o intuito de limitar a ingestão.

4.2 Redução na atividade do NSO, RDa, RMna, RPn e RPa; bem como aumento na atividade do OSF, sugerem que estas áreas poderiam estar envolvidas em promover a ingestão de NaCl induzida por depleção de sódio; enquanto que o aumento na atividade do NPV, NSO, NMA e NPBM, bem como de neurônios ocitocinérgicos no NPV e NSO e serotoninérgicos na RPa, quando os animais tiveram acesso à solução hipertônica de sódio e água, sugerem que estas áreas poderiam participar da limitação do processo ingestivo, impedindo uma ingestão excessiva de sódio e/ou água.

4.3 Apesar de ingerirem sódio, o grupo de animais saciados tratados com muscimol não apresentou o aumento esperado na atividade de neurônios ocitocinérgicos no NSO e NPV e de neurônios serotoninérgicos na RPa, o que poderia ser um efeito do muscimol, que ao retardar a ativação dos mecanismos inibitórios ocitocinérgico e serotoninérgico poderia estar contribuindo para a ingestão de sódio.

5. O NTSc teria um papel inibitório, enquanto a região AV3V, teria um papel facilitatório no efeito natriorexigênico decorrente da ativação gabaérgica no NPBL.

6. Enquanto a ativação de mecanismos adrenérgicos α_2 participa parcialmente da ingestão de sódio induzida pela ativação gabaérgica no NPBL, a possível inibição de mecanismos serotoninérgicos estaria envolvida no efeito natriorexigênico decorrente da injeção de muscimol, mas não baclofen no NPBL, sugerindo que muscimol e baclofen podem afetar a atividade de vias similares ou não para induzir a ingestão de sódio.

7. A ativação gabaérgica no NPBL pode levar a ativação de mecanismos opióides no NPBL que poderiam ser a via final para a indução da ingestão de sódio.

8. Ativação de mecanismos opióides no NPBL induz ingestão de sódio em ratos saciados, enquanto que a inibição deste mecanismo no mesmo núcleo reduz a ingestão de sódio em ratos depletados de sódio, sugerindo a presença de um mecanismo opioidérgico tônico no controle da ingestão de sódio nesse protocolo.

BIBLIOGRAFIA

1. Abe, M, T Tokunaga, K Yamada e T Furukawa. Gamma-aminobutyric acid and taurine antagonize the central effects of angiotensin II and renin on the intake of water and salt and on blood pressure in rats. *Neuropharmacol.*, 27, p. 309-18, 1988.
2. Andrade, CAF, L B Oliveira, L A De Luca Jr., D S A Colombari, J V Menani. Interaction between α_2 – adrenergic and GABAergic mechanisms in the lateral parabrachial nucleus in the control of water and NaCl intake. *Abstract Viewer/Itinerary Planner*, Washington, DC: Society for Neuroscience, program no. 660.12, 2004a.
3. Andrade, CAF, S P Barbosa, L A De Luca, J V Menani. Activation of α_2 -adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. *Neurosci.*, 129, p. 25-34, 2004.
4. Anstrom, KK, H C Cromwell, T Markowski, D J Woodward. Effect of baclofen on alcohol and sucrose self-administration in rats. *Alcohol Clin Exp Res*, 27(6), p. 900-8, 2003.
5. Antunes-Rodrigues, J, S M McCann e W K Samson. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits salt intake in the rat. *Endocrinology*. 118, p. 8720-8724, 1986.
6. Arakawa, T e Y Okada. Excitatory and inhibitory action of GABA in synaptic transmission in slices of guinea pig superior colliculus. *Eur J Pharmacol.*, 158(3), p. 217-24, 1988.
7. Araki, T, H Kiyama, M Tohyama. The GABAA receptor gamma 1 subunit is expressed by distinct neuronal populations. *Mol. Brain Res.*, 15(1-2), p. 121-32, 1992.
8. Bagdy, E, I Kiraly, L G Jr Harsing. Reciprocal innervation between serotonergic and gabaergic neurons in raphe nuclei of the rat. *Neurochem. Res.*, 25(11), p. 1465-73, 2000.
9. Baird, JP, J B Travares e S P Travers. Parametric analysis of gastric distension responses in the parabrachial nucleus. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 281(5), p. R1568-80, 2001.
10. Barbosa, SP, J I F De Gobbi, L Zilioli, L A A Camargo, W A Saad, A Renzi, L A De Luca Jr. e J V Menani. Role of adrenergic pathways of the medial septal area in the water intake and pressor response to central angiotensin II and carbachol in rats. *Brain Res. Bullet.*, 37, p. 463-466, 1995.
11. Basso, AM e A E Kelley. Feeding induced by GABA(A) receptor stimulation within the nucleus accumbens shell: regional mapping and characterization of macronutrient and taste preference. *Behav. Neurosci.*, 113(2), p. 324-36, 1999.
12. Beato, M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56:335-344, 1989.

13. Bergevin, A, D Girardot, M J Bourque, L E Trudeau. Presynaptic mu-opioid receptors regulate a late step of the secretory process in rat ventral tegmental area GABAergic neurons. *Neuropharmacol.*, 42(8), p. 1065-78, 2002.
14. Berne, RM, M N Levy, B M Koeppen, B A Stanton. O rim: Controle da osmolalidade e do volume dos líquidos corporais. *Fisiologia*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 674-699, 2000.
15. Bianchi, C, D Rodi, S Marino, L Beani, A Siniscalchi. Dual effects of 5-HT₄ receptor activation on GABA release from guinea pig hippocampal slices. *Neuroreport*. 13(17), p. 2177-80, 2002.
16. Blackburn, RE, A D Demko, G E Hoffman, E M Stricker, J G Verbalis. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.*, 263(6Pt2), p. R:1347-53, 1992.
17. Blackburn, RE, W K Samson, R J Fulton, E M Stricker, J G Verbalis. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.*, 269(2Pt2), p. R245-51, 1995.
18. Blair, ML, R L Jaworski, A Want e D T Piekut. Parabrachial nucleus modulates cardiovascular responses to blood loss. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 280(4), p. R1141-8, 2001.
19. Bodnar, RJ, M J Glass e J E Koch. Analysis of central opioid receptor subtype antagonism of hypotonic and hypertonic saline intake in water-deprived rats. *Brain Res. Bull.*, 36(3), p. 293-300, 1995.
20. Bormann, J. Electrophysiology of GABA_A and GABA_B receptor subtypes. *Trends Neurosci.*, 11: 112-116, 1988.
21. Bowery, NG, A L Hudson e G W Price. GABA_A and GABA_B receptor binding site distribution in the rat central nervous system. *Neuroscience* 20, p. 365-383, 1987.
22. Bowery, NG. GABA_B receptors and their significance in mammalian pharmacology. *Trends Pharmacol. Sci.* 10, p. 401-407, 1989.
23. Brody, MJ e A K Johnson. Role of the anteroventral third ventricle region in fluid and electrolyte balance, arterial pressure regulation and hypertension. IN: *Frontiers in Neuroendocrinology*, vol 6, edited by L. Martini e W.F. Ganong, New York, Raven, p. 249-292, 1980.
24. Brown, DR e S G Holtzman. Suppression of drinking by naloxona in the rat: A further characterization. *Eur. J. Pharmacol.*, 69, p. 331-340, 1981.
25. Buggy, J e A K Johnson. Anteroventral third ventricle periventricular ablation: temporary adpsia and persisting thirst deficits. *Neurosci. Letters* 5, p. 177-182, 1977.

26. Buggy, J e S L Bealer,. Physiological regulation by the AV3V region. Circumventricular organs and body fluids, vol 1, in P. M. Gross (ed), CRC Press, Boca Raton, p. 171-190, 1987.
27. Callera, JC, L B Oliveira, S P Barbosa, D S A Colombari, L A Luca Jr., J V Menani. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. Behavioral Neuroscience, p.725 - 735, 2005.
28. Camargo, LA, W A Saad, A Renzi, L A De Luca Jr., J R Gonçalves, J V Menani. Hypothalamic lesions increase saline ingestion induced by injection of angiotensin II into AV3V in rats. Am. J. Physiol., 261(3Pt2), p. R647-51, 1991.
29. Carlson, SH, A Beitz, J W Osborn. Intra gastric hypertonic saline increases vasopressin and central Fos immunoreactivity in conscious rats. Am. J. Physiol. 272(3Pt2), p. R750-8, 1997.
30. Carlson, SH, J P Collister, J W Osborn. The area postrema modulates hypothalamic fos responses to intra gastric hypertonic saline in conscious rats. Am. J. Physiol. 275(6Pt2), p. R1921-7, 1998.
31. Celada, P, M V Puig, J M Casanovas, G Guillazo, F Artigas. Control of dorsal raphe serotonergic neurons by the medial prefrontal cortex: involvement of serotonin-1A, GABA(A), and glutamate receptors. J. Neurosci., 21(24), p. 9917-29, 2001.
32. Chen, L, W H Yung. Tonic activation of presynaptic GABA(B) receptors on rat pallidosubthalamic terminals. Acta Pharmacol. Sin. 26(1), p. 6-10, 2005.
33. Christie, MJ, R A North. Agonists at mu-opioid, M2-muscarinic and GABAB-receptors increase the same potassium conductance in rat lateral parabrachial neurons. Br. J. Pharmacol. 95(3), p. 896-902, 1988.
34. Ciriello, J, D Lawrence e Q J Pittman. Electrophysiological identification of neurons in the parabrachial nucleus projecting directly to the hypothalamus in the rat. Brain Res. 322, p. 388-392, 1984.
35. Colombari, DSA, J V Menani e A K Johnson. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. Am. J. Physiol. 271, p. R1470-R1476, 1996.
36. Colombari, DSA, W A Saad, L A A Camargo, A Renzi, L A De Luca Jr., E Colombari, J V Menani. AV3V lesion impairs responses induced by cholinergic activation of SFO in rats. Am. J. Physiol. 263, p. R1277-R1283, 1992.
37. Colombari, E, J V Menani, W T Talman. Commissural NTS contributes to pressor responses to glutamate injected into the medial NTS of awake rats. Am. J. Physiol., 270, p. R1220-R1225, 1996.

38. Colombari, E, W A Saad, L A A Camargo, A Renzi, L A De Luca Jr., J V Menani. AV3V lesion suppresses the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to cholinergic activation of the septal area in rats. *Brain Res.*, 572, p. 172-175, 1992a.
39. Contreras, R J, P W Stetson. Changes in salt intake after lesions of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. *Brain Res.*, 211, p. 355-366, 1981.
40. Cooper, S J e D B Gilbert. Naloxone suppresses fluid consumption in tests of choice between sodium chloride solutions and water in male and female water-deprived rats. *Psychopharmacology (Berlin)*, 84, p. 362-367, 1984.
41. Covian, M R, J Antunes-Rodrigues, C G Gentil, W A Saad, L A Camargo e C R Silva Neto. Central control of salt balance. In: *Neural integration of physiological mechanisms and behavior (Stevenson, J. A. F. Memorial Volume) Mogenson, G. S. e Calaresu, F. R. (eds) University of Toronto Press*, p. 267-282, 1975.
42. De Gobbi, J I F, L A De Luca Jr. e J V Menani. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. *Brain Res.*, 880, p. 131-138, 2000.
43. De Luca Jr., L A e J V Menani. Multifactorial control of water and saline intake: role of α_2 -adrenoceptors. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 30, p. 497-502, 1997.
44. De Luca Jr., L A e J V Menani. Preoptic periventricular tissue (AV3V): central cholinergic-induced hydromineral and cardiovascular responses and salt intake. *Rev. Brasil. Biol.* 56 (Supl: 1), p. 133-38, 1996.
45. De Luca Jr., L A, L A A Camargo, J V Menani, A Renzi e W A Saad. A possible dual role for central noradrenaline in the control of hydromineral fluid intake. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 4, p. 905-914, 1994.
46. De Luca Jr., L A, O Galaverna, J Schulkin, S Z Yao, A N Epstein. The anteroventral wall of the third ventricle and the angiotensinergic component of need-induced sodium intake in the rat. *Brain Res. Bull.*, 28, p. 73-87, 1992.
47. De Paula, P M, M A Sato, J V Menani e L A De Luca Jr. Effects of central α -adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. *Neurosc. Lett.* 214, p. 155-158, 1996.
48. Di Lorenzo, P M, S Monroe. Transfer of information about taste from the nucleus of the solitary tract to the parabrachial nucleus of the pons. *Brain Res.*, 763(2), p. 167-81, 1997.
49. Ebenezer, I S e A K Pringle. The effect of systemic administration of baclofen on food intake in rats. *Neuropharmacol.*, 31(1), p. 39-42, 1992.
50. Ebenezer, I S, A J Houston e T J Crook. Systemic administration of baclofen inhibits water intake in rats. *Gen. Pharmacol.*, 23, p. 375-9, 1992.

51. Ebenezer, IS. Baclofen pretreatment attenuates the suppressant effect of intraperitoneal administration of cholecystinin (CCK) on food intake in rats. *Brain Res. Bull.* 41(5), p. 269-71, 1996.
52. Ebenezer, IS. Intraperitoneal administration of baclofen increases consumption of both solid and liquid diets in rats. *Eur J Pharmacol.*, 273(1-2), p. 183-5, 1995.
53. Echo, JA, N Lamonte, T F Ackerman e R J Bodnar. Alterations in food intake elicited by GABA and opiod agonists and antagonists administered into the ventral tegmental area region of rats. *Physiology and Behavior.*, 76, p. 107-116, 2002.
54. Edwards, GL e A K Johnson. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 30)*, 261, p. R1039-R1044, 1991.
55. Edwards, GL e R C Ritter. Lateral parabrachial lesions attenuate ingestive effects of area postrema lesions. *Am. J. Physiol.*, 256(2Pt2), p. R306-12, 1989.
56. Edwards, GL, T G Beltz, J D Power e A K Johnson. Rapid-onset "need-free" sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. *Am. J. Physiol.*, 264, p. R1242-R1247, 1993.
57. Engelmann, M, P M Bull, C H Brown, R Landgraf, T F Horn, N Singewald, M Ludwig, C T Wotjak. GABA selectively controls the secretory activity of oxytocin neurons in the rat supraoptic nucleus. *Eur. J. Neurosci.*, 19(3), p. 601-8, 2004.
58. Felder, RB e S W Mifflin. Modulation of carotid sinus afferent input to nucleus tractus solitarius by parabrachial nucleus stimulation. *Circ. Res.*, 63(1), p. 35-49, 1988.
59. Ferrari, AC, L A A Camargo, W A Saad, A Renzi, L A De Luca Jr. e J V Menani. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibits water intake in rats. *Brain Res.*, 522, p. 125-130, 1990.
60. Ferrari, AC, L A A Camargo, W A Saad, A Renzi, L A De Luca Jr. e J V Menani. Role of α_1 - and α_2 -adrenoceptors of the lateral hypothalamus in the dipsogenic response to central angiotensin II in rats. *Brain Res.* 560: 291-296, 1991.
61. Fitts, DA, D S Tjepkes, R O Bright. Salt appetite and lesions of the ventral part of the ventral median preoptic nucleus. *Behav. Neurosci.*, 104, p. 818-827, 1990.
62. Fitts, DA, S N Thornton, A A Ruhf, D K Zierath, A K Johnson, R L Thunhorst. Effects of central oxytocin receptor blockade on water and saline intake, mean arterial pressure and c-fos expression in rats. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 285(6), p. R1331-9, 2003.

63. Fitzsimons, JT. Physiology and pathology of thirst and sodium appetite. In: *The Kidney: Physiology and Pathology*, DW Seldin and G Giebisch eds., New York, Raven Press, p. 885-901, 1985.
64. Fluharty, SJ e A N Epstein. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. *Behav. Neurosci.*, 97, p. 746-758, 1983.
65. Flynn, FW, H J Grill, G J Schwartz, R Norgren. Central gustatory lesions: I. Preference and taste reactivity tests. *Behav. Neurosci.*, 105 (6), p. 933-43, 1991a.
66. Flynn, FW, H J Grill, J Schulkin, R Norgren. Central gustatory lesions: II. Effects on sodium appetite, taste aversion learning, and feeding behaviors. *Behav. Neurosci.*, 105(6), p. 944-54, 1991.
67. Franchini, LF e L Vivas. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. *Am. J. Physiol.*, 276(4Pt2), p. R1180-7, 1999.
68. Franchini, LF, A K Johnson, J de Olmos, L Vivas. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 282(1), p. R:235-43, 2002.
69. Galaverna, O, L A De Luca Jr., J Schulkin, S Z Yao e A N Epstein. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. *Brain Res. Bull.*, 28, p. 89-98, 1991.
70. Galaverna, O, R J Seeley, K C Berridge, H J Grill, A N Epstein, J Schulkin. Lesions of the central nucleus of the amygdala. I. Effects on taste reactivity, taste aversion learning and sodium appetite. *Behav. Brain Res.*, 59(1-2), p. 11-7, 1993.
71. Ganaraj, B, P S Jeganathan. Involvement of basolateral nucleus & central nucleus of amygdala in the regulation of ingestive behaviour. *Indian J. Med. Res.*, 108, p. 98-103, 1998.
72. Gentil, CG, J A Rodrigues, A Nigro-Vilar e M R Covian. Role of amygdaloid complex in sodium chloride and water intake in the rat. *Physiology and Behavior*, vol.3, p. 981-985, 1968.
73. Gonçalves, PC, M B Alves, J E N Silveira, W A Saad, L A A Camargo, A Renzi, L A De Luca Jr., J V Menani. Effect of AV3V lesion on the cardiovascular, fluid and electrolytic changes induced by activation of the lateral preoptic area. *Physiol. Behav.*, 52:173-177, 1992.
74. Goodman e Gilman, Chapter 23: Opioid Analgesics and antagonists (Terry Reisine and Gavrill Pasternak) in: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 8th Edition, Edit. McGraw-Hill, Inc, USA, p. 521-555, 1996.

75. Gosnell,BA, J E Morley, A S Levine. Opioid-induced feeding: localization of sensitive brain sites. *Brain Res.* 369(1-2):177-84, 1986.
76. Grabauskas,G e R M Bradley. Synaptic interactions due to convergent input from gustatory afferent fibers in the rostral nucleus of the solitary tract. *J. Neurophysiol.*, 76(5), p. 2919-27, 1996.
77. Graham,JC, G E Hoffman, A F Sved. c-Fos expression in brain in response to hypotension and hypertension in conscious rats. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 55(1-2), p. 92-104, 1995.
78. Guthmann,A, J M Fritschy, O P Ottersen, R Torp e H Herbert. GABA, GABA transporters, GABA(A) receptor subunits, and GAD mRNAs in the rat parabrachial and Kolliker-Fuse nuclei. *J. Comp. Neurol.*, 400, p. 229-43, 1998.
79. Hahner,L, S McQuilkin, R A Harris. Cerebellar GABAB receptors modulate function of GABAA receptors. *FASEB J.*, 5(10), p. 2466-72, 1991.
80. Han,SK, W Chong, L H Li, I S Lee, K Murase, P D Ryu. Noradrenaline excites and inhibits GABAergic transmission in parvocellular neurons of rat hypothalamic paraventricular nucleus. *J Neurophysiol.*, 87(5), p. 2287-96, 2002.
81. Harvey,VL, GJ Stephens. Mechanism of GABA receptor-mediated inhibition of spontaneous GABA release onto cerebellar Purkinje cell. *Eur. J. Neurosci.*, 20(3), p. 684-700, 2004.
82. Hashimoto,T e K Kuriyama. GABAA receptor-mediated K(+)-evoked GABA release from globus pallidus-analysis using microdialysis. *Neurochem. Int.*, 30(3), p. 247-52, 1997.
83. Hayward,LF, R B Felder,. Peripheral chemoreceptor inputs to the parabrachial nucleus of the rat. *AM. J. Physiol.*, 268(3Pt2), p. R707-14, 1995.
84. Hayward,LF, R B Felder. Lateral parabrachial nucleus modulates baroreflex regulation of sympathetic nerve activity. *Am. J. Physiol.*, 274(5Pt2), p. R1274-82, 1998.
85. Herbert,H, M M Moga e C B Saper. Connections of parabrachial nucleus to the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. *J. Comp. Neurol.*, 293, p. 540-580, 1990.
86. Herrera,DG e H A Robertson. Activation of c-fos in the brain. *Prog. in Neurob.*, 50, p. 83-107, 1996.
87. Higgs,S e S J Cooper. Hyperphagia induced by direct administration of midazolam into the parabrachial nucleus of the rat. *Eur J Pharmacol.*, 313(1-2), p. 1-9, 1996.

88. Hill, C, K Lapanowski, J C Dunbar. The effects of beta-endorphin (beta-END) on cardiovascular and behavioral dynamics in conscious rats. *Brain Res. Bull.*, 59(1), p. 29-34, 2002.
89. Hjelmstad, G O e H L Fields. Kappa opioid receptor activation in the nucleus accumbens inhibits glutamate and GABA release through different mechanisms. *J. Neurophysiol.*, 89(5), p. 2389-95, 2003.
90. Hochstenbach, S L, J Ciriello. Effect of forebrain circumventricular organs on c-fos expression in the central nervous system to plasma hypernatremia. *Brain Res.*, 713(1-2), p. 17-28, 1996.
91. Hochstenbach, S L, J Ciriello. Medullary pathways mediating depressor responses from Na(+)-sensitive sites in nucleus of the solitary tract. *Am. J. Physiol.*, 272 (1Pt2), p. R126-33, 1997.
92. Hochstenbach, S L, L P Solano-Flores, J Ciriello. Fos induction in brainstem neurons by intravenous hypertonic saline in the conscious rat. *Neurosci. Lett.*, 158(2), p. 225-8, 1993.
93. Hodge, C W, M Haraguchi, A M Chappelle, H H Samson. Effects of ventral tegmental microinjections of the GABAA agonist muscimol on self-administration of ethanol and sucrose. *Pharmacol Biochem Behav.*, 53(4), p. 971-7, 1996.
94. Houpt, T A, G P Smith, T H Joh, S P Frankmann. C-fos-like immunoreactivity in the subfornical organ and nucleus of solitary tract following salt intake by sodium-depleted rats. *Physiol. Behav.*, 63(4), p. 505-10, 1998.
95. Houston, A J, J C Wong e I S Ebenezer. Effects of subcutaneous administration of the gamma-aminobutyric acid(A) receptor agonist muscimol on water intake in water-deprived rats. *Physiol. Behav.*, 77, p. 445-50, 2002.
96. Hyde, T M, R R Miselis. Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance. *Am. J. Physiol.*, 247, p. R173-R182, 1984.
97. Izumi, H. Participation of opioid peptide (beta-endorphin) and norepinephrine in the control of compound 48/80-induced hypovolemic thirst in the rats. *Gen. Pharmacol.*, 22(5), p. 825-9, 1991.
98. Jenks, B G, H P de Koning, K Valentijn, E W Roubos. Dual action of GABAA receptors in the secretory process of melanotrophs of *Xenopus laevis*. *Neuroendocrinology*, 58(1), p. 80-5, 1993.
99. Jhamandas, J H, K H Harris. Influence of nucleus tractus solitarius stimulation and baroreceptor activation on rat parabrachial neurons. *Brain Res. Bull.*, 28(4), p. 565-71, 1992.
100. Jhamandas, J H, T Petrov, K H Harris, T Vu e T L Krukoff. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat:

- electrophysiological and anatomical observations. *Brain Res. Bull.*, 39, p. 115-126, 1996.
101. Johnson,AK e GL Edwards. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. IN: *Current topics in neuroendocrinology*, vol.10, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 149-190, 1990.
102. Johnson,AK, P M Gross. Sensory circumventricular organs and brain homeostatic pathways. *FASEB J.* 7, p. 678-686, 1993.
103. Johnson,AK. The periventricular anteroventral third ventricle (AV3V): its relationship with the subfornical organ and neural system involved in maintaining body fluid homeostasis. *Brain Res.*, 15, p. 595-601, 1985.
104. Kaneda,K, H Kita. Synaptically released GABA activates both pre- and postsynaptic GABA(B) receptors in the rat globus pallidus. *J. Neurophysiol.*, 94(2), p. 1104-14, 2005.
105. Kardos,J e I Kovacs. Binding interaction of gamma aminobutyric acid A and B receptors in cell culture. *Neuroreport.*, 2(9), p. 541-3, 1991.
106. Kawamata,T, K Omote, M Toriyable, M Kawamata, A Namiki. Intracerebroventricular morphine produces antinociception by evoking gamma-aminobutyric acid release through activation of 5-hydroxytryptamine 3 receptors in the spinal cord. *Anesthesiology*, 96(5), p. 1175-82, 2002.
107. Kendrick,KM, M R Hinton, B A Baldwin. GABA release in the zona incerta of the sheep in response to the sight and ingestion of food and salt. *Brain Res.*, 550(1), p. 165-8, 1991.
108. Kobashi,M, H Ichikawa, T Sugimoto, A Adachi. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. *Neurosci. Lett.*, 158(1), p. 47-50, 1993.
109. Kobashi,M, R M Bradley. Effects of GABA on neurons of the gustatory and visceral zones of the parabrachial nucleus in rats. *Brain Res.*, 799(2), p. 323-8, 1998.
110. Krukoff,TL, K H Harris e J H Jhamandas. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer *Phaseolus vulgaris* leucoagglutinin. *Brain Res. Bull.*, 30, p. 163-172, 1993.
111. Kuta,CC, H U Bryant, J E Zabik, G K Yim. Stress, endogenous opioids and salt intake. *Appetite*, 5(1), p. 53-60, 1984.
112. Lee,MD, V J Aloyo, S J Fluharty, K J Simansky. Infusion of the serotonin1B (5-HT1B) agonist CP-93,129 into the parabrachial nucleus potently and selectively reduces food intake in rats. *Psychopharmacology (Berl)*, 136(3), p. 304-7, 1998.

113. Lei,S, C J McBain. GABA B receptor modulation of excitatory and inhibitory synaptic transmission onto rat CA3 hippocampal interneurons. *J. Physiol.*, 546(Pt2), p. 439-53, 2003.
114. Len,WB e J Y Chan. GABAergic neurotransmission at the nucleus tractus solitarii in the suppression of the reflex bradycardia by parabrachial nucleus. *Synapse*, 42(1), p. 27-39, 2001.
115. Li,Y e J E Stern. Activation of postsynaptic GABAB receptors modulate the firing activity of supraoptic oxytocin and vasopressin neurones: role of calcium channels. *J. Neuroendocrinol.*, 16(2), p. 119-30, 2004.
116. Li,YW, R A Dampney. Clonidine and rilmenidine suppress hypotension-induced Fos expression in the lower brainstem of the conscious rabbit. *Neurosci.*, 66(2), p. 391-402, 1995.
117. Lima,HR, H R Cavalcante-Lima, P L Cedraz-Mercez, R H Costa-E-Sousa, E L Olivares, D Jr Badaue-Passos, M A Medeiros, W S Cortes, L C Reis. Brain serotonin depletion enhances the sodium appetite induced by sodium depletion or beta-adrenergic stimulation. *An Acad. Bras. Cienc.*, 76(1), p. 85-92, 2004.
118. Machado,BH, H Mauad, D A Chianca Jr., A S Haibara, e E Colombari. Autonomic processing of the cardiovascular reflexes in the nucleus tractus solitarii. *Brazilian Journal of Medical and Biological Res.*, 30, p. 533-543, 1997.
119. Maley,BE, W M Panneton. Enkephalin-immunoreactive neurons in the nucleus tractus solitarius project to the parabrachial nucleus of the cat. *Brain Res.*, 442(2), p. 340-4, 1988.
120. Mangiapane,ML e J B Simpson. Subfornical organ: Forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. *Am. J. Physiol.*, 239, p. R382-R389, 1980.
121. Marshall,JM. Peripheral chemoreceptors and cardiovascular regulation. *Physiological Reviews*, 74, p. 543-594, 1994.
122. Masubuchi,Y, K Tsukamoto, O Isogai, Y Yajimi, S Ito, S Saito, T Uchiyama. Effect of a high-salt diet on gamma-aminobutyric acid-mediated responses in the nucleus tractus solitarius of Sprague-Dawley rats. *Brain Res. Bull.*, 64(3), p. 221-6, 2004.
123. McKinley,MJ, D A Denton, J F Nelson e R S Weisenger. Dehydration induces sodium depletion in rats, rabbits, and sheep. *Am. J. Physiol.*, 245 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 14), p. R287-R292, 1983.
124. Meeley,MP, M D Underwood, W T Talman e D J Reis. Content and in vitro release of endogenous amino acids in the area of the solitary tract of the rat. *J. Neurochem.*, 53, p. 1807-1817, 1989.

125. Menani, JV e A K Johnson. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. *Am. J. Physiol.*, 275, p. R1431-R1437, 1998.
126. Menani, JV e A K Johnson. Lateral parabrachial serotonergic mechanism: angiotensin-induced pressor and drinking response. *Am. J. Physiol.*, 269, p. R1044-R1049, 1995.
127. Menani, JV, L A De Luca Jr. e A K Johnson. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. *Am. J. Physiol.*, 274, p. R555-R560, 1998.
128. Menani, JV, L A De Luca Jr., R L Thunhorst, e A K Johnson. Hindbrain serotonin and rapid induction of sodium appetite. *Am. J. Physiol.*, 279, p. R126-R131, 2000.
129. Menani, JV, R L Thunhorst e A K Johnson. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.*, 270, p. R162-R168, 1996.
130. Menani, JV, T G Beltz e A K Johnson. Effects of lidocaine injections into the lateral parabrachial nucleus on dipsogenic and pressor responses to central angiotensin II in rats. *Brain Res.*, 695, p. 250-252, 1995.
131. Menani, JV, W A Saad, L A Camargo, A Renzi, L A De Luca Jr., E Colombari. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. *Neurosci. Lett.*, 113(3), p. 339-44, 1990.
132. Milner, TA, T H Joh, R J Miller, V M Pickel. Substance P, neurotensin, enkephalin and catecholamine-synthesizing enzymes: light microscope localizations compared with autoradiographic label in solitary efferents to the rat parabrachial region. *J. Comp. Neurol.*, 226(3), p. 434-47, 1984.
133. Minano, FJ, M S Meneres Sancho, M Sancibrian, P Salinas, R D Myers. GABAA receptors in the amygdala: role in feeding in fasted and satiated rats. *Brain Res.*, 586(1), p. 104-10, 1992.
134. Morgan, JI e T Curran. Stimulus-transcription coupling in neurons: role of cellular immediate-early genes. *Trends Neurosci.*, 12, p. 459-462, 1989.
135. Mosqueda-Garcia, R. Central Autonomic Regulation, in: *Primer on the Autonomic Nervous System*, Academic Press Inc., p. 3-12, 1996.
136. Murphy, AZ, M Ennis, M T Shipley, M M Behbehani. Directionally specific changes in arterial pressure induce differential patterns of fos expression in discrete areas of the rat brainstem: a double-labeling study for Fos and catecholamines. *J. Comp. Neurol.*, 349(1), p. 36-50, 1994.

137. Nitabach,MN, J Schulkin e A N Epstein. The medial amygdala is part of a mineralocorticoid-sensitive circuit controlling NaCl intake in the rat. *Behavioural Brain Research*, 35, p. 127-134, 1989.
138. Ohman,LE e A K Johnson. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. *Am. J. Physiol. (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 25)* 256, p. R264-R269, 1989.
139. Ohman,LE e A K Johnson. Role of the lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake induced by right atrial stretch. *Brain Res.*, 695, p. 275-278, 1995.
140. Otake,K, K Ezure, J Lipski, R B Wong She. Projections from the commissural subnucleus of the nucleus of the solitary tract: an anterograde tracing study in the cat. *J. Comp. Neurol.*, 324(3), p. 365-78, 1992.
141. Papas,S, A V Ferguson. Effects of parabrachial stimulation on angiotensin and blood pressure sensitive area postrema neurons. *Brain Res. Bull.*, 26(2), p. 269-77, 1991.
142. Paton,JF, L Silva-Carvalho, C S Thompson, K M Spyer. Nucleus tractus solitarius as mediator of evoked parabrachial cardiovascular responses in the decerebrate rabbit. *J. Physiol.*, 428, p. 693-705, 1990.
143. Rang,HP, M M Dale e J M Ritter. Capítulo 9: Peptídeos mediadores in: *Farmacologia*, 3ª Edição, Edit. Guanabara Koogan SA, RJ, Brasil, p. 155-7, 1997.
144. Rigatto,K, R Puryear, I Bernatova, M Morris. Salt appetite and the renin-angiotensin: effect of oxytocin deficiency. *Hypertension*, 42(4), p. 793-7, 2003.
145. Rocha,MJ, H Herbert. c-fos expression in the lateral parabrachial nucleus following cardiovascular and blood volume changes. *J. Hirnforsch.*, 37(3), p. 389-97, 1996.
146. Rowland,N. Comparison of the suppression by naloxona of water intake induced in rats by hyperosmolarity, hipovolemia and angiotensin. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 16, p. 87-91, 1982.
147. Rowland,NE, MJ Fregly, L Han e G Smith. Expression of Fos in rat brain in relation to sodium appetite: furosemide and cerebroventricular renin. *Brain Res.*, 728, p. 90-96, 1996.
148. Sakai,RR, S Nicolaidis, A N Epstein. Salt appetite is suppressed by interference with angiotensin and aldosterone. *Am. J. Physiol.*, 251, p. R762-R:768, 1986.
149. Sakamaki,K, M Nomura, K Yamato, J Tanaka. GABA-mediated attenuation of noradrenaline release in the rat median preoptic area caused by intravenous injection of metaraminol. *Auton. Neurosci.*, 111(1), p. 7-14, 2004.

150. Sakamaki,K, M Nomura, S Hatakenaka, H Miyakubo, J Tanaka. GABAergic modulation of noradrenaline release in the medium preoptic nucleus area in the rat. *Neurosci. Lett.*, 342(1-2), p. 77-80, 2003.
151. Sanger,DJ e P S McCarthy. Differential effects of morphine on food and water intake in food deprived and freely feeding rats. *Psychopharmacol. (Berl)*, 72(1), p. 103-6, 1980.
152. Sapru,HN. Chapter 21: Transmitter/receptor mechanisms in cardiovascular control by the NTS: excitatory amino acids, acetylcholine and substance P, in: *Nucleus of the solitary tract.*, I.R.A. Barroco (Ed), CRC Press Boca Raton, p. 267-281, 1994.
153. Sato,MA, A M Sugawara, J V Menani, L A Jr De Luca. Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. *Regul. Pept.*, 69(3), p. 137-42, 1997.
154. Sato,MA, J V Menani, O U Lopes, E Colombari. Commissural NTS lesions and cardiovascular responses in aortic baroreceptor-denervated rats. *Hypertension*, 34, p. 739-743, 1999.
155. Sato,MA, J V Menani, O U Lopes, E Colombari. Enhanced pressor response to carotid occlusion in commNTS lesioned rats: possible efferent mechanisms. *Am. J. Physiol.*, 278,p. R1258-R1266, 2000.
156. Schreihofer,AM, E M Stricker, A F Sved,. Nucleus of the solitary tract lesions enhance drinking, but not vasopressin release, induced by angiotensin. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, 279(1), p. R239-47, 2000.
157. Schulkin,J e S J Fluharty. Further studies on salt appetite following lateral hypothalamic lesions: Effects of preoperative alimentary experiences. *Behav. Neurosci.*, 99, 929-935, 1985.
158. Schulkin,J, J Marini, e A N Epstein. A role for the medial region of the amygdala in mineralocorticoid-induced salt hunger. *Behav. Neurosci.*, 103,178-185, 1989.
159. Sclafani,A, A V Azzara, K Touzani, P S Grigson, R Norgren. Parabrachial nucleus lesions block taste and attenuate flavor preference and aversion conditioning in rats. *Behav. Neurosci.*, 115(4), p. 920-33, 2001.
160. Seeley,RJ; O Galaverna, J Schulkin, A N Epstein, H J Grill. Lesions of the central nucleus of amygdala. II. Effects on intraoral NaCl intake. *Behav Brain Res.*, 59(1-2), p. 19-25, 1993.
161. Shapiro,RE e R R Miselis. The central neural connections of the area postrema of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 234, p. 344-364, 1985.

162. Shen,PJ, T C D Burazin e Gundlach. Noradrenergic regulation of immediate early gene expression in rat forebrain: differential effects of α_1 and α_2 -adrenoceptor drugs. *Mol. Brain Res.*, 28, p. 222-230, 1995.
163. Sheng,M e M E Greenberg. The regulation and function of c-fos and other immediate early genes in the nervous system. *Neuron*, 4, p. 477-485, 1990.
164. Si,JQ, Z W Li, H Z Hu, X P Zhou, B C Guan. Inhibitory effect of baclofen on GABA-induced depolarization and GABA-activated current in primary sensory neurons. *Neurosci.*, 81(3), p. 821-7, 1997.
165. Simansky,KJ e D M Nicklous. Parabrachial infusion of D-fenfluramine reduces food intake. Blockade by the 5-HT(1B) antagonist SB-216641. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 71(4), p. 681-90, 2002.
166. Simpson,JB e A Routttenberg. Subfornical organ: Site of drinking elicitation by angiotensin. *Science*, 181, p. 1172-1175, 1973.
167. Sivy,SM, G A Rockwood, e L D Reid. Naloxone and angiotensin II-induced drinking. *Bull. Psychon. Soc.*, 17, p. 273-274, 1981.
168. Soderpalm,AH e K C Berridge. Food intake after diazepam, morphine or muscimol: microinjections in the nucleus accumbens shell. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 66(2), p. 429-34, 2000.
169. Stratford,TR e A E Kelley. GABA in the nucleus accumbens shell participates in the central regulation of feeding behavior. *J. Neurosci.*, 17, 4434-40, 1997.
170. Streefland,C, E Farkas, F W Maes, B Bohus. C-fos expression in the brainstem after voluntary ingestion of sucrose in the rat. *Neurobiology (Bp)*, 4(1-2), p. 85-102, 1996.
171. Stricker,EM and J G Verbalis,. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. *Regul. Pept.*, 66(1-2), p. 83-5, 1996.
172. Summy-Long,JY, L C Keil, K Deen, L Rosella, W B Severs. Endogenous opioid peptide inhibition of the central actions of angiotensin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 217(3), p. 619-29, 1981.
173. Tanaka,J, N Mashiko, A Kawakami, A Ushigome, M Nomura. GABAergic systems in the nucleus tractus solitarius regulate noradrenaline release in the subfornical organ area in the rat. *Auton. Neurosci.*, 100(1-2), p. 58-65, 2002.
174. Ter Horst,G J e C Streefland. Chapter 6: Ascending projections of the solitary tract nucleus, in: *Nucleus of the solitary tract.*, I.R.A. Barroco (Ed), CRC Press Boca Raton, p. 93-103, 1994.

175. Thunhorst,RL e A K Johnson. Renin angiotensin, arterial blood pressure and salt appetite in rats. *Am. J. Physiol.*, 266, p. R458-R465, 1994.
176. Thunhorst,RL, S J Lewis e A K Johnson. Effects of sinoaortic baroreceptor denervation on depletion-induced salt appetite. *Am. J. Physiol.*, 267, p. R1043-R1049, 1994.
177. Tomaszewska-Zaremba,D, F Przekop. Effects of GABAB receptor modulation on gonadotropin-releasing hormone and beta-endorphin release, and on catecholaminergic activity in the ventromedial hypothalamus-infundibular nucleus region of anoestrous ewes. *J. Neuroendocrinol.*, 17(1), p. 49-56, 2005.
178. Trifunovic,R e S Reilly. Medial versus lateral parabrachial nucleus lesions in the rat: effects on cholecystokinin- and D-fenfluramine-induced anorexia. *Brain Res.*, 115(4), p. 920-33, 2001.
179. Tsay,SY, D Caristedt-Duke, N L Weigel, K Dahlman, J A Gustaffsson, M J Tsay e B W O'Malley. Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell*, 55:361-369, 1988.
180. Unger,T, F Bles, D Ganten, R E Lang, R Rettig e N A Schwab. Gabaergic stimulation inhibits central actions of angiotensin II: pressor responses, drinking and release of vasopressin. *Eur. J. Pharmacol.*, 90, p. 1-9, 1983.
181. Ushigome,A, M Nomura, J Tanaka. Modulation of noradrenaline release in the median preoptic area by GABAergic inputs from the organum vasculosum of the lamina terminalis in the rat. *Neurochem. Int.*, 44(3), p. 139-44, 2004.
182. Valladão,AS, W A Saad, L A A Camargo, A Renzi, L A De Luca Jr, J V Menani. AV3V lesion reduces the pressor, dipsogenic and natriuretic responses to ventromedial hypothalamus activation. *Brain Res. Bull.*, 28, p. 909-914, 1992.
183. Verbalis,JG, R E Blackburn, G E Hoffman, E M Stricker. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 395, p. 209-25, 1995.
184. Vivas,L e E Chiaraviglio. The reversible lidocaine-induced lesion of the tissue surrounding the anterior ventral wall of the third ventricle on drinkink in rats. *Behav. Neurosci. Biol.*, 57, p. 124-130, 1992.
185. Ward,DG. Stimulation of the parabrachial nuclei with monosodium glutamate increases arterial pressure. *Brain Res.*, 462, p. 383-390, 1988.

186. Watson,WE. The effect of removing area postrema on the sodium and potassium balances and consumptions in the rat. *Brain Res.*, 359, p. 224-232, 1985
187. Weisinger,RS, D A Denton, M J McKinley e J F Nelson. Dehydration-induced sodium appetite in rats. *Physiol. Behav.* 34(1), p. 45-50, 1985.
188. Weiss,ML, K E Moe, A L Epstein. Interference with central actions of angiotensin II suppresses sodium appetite. *Am. J. Physiol.*, 250 (Regulatory Integrative Comp. Physiol. 19), p. R250-R259; 1986.
189. Wilson,JD, D M Nicklous, V J Aloyo, K J Simansky. An orexigenic role for mu-opioid receptors in the lateral parabrachial nucleus. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 285(5), p. R1055-65, 2003.
190. Wirtshafter,D, T R Stratford, M R Pitzer. Studies on the behavioral activation produced by stimulation of GABAB receptors in the median raphe nucleus. *Behav. Brain Res.*, 59(1-2), p. 83-93, 1993.
191. Wolf,G. Hypothalamic regulation of sodium intake: Relations to preoptic and tegmental function. *Am. J. Physiol.*, 213, p. 1433-1438, 1967.
192. Xia,Y., G G Haddad. Ontogeny and distribution of opioid receptors in the rat brainstem. *Brain Res.*, 549(2), p. 181-93, 1991.
193. Xie,Q, L Li, S Kawada. Hypotension after coronary arterial occlusion induces regional expression of c-fos protein in the rat brain. *Ann. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 6(5), p. 319-25, 2000.
194. Xu,Z, J Herbert. Regional suppression by lesions in the anterior third ventricle of c-fos expression induced by either angiotensin II or hypertonic saline. *Neurosc.*, 67(1), p. 135-47, 1995.
195. Yada,MM, P M De Paula, J V Menani e L A De Luca Jr. Central α -adrenergic agonists and need-induced 3% NaCl and water intake. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 57, p. 137-143,1997b.
196. Yada,MM, P M De Paula, J V Menani, A Renzi, L A A Camargo, W A Saad e L A De Luca Jr. Receptor-mediated effects of clonidine on need-induced 3% NaCl and water intake. *Brain Res. Bull.*, 42, p. 205-209, 1997a.
197. Yamamoto,T e K Sawa. Comparison of c-fos-like immunoreactivity in the brainstem following intraoral and intragastric infusions of chemical solutions in rats. *Brain Res.*, 866(1-2), p. 144-51, 2000.
198. Yang,K, H Furue, E Kumamoto, Y X Dong, M Yoshimura. Pre- and postsynaptic inhibition mediated by GABA(B) receptors in rat ventrolateral periaqueductal gray neurons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 302(2), p. 233-7, 2003.

199. Yu, Wei-Zhen e R J Bodnar. Interactions between angiotensin II and delta opioid receptor subtype agonists upon water intake in rats. *Peptides*, vol. 18, no.2, p. 241-245, 1997.
200. Zardetto-Smith,AM, T G Beltz, A K Johnson. Role of central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. *Brain Res.*, 645(1-2), p. 123-34, 1994.
201. Zarrindast,MR e Y Oveissi. GABAA and GABAB receptor sites involvement in a rat thermoregulation. *Gen. Pharmacol.*, 19(2), p. 223-6, 1988.
202. Zarrindast,MR, T Hosseini-Nia, S Allah-Maddadi. Food intake suppressant effect of baclofen in rats. *Gen. Pharmacol.*, 20(5), p. 701-3, 1989.
203. Zhang,D, A N Epstein e Schulkin. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. *Brain Research* 600, p. 20-26, 1993.
204. Zhang,J e S W Mifflin. Receptor subtype specific effects of GABA agonists on neurons receiving aortic depressor nerve inputs within the nucleus of the solitary tract. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 73(2-3), p. 170-81, 1998.
205. Zittel,TT, J Glatzle, M E Kreis, M Starlinger, M Eichner, H E Raybould, H D Becker, E Jehle. C. C-fos protein expression in the nucleus of the solitary tract correlates with cholecystokinin dose injected and food intake in rats. *Brain Res.*, 846(1), p. 1-11, 1999.
206. Znamensky,V, J A Echo, N Lamonte, G Christian, A Ragnauth e R J Bodnar. GABA receptor subtype antagonists differentially alter opioid-induced feeding in the Shell region of the nucleus accumbens. *Brain Res.* 906:84-91, 2001.