

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PIPGCF UFSCar/UNESP**

**Controle da ingestão de água e sódio pelos mecanismos adrenérgicos do núcleo
parabraquial lateral**

Silvia Gasparini

SÃO CARLOS/ARARAQUARA

2013

**PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
PIPGCF UFSCar/UNESP**

**Controle da ingestão de água e sódio pelos mecanismos adrenérgicos do núcleo
parabraquial lateral**

Silvia Gasparini

**Tese de Doutorado apresentada no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas PIPGCF, associação ampla
UFSCar/UNESP, como parte dos requisitos
para a obtenção do Título de Doutor em
Ciências, área de Concentração: Fisiologia.
Orientador: Prof. Dr. José Vanderlei
Menani**

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

G249ci

Gasparini, Silvia.

Controle da ingestão de água e sódio pelos mecanismos adrenérgicos do núcleo parabraquial lateral / Silvia Gasparini. -- São Carlos : UFSCar, 2013.
116 f.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2013.

1. Fisiologia. 2. Apetite ao sódio. 3. Noradrenalina. 4. Pressão arterial. I. Título.

CDD: 612 (20ª)

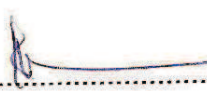
Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências
Fisiológicas
Associação Ampla UFSCar/UNESP

Folha de Aprovação

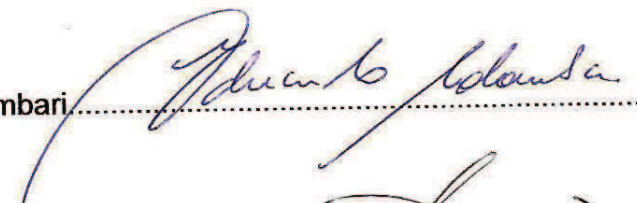
Tese de Doutorado de Silvia Gasparini

Dia 17/05/2013

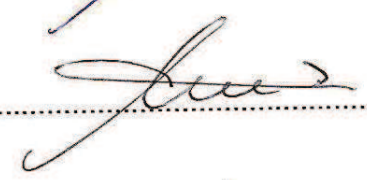
Prof. Dr. José Vanderlei Menani.....



Prof. Dr. Eduardo Colombari.....



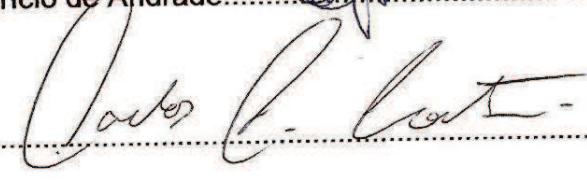
Prof. Dr. Thiago dos Santos Moreira.....



Profª. Drª. Carina Aparecida Fabrício de Andrade.....



Prof. Dr. Carlos Cesar Crestani.....



À MINHA MÃE

GRACIA

E MINHAS IRMÃS

CAROLINA E ELISA

Agradeço pelo apoio e todo amor sempre.

Agradecimentos

Ao Professor Dr. José Vanderlei pela orientação, dedicação e apoio a este trabalho.

A todo corpo docente do Departamento de Fisiologia e Patologia da Faculdade de Odontologia de Araraquara – UNESP- pela contribuição no trabalho e pelos conhecimentos que pude adquirir com os professores.

Ao Professor Dr. Derek Daniels pela orientação no exterior e pela oportunidade de aprendizado de novas metodologias e da língua inglesa.

À Universidade Estadual de Nova York, em Buffalo por ter me recebido de forma agradável e ter me permitido realizar experimentos em seu estabelecimento.

Aos funcionários Adriano, Ana, Reginaldo, Silvana, Silvia e Silas pela dedicação e atenção no dia a dia do laboratório.

Aos alunos pós-graduandos e estagiários pelo carinho e amizade. Às companheiras de república pelo apoio, paciência e amizade.

À família Marshall e aos amigos que fiz em Buffalo, NY, por terem me ajudado desde o primeiro dia em que cheguei à cidade.

Em especial, à minha mãe que me apoio e me deu a oportunidade de concluir meus estudos. Às minhas irmãs que sempre me apoiaram em todos os momentos. A Marcell Gameiro pelo companheirismo e força para seguir sempre em frente. Aos meus amigos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento FAPESP, CAPES e CNPq sem os quais muito deste trabalho não seria concretizado. Especialmente à FAPESP (Processo 2010/09607-7) e CNPq, pela concessão da bolsa.

Resumo

A ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções bilaterais de noradrenalina no núcleo parabraquial lateral (NPBL) produz um grande aumento da ingestão de NaCl 1,8% em ratos tratados com o diurético furosemida (FURO) combinado com doses baixas do inibidor da enzima conversora de angiotensina captopril (CAP) subcutaneamente (s.c.). Além disso, noradrenalina injetada no NPBL aumenta a pressão arterial e diminui a ingestão de água. No presente estudo, um dos objetivos foi investigar os mecanismos neurais ativados pela noradrenalina injetada no NPBL para produzir resposta pressora e a influência da resposta pressora produzida por noradrenalina injetada no NPBL na ingestão de água e de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP. Ratos Holtzman com cânulas guia de aço inoxidável implantadas bilateralmente no NPBL foram utilizados. Injeções de noradrenalina (40 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP ($12,2 \pm 3,5$, vs., salina: $4,2 \pm 0,8$ ml/180 min), reduziram a ingestão de água nos primeiros 90 minutos do teste ($10,5 \pm 0,9$ vs., salina $7 \pm 1,5$ ml/90 min) e aumentaram fortemente a pressão arterial (50 ± 7 , vs. salina: 1 ± 1 mmHg). Resultados do presente trabalho também mostraram que injeções unilaterais ou bilaterais (20 nmol/0,2 μ l) de noradrenalina no NPBL ou fora dessa área causaram uma potente resposta pressora (43 ± 6 ; 41 ± 7 respectivamente vs., salina: 3 ± 3 mmHg) e bradicardia (-51 ± 12 ; -82 ± 15 respectivamente vs., salina 6 ± 4 bpm), sugerindo que as respostas pressoras da noradrenalina não dependem de injeções especificamente no NPBL. O bloqueio de receptores adrenérgicos α_1 com prazosin injetado intraperitonealmente (i.p.) aboliu a resposta pressora (9 ± 4 vs., salina: 1 ± 1 mmHg) e aumentou a ingestão de água (17 ± 2 ml/180 min) e de NaCl 1,8% ($21,8 \pm 3,8$ ml/180), respectivamente, em ratos tratados com FURO + CAP combinado com noradrenalina no NPBL. Apesar de prazosin i.p. reduzir a resposta pressora, o bloqueio simpático com hexametônio combinado com bloqueio de receptor de vasopressina aumentou a resposta pressora da noradrenalina injetada no NPBL (88 ± 30 vs., resposta pressora da noradrenalina antes do bloqueio: 51 ± 4 mmHg), sugerindo que esses mecanismos não estão envolvidos na resposta pressora. Os resultados sugerem que a resposta pressora reduz a ingestão de água e a facilitação da ingestão de NaCl 1,8 % produzida por noradrenalina injetada no NPBL.

O presente estudo também utilizou análise microestrutural de lâminas para observar os efeitos da noradrenalina no NPBL em sinais orosensoriais e pós-ingestivos que modificam a ingestão. Ratos Sprague Dawley foram tratados com FURO+CAP antes das injeções bilaterais de salina ou noradrenalina no NPBL. Noradrenalina (40 nmol/0,2 μ l) aumentou a

ingestão de NaCl ($8,3 \pm 0,7$ vs., salina $4 \pm 0,4$ ml), o número de lambidas/intervalo dos 15 aos 30 minutos do teste ($439,1 \pm 167,4$ vs., salina $60,2 \pm 35,2$) e o número de *bursts*/intervalo ($11,2 \pm 5,8$ v.s. sal $1,9 \pm 0,9$) para NaCl no mesmo período. O pré-tratamento com prazosin (1mg/kg de peso corporal, i.p.) aumentou a ingestão de NaCl ($13 \pm 0,8$ ml), o número de lambidas/intervalo entre os 45 e 90 min do teste ($274 \pm 91,4$), o número de *bursts*/intervalo dos 30 aos 60 min do teste ($13 \pm 9,0$) e também aumentou o tamanho do *burst* aos 45 min do teste (41 ± 11 vs., salina 0 ± 0). Prazosin também aumentou a ingestão de água ($10,4 \pm 0,6$ vs., salina $7,1 \pm 0,5$ ml/180 min) e o número de *bursts* entre 30 e 60 min do teste ($7,7 \pm 2,8$ vs., salina 0 ± 0). Por outro lado, injeções que não açaram o NPBL, apesar de não produzirem efeito na ingestão total de sódio e água em animais tratados com FURO + CAP, quando combinadas com prazosin i.p. também produziram efeitos semelhantes na análise microestrutural de lambidas e levaram a um aumento do número de lambidas/intervalo e *bursts*/intervalo para NaCl, sugerindo inespecificidade da ação da noradrenalina combinada com prazosin i.p. na análise microestrutural de lambidas. Com a finalidade de avaliar os efeitos da ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL sem a interferência da resposta pressora nos sinais pós-ingestivos e orosensoriais, a análise de lambidas para água e NaCl 1,8% foi medida em ratos Sprague Dawley tratados com FURO + CAP e que receberam injeções bilaterais de veículo ou moxonidina no NPBL. Injeções bilaterais de moxonidina ($0,5$ nmol/ $0,2$ μl) no NPBL aumentaram a ingestão total de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP ($29,7 \pm 7$ vs., salina $4 \pm 0,4$ ml) e o número de lambidas/intervalo dos 15 aos 60 min do teste (737 ± 267 vs., salina 0 ± 0 aos 60 min). Injeções de moxonidina também produziram um aumento no número de *bursts*/intervalo (36 ± 7 vs., salina 0 ± 0) e no número de lambidas/*burst* para NaCl 1,8% (26 ± 8 vs., salina 0 ± 0 aos 60 min). Por outro lado, moxonidina não alterou a ingestão total de água, o número de lambidas/intervalo ou mesmo a análise microestrutural de lambidas para água. Os resultados sugerem que moxonidina injetada no NPBL afeta os sinais orosensoriais e pós-ingestivos para a ingestão de sódio.

Um estímulo que produz significativa ingestão de água, mas nenhuma ingestão de NaCl hipertônico e que também produz uma resposta pressora é a estimulação colinérgica com injeção intraperitoneal (i.p.) de pilocarpina ou carbacol i.c.v. No presente trabalho também foi investigado se a resposta pressora tanto de pilocarpina i.p. como de noradrenalina no NPBL afetaria a ingestão de água e NaCl 1,8 % induzida por ativação colinérgica. Ainda, foram investigados os efeitos das injeções de moxonidina, um agonista adrenérgico α_2 /imidazólio, na ingestão de água e de NaCl 1,8% e na resposta pressora produzida por pilocarpina i.p. Ratos Holtzman com implante de cânulas de aço inoxidável no NPBL foram

utilizados. Pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) injetada i.p. induziu ingestão de água ($2,9 \pm 0,3$ ml/180 min), sem alterar a ingestão de NaCl 1,8% ($0,5 \pm 0,3$ ml/180 min). Injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg) i.p aumentaram a ingestão de água ($6,3 \pm 1,7$ ml/180 min) e a ingestão de NaCl 1,8% ($14,7 \pm 3,5$ ml/180 min). Injeções de noradrenalina no NPBL combinadas com salina i.p. não alteraram a ingestão de NaCl 1,8% ($0,8 \pm 2,4$ ml/180 min) e diminuíram a ingestão de água ($0,8 \pm 0,3$ ml/180 min) induzida por pilocarpina i.p. Prazosin i.p. não modificou a ingestão de NaCl 1,8% ($4,8 \pm 3,6$ ml/180 min) ou a ingestão de água ($0,5 \pm 0,3$ ml/180 min) em ratos tratados com pilocarpina i.p. combinada com salina no NPBL. Além disso, prazosin i.p. foi capaz de reduzir as respostas pressoras produzidas por noradrenalina injetada no NPBL e também por pilocarpina i.p. (22 ± 4 vs., resposta pressora da noradrenalina antes de salina i.p.: 60 ± 4 mmHg).

No presente estudo, também foi observado que injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL combinadas com pilocarpina (1 mg/kg) injetada i.p. estimularam a ingestão de NaCl 1,8 % ($14,1 \pm 5,5$ ml/180 min, vs., veículo no NPBL: $0,8 \pm 0,5$ ml/180 min), sem alteração da ingestão de água ($7,6 \pm 3,1$ ml/180 min, vs., veículo no NPBL: $3,8 \pm 0,7$ ml/180 min) ou da resposta pressora produzida pilocarpina i.p. (30 ± 3 mmHg, vs., controle: 28 ± 5 mmHg). Os resultados sugerem que o apetite ao sódio ocorre quando a ativação colinérgica central é combinada com desativação dos mecanismos inibitórios pelas injeções de noradrenalina no NPBL combinada com prazosin i.p. ou apenas de moxonidina no NPBL.

Assim como a pilocarpina i.p., injeções de carbacol i.c.v. causam um aumento da pressão arterial, produz uma resposta dipsogênica, mas nenhuma ingestão de NaCl 1,8%. As injeções de noradrenalina no NPBL combinada com prazosin i.p. não alteraram a ingestão de água ($8,1 \pm 2,4$ vs., salina NPBL $9,4 \pm 4,8$ ml/180 min), mas produziram um aumento da ingestão de NaCl 1,8% ($8,2 \pm 3,9$ vs., salina NPBL $1,9 \pm 0,8$ ml/180 min) induzida por carbacol (4 nmol/1 μ l) i.c.v. Além disso, pôde-se observar que o prazosin foi capaz de reduzir a resposta pressora produzida por noradrenalina (15 ± 7 vs., resposta pressora da noradrenalina antes de salina i.p.: 50 ± 9 mmHg) injetada no NPBL, mas não alterou a resposta pressora do carbacol i.c.v. (28 ± 6 vs., resposta do carbacol antes de salina i.p.: 25 ± 6 mmHg). Os resultados sugerem que o bloqueio do NPBL e provavelmente, da resposta pressora, associada à ativação colinérgica induz o apetite ao sódio.

Portanto, os resultados do presente trabalho sugerem que estímulos colinérgicos, além de estimular a ingestão de água também podem também estimular a ingestão de sódio quando ocorre o bloqueio de mecanismos inibitórios da ingestão de sódio pela ativação de receptores

α_2 adrenérgicos do NPBL. Com a ativação de receptores α_2 adrenérgicos do NPBL haveria a remoção, pelo menos parcial, de sinais provenientes de barorreceptores e/ou receptores cardiopulmonares, sinais orosensoriais ou sinais pós-ingestivos, como sinais provenientes de receptores orais, do estômago, fígado e intestino, que influenciam na ingestão de água e de sódio, o que acarreta num aumento da ingestão de sódio. Porém, as influências inibitórias do aumento de pressão arterial sobre a ingestão de água e sódio ainda são mantidas, pelo menos parcialmente, após a ativação de receptores α_2 adrenérgicos do NPBL, como demonstra a facilitação da ingestão de água e sódio após o tratamento com prazosin i.p.

Abstract:

The activation of α_2 -adrenoceptors with noradrenaline injected into the lateral parabrachial nucleus (LPBN) increases 1.8% NaCl intake in rats treated with the diuretic furosemide (FURO) combined with low dose of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril (CAP) subcutaneously (s.c.). In addition, noradrenaline injected into the LPBN increases arterial pressure and decreases water intake. In the present study, one of the objectives was to investigate the neural mechanisms activated by noradrenaline injected into the LPBN to produce pressor responses and the influence of the pressor response elicited by noradrenaline injected into the LPBN on FURO + CAP-induced water and 1.8% NaCl intake in rats. Male Holtzman rats with bilateral stainless steel guide-cannulas implanted into LPBN were used. Injections of noradrenaline (40 nmol/0.2 μ l) into the LPBN increased FURO + CAP-induced 1.8% NaCl intake (12.2 ± 3.5 , vs., saline: 4.2 ± 0.8 ml/180 min), reduced water intake in the first 90 min of the test (10.5 ± 0.9 vs., saline 7 ± 1.5 ml/90 min) and strongly increased arterial pressure (50 ± 7 , vs. saline: 1 ± 1 mmHg). Results from the present work also showed that unilateral or bilateral noradrenaline injections (20 nmol/0.2 μ l) into LPBL or in misplaced areas produced a pressure response (43.3 ± 6.4 ; 41 ± 7 respectively vs., saline: 2.5 ± 2.5 mmHg) and bradycardia (-51 ± 12 ; -82 ± 15 respectively vs., saline 6 ± 3.6 bpm) suggesting that noradrenaline pressure responses do not depend specifically on LPBN injections. The blockade of the α_1 adrenoceptors with prazosin injected intraperitoneally (i.p.) abolished the pressor response (9 ± 4 vs., saline: 1 ± 1 mmHg) and increased water (17 ± 2 ml/180 min) and 1.8% NaCl intake (21.8 ± 3.8 vs., saline: 4.2 ± 0.8 ml/180), respectively in rats treated with FURO + CAP combined with noradrenaline injected into the LPBN. Although prazosin i.p. reduced the pressor response, the sympathetic blockade with hexamethonium combined with vasopressin receptor blockade increased the pressor response to noradrenaline injected into the LPBN (88 ± 30 vs., noradrenaline response before the blockade: 51 ± 4 mmHg), suggesting that these mechanisms are not involved in the pressor response. The results suggest that the pressor response reduces FURO + CAP-induced water intake and the facilitation of NaCl intake produced by noradrenaline injected into the LPBN.

The present study also used licking microstructure analysis to draw conclusions about the effects of LPBN noradrenaline on orosensory and postingestive signals that modify intake. Male Sprague Dawley rats were used and treated with FURO+CAP before saline or noradrenaline was injected bilaterally into the LPBN. Noradrenaline (40 nmol/0.2 μ l) increased NaCl intake (8.3 ± 0.7 vs. saline 4 ± 0.4 ml) and the number of licks 15-30 into the

test (439.1 ± 167.4 vs. saline 60.2 ± 35.2) and number of bursts (11.2 ± 5.8 vs. saline 1.9 ± 0.9) for NaCl in the same period. Pre-treatment with prazosin i.p. (1mg/kg of body weight) increased NaCl intake (13.4 ± 0.8 ml), the number of licks/bin between 45 and 90 min into the test (274.1 ± 91.4), the number of bursts/bin 30-60 min into the test (13.4 ± 9.0) and also by burst size 45 min into the test (41 ± 11 vs. saline 0 ± 0). Prazosin also further increased water intake (10.4 ± 0.6 vs. saline 7.1 ± 0.5) and the number of bursts between 30 and 60 min into the test (7.7 ± 2.8 vs. saline 0 ± 0). However, injections that did not reach the LPBN, though not produce an effect on total intake of sodium and water in animals treated with FURO + CAP, when combined with prazosin i.p. also produced similar effects on microstructural analysis of licking and caused an increase in the number of licks/bin and bursts/bin for NaCl, suggesting a non specificity of noradrenaline in the LPBN combined with prazosin i.p. on microstructural analysis of licks. In order to evaluate the effects of activation of α_2 -adrenergic LPBN receptors without the interference of the pressor response on postingestive and orosensory signals, lick analysis for water and 1.8% NaCl was measured in male Sprague Dawley rats that were treated with FURO + CAP and given vehicle or moxonidine injections into the LPBN. Bilateral injections of moxonidine (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN increased FURO + CAP-induced total 1.8% NaCl intake (29.7 ± 7 vs. vehicle 4 ± 0.4 ml) and the number of licks/bin from 15 to 60 min (737 ± 267 vs. vehicle 0.0 ± 0.0 at 60 min). Moxonidine injections also increased the number of bursts/bin (36 ± 7 vs. vehicle 0 ± 0) number of licks/burst for 1.8% (26.5773 ± 8.1600 vs. vehicle 0 ± 0 at 60 minutes of the test). The results suggest that moxonidine into LPBN is affecting orosensory and postingestive signals for sodium intake.

A stimulus that produces water intake and pressor response, but no hypertonic NaCl intake is the cholinergic stimulation with pilocarpine injected intraperitoneal (i.p.) or carbachol i.c.v. In this work it was also investigated whether the pressor response both pilocarpine i.p. as noradrenaline in the LPBN affects water and 1.8% NaCl intake induced by cholinergic activation. Further, it was investigated the effects moxonidine injections, an α_2 -adrenergic/imidazoline agonist, on water and 1.8% NaCl intake and the pressor response produced by pilocarpine i.p. Male Holtzman rats with bilateral stainless steel guide-cannulas implanted into LPBN were used. Pilocarpine (1 mg/kg) injected i.p. induced water intake (2.9 ± 0.3 ml/180 min), without affecting 0.3 M NaCl intake (0.5 ± 0.3 ml/180 min). Bilateral injections of noradrenaline (80 nmol/0.2 μ l) into the LPBN combined with prazosin i.p. (1 mg/kg) increased pilocarpine i.p. induced water intake (6.3 ± 1.7 ml/180 min) and 1.8% NaCl intake (14.7 ± 3.5 ml/180 min). LPBN noradrenaline injections combined with saline i.p. did

not affect 1.8% NaCl (0.8 ± 2.4 ml/180 min) and decreased water intake (0.8 ± 0.3 ml/180 min) induced by pilocarpine i.p. Prazosin i.p. did not modify 1.8% NaCl (4.8 ± 3.6 ml/180 min) or water intake (0.5 ± 0.3 ml/180 min) in rats treated with pilocarpine i.p. combined saline into the LPBN. Moreover, prazosin i.p. blocked the pressure response produced by noradrenaline injections into LPBN and also by pilocarpine i.p. (22 ± 4 vs., noradrenaline pressure response before saline i.p.: 60 ± 4 mmHg).

In the present study, it was also observed that bilateral injections of moxonidine (0.5 nmol/0.2 μ l) into the LPBN combined with pilocarpine i.p. induced 1.8% NaCl intake (14.1 ± 5.5 ml/180 min, vs. vehicle LPBN: 0.8 ± 0.5 ml/180 min) but did not change water intake (7.6 ± 3.1 ml/180 min, vs. vehicle LPBN 3.8 ± 0.7 ml/180 min) or pressure response produced by pilocarpine i.p. (30 ± 3 mmHg, vs., control: 28 ± 5 mmHg). The results suggest that strong cholinergic-induced sodium intake arises when the inhibitory mechanisms are deactivated with noradrenaline injected into the LPBN combined with the blockade of pressor responses with prazosin i.p. or moxonidine into LPBN. As pilocarpine i.p., i.c.v. injections of carbachol cause an increase in blood pressure, produce a dipsogenic response, but no intake of 1.8% NaCl. However, the present results show that noradrenaline injections into LPBN combined with prazosin i.p. did not alter water intake (8.1 ± 2.4 vs., i.p. saline LPBN 9.4 ± 4.8 ml/180 min), but produced an increase in 1.8% NaCl intake (8.2 ± 3.9 vs., saline LPBN 1.9 ± 0.8 ml/180 min) induced by carbachol (4 nmol/1 μ l) i.c.v. Further, it was possible to observe that prazosin was able to reduce noradrenaline pressure response (15 ± 7 vs., noradrenaline pressure response before saline i.p.: 50 ± 9 mmHg) injected into LPBL but it did not change carbachol i.c.v. pressure response (28 ± 6 vs., vs., carbachol pressure response before saline i.p.: 25 ± 6 mmHg). The results suggests LPBN blockade and probably, pressure response associated with cholinergic activation induces sodium intake.

Therefore, the present results suggest that besides inducing water intake, cholinergic stimuli also stimulate sodium intake when the inhibitory mechanisms are blocked by α_2 adrenergic receptor activation in the LPBN. The activation of the α_2 adrenergic receptor in the LPBN might remove, at least partially, baroreceptor and/or cardiopulmonary signals and orosensory or postingestive signals, such as signals from oral receptors, stomach, liver and intestine receptors, that might influence on water and sodium intake, which causes an increase in sodium intake. However, the inhibitory action of the increase in arterial pressure is still present, at least partially, after the blockade of the α_2 adrenergic receptors in the LPBN, as suggested by the facilitation of water and sodium intake after the treatment with prazosin.

Lista de abreviaturas e símbolos

ANG II, angiotensina II;
ANOVA, análise de variância;
AP, área postrema;
CAP, captopril;
CCK, colecistocinina
DOI, bromidrato de 2,5-dimetoxi-4-iodoanfetamina;
ECA, enzima conversora de angiotensina;
FC, frequência cardíaca;
FURO, furosemida;
HEXA, hexametônio;
5-HT, serotonina;
i.c.v., intracerebroventricular;
i.p., intraperitoneal;
kg, quilograma;
M, molar;
mg, miligrama;
ml, mililitro;
min, minuto;
mm, milímetro;
NaCl, cloreto de sódio;
NPBL, núcleo parabraquial lateral;
mNTS, porção medial do núcleo do trato solitário;
nmol, nanomol;
NOR, noradrenalina;
NTS, núcleo do trato solitário;
OVLT, órgão vascularizado da lâmina terminal;
PAM, pressão arterial média;
SAL, salina;
s.c, subcutâneo;
PCS, pedúnculo cerebelar superior;
OSF, órgão subfornical;
 α , alfa;

μEq, microequivalente;

μg, micrograma;

μl, microlitro;

±, mais ou menos.

Sumário

1. Introdução	15
2. Objetivos	29
3. Procedimentos experimentais	30
3.1. Animais.....	30
3.2. Cirurgia cerebral	31
3.3. Medida da pressão arterial e frequência cardíaca.....	31
3.4. Drogas a serem injetadas	31
3.5. Injeção das drogas no cérebro	32
3.6. Testes de ingestão de água e de NaCl 1,8%	32
3.7. Análise microestrutural de lambidas	33
3.8. Histologia cerebral para confirmação dos pontos de injeção central	33
3.9. Análise dos resultados	34
4. Protocolos experimentais	34
4.1. Ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com noradrenalina no NPBL combinada com prazosin i.p.	34
4.2. Ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com fenilefrina no NPBL.	35
4.3. Respostas cardiovasculares produzidas por noradrenalina ou fenilefrina injetada no NPBL ou em estruturas pontinas ao redor do NPBL	35
4.4. Respostas cardiovasculares da noradrenalina injetada no NPBL combinada com prazosin i.p.	36
4.5. Respostas cardiovasculares da noradrenalina injetada no NPBL de ratos tratados com hexametônio combinado com antagonista de receptores de vasopressina injetado i.v.	37
4.6. Análise microestrutural de lambidas na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de noradrenalina no NPBL.....	37
4.7. Análise microestrutural de lambidas na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de moxonidina no NPBL.....	37
4.8. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com noradrenalina combinada com prazosin i.p. em ratos tratados com pilocarpina i.p.....	38
4.7. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com moxonidina combinada com pilocarpina i.p.	39
4.9. Respostas cardiovasculares produzidas por injeções noradrenalina no NPBL combinada com prazosin i.p. em ratos tratados com pilocarpina i.p.....	39
4.10. Respostas cardiovasculares produzidas por injeções moxonidina no NPBL em ratos tratados com pilocarpina i.p.	40
4.11. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com bloqueio de receptores adrenérgicos $\alpha 1$ tratados com injeções de noradrenalina no NPBL combinadas com carbacol i.c.v.	41

4.12. Respostas cardiovasculares produzidas pela combinação de noradrenalina injetada no NPBL combinadas com carbacol i.c.v. em ratos com bloqueio receptores α_1 adrenérgicos.	41
5. Resultados	42
5.1. Análise histológica	42
5.2. Ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com fenilefrina ou noradrenalina no NPBL combinadas com prazosin i.p.....	44
5.3. Ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com fenilefrina no NPBL.	47
5.4. Respostas cardiovasculares produzidas por noradrenalina ou fenilefrina injetada no NPBL em estruturas pontinas ao redor do NPBL.....	48
5.5. Respostas cardiovasculares produzidas pela noradrenalina injetada no NPBL combinada com prazosin i.p.	52
5.6. Respostas cardiovasculares produzidas pela noradrenalina injetada no NPBL de ratos pré-tratados com hexametônio combinado com o antagonista de receptores de vasopressina injetados i.v.....	56
5.7. Análise microestrutural das lambidas durante a ingestão de água e NaCl 1,8% dos ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de noradrenalina no NPBL sozinhas ou combinadas com prazosin i.p.	58
5.8. Análise microestrutural das lambidas durante a ingestão de água e NaCl 1,8% dos ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de noradrenalina fora do NPBL sozinhas ou combinadas com prazosin i.p.....	65
5.9. Ingestão de água e NaCl 1,8% e análise microestrutural das lambidas de ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de moxonidina no NPBL.....	68
5.10. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com noradrenalina no NPBL combinada com prazosin i.p. em ratos tratados com pilocarpina i.p.	75
5.11. Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de noradrenalina no NPBL combinadas com prazosin i.p. em ratos tratados com pilocarpina i.p.	77
5.12. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com moxonidina combinada com pilocarpina i.p.	79
5.13. Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de pilocarpina i.p. em ratos tratados com moxonidina no NPBL	81
5.14. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com bloqueio de receptores adrenérgicos α_1 tratados com injeções de noradrenalina no NPBL combinadas com carbacol i.c.v.	83
5.15. Respostas cardiovasculares produzidas pela combinação de noradrenalina injetada no NPBL com carbacol i.c.v. em ratos com bloqueio receptores adrenérgicos α_1	85
5.16. Efeitos de injeções bilaterais de noradrenalina em sítios fora do NPBL na ingestão de água e de NaCl 1,8% induzida por ativação colinérgica.	87
6. Discussão	89
7- Referências	106

Lista de figuras

- Figura 1:** Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 80 ou 160 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL (publicado em GASPARINI *et al.*, 2009).21
- Figura 2:** Traçado representativo mostrando o registro da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de um rato tratado com furosemida (FURO, 10 mg/kg de peso corporal) + captopril (CAP, 5 mg/kg de peso corporal) s.c. que recebeu injeções bilaterais de salina ou noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) no NPBL.22
- Figura 3:** Ilustração esquemática do padrão temporal de lambidas de um rato durante a ingestão de um líquido. (As linhas verticais representam lambidas individuais e o intervalo entre elas [ILI]. *Bursts* são um conjunto de lambidas separados por um ILI < 250 ms, clusters são conjunto de bursts separadas por um ILIs < 500 ms, interburst [IBIs] são intervalos entre bursts [ILIs > 251 ms and <500 ms], e intercluster [ICIs] são os intervalos entre os clusters [ILIs > 500 ms]).25
- Figura 4:** Diagrama mostrando possível envolvimento do NPBL no controle da sede e do apetite ao sódio durante desidratação celular. Osmorreceptores ou receptores de sódio ativam circuitos que facilitam a sede e o apetite ao sódio, mas também um circuito paralelo inibitório do apetite ao sódio que envolve o NPBL. Líquido intracelular, ICF, concentração extracelular de sódio, $[Na^+]_e$ (publicado em DE LUCA, BARBOSA e MENANI, 2003).28
- Figura 5:** Fotomicrografia de cortes transversais do encéfalo de ratos mostrando (A) injeções no NPBL e (B, C, D, E, F e G) injeções em sítios fora do NPBL (setas). p.c.s. pedúnculo cerebelar superior.43
- Figura 6:** Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL combinada com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p.45
- Figura 7:** Variações na (A) PAM e (B) FC produzidas por injeções uni ou bilaterais de salina (SAL) ou noradrenalina (NOR, 10, 15, 20 ou 40 nmol/0,2 µl) no NPBL ou fora do NPBL. Os resultados estão reportados como média ± EPM. O número de animais está indicado acima de cada barra.49
- Figura 8:** Traçados representativos mostrando as variações na PAP, PAM e FC produzidas pelas injeções unilaterais noradrenalina (NOR, 20 nmol/0,2 µl) no NPBL (A) ou fora do NPBL (B) de diferentes ratos.50
- Figura 9:** Variações na PAM e FC produzidas por injeções unilaterais de noradrenalina (NOR, 20 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL em animais normohidratados e saciados pré-tratados com prazosin ou salina i.p.53
- Figura 10:** Traçados representativos mostrando as variações na PAP, PAM e FC produzidas pelas injeções bilaterais de salina (SAL) ou noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 µl) no NPBL de um rato tratado com FURO + CAP sc + prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p.55
- Figura 11:** Variações na (A) PAM e (B) FC produzidas por injeções unilaterais de noradrenalina (NOR, 20 nmol/0,2 µl) no NPBL ou carbacol (4 nmol/1 µl) i.c.v. em ratos pré-tratados com injeções de salina (SAL) ou hexametônio (HEXA, 30 mg/kg de peso corporal) + antagonista vasopressinérgico (AVPx, 10 µg/kg de peso corporal) injetados i.v.57
- Figura 12:** Volume total ingerido de NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p. ...59
- Figura 13:** Número de lambidas/intervalo para (A) NaCl 1,8% e (B) água em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40

nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p.....	61
Figura 14: Número de <i>bursts</i> /intervalo para (A) NaCl 1,8% E (B) água em ratos tratados com FURO + CAP que receberam Injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p.	63
Figura 15: Número de lambidas/ <i>bursts</i> para (A) NaCl 1,8% e (B) água em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p..	64
Figura 16: Volume total ingerido de NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de moxonidina (moxonidina, 0,5 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL.....	69
Figura 17: Número de lambidas/intervalo para NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL)	71
Figura 18: Número de <i>bursts</i> /intervalo para NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL.	73
Figura 19: Número de lambidas/ <i>burst</i> para NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina (SAL) no NPBL.	74
Figura 20: Ingestão cumulativa de (A) NaCl 1,8% e (B) água em ratos com injeções bilaterais de SAL ou noradrenalina (NOR, 80 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com salina (SAL) ou prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. em ratos tratados com pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p.	76
Figura 21: Variações (A) da PAM e (B) da frequência cardíaca (FC) em ratos que receberam injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p após o pré-tratamento com injeções de salina ou prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p.....	78
Figura 22: Ingestão cumulativa de (A) NaCl 1,8% e (B) água em ratos tratados com veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) no NPBL combinada com pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p.....	80
Figura 23: Variações (A) da PAM e (B) da frequência cardíaca produzidas por injeções de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p e ratos tratados com injeções bilaterais de salina ou moxonidina (0,5 nmol/ 0,2 µl) no NPBL. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais.	82
Figura 24: Ingestão cumulativa de (A) NaCl 1,8% e (B) água induzida por carbachol (4 nmol/1µl) i.c.v em ratos que receberam injeções SAL ou noradrenalina (NOR, 80 nmol/0,2 µl) no NPBL combinada com salina ou prazosin i.p.	84
Figura 25: Variações (A) da PAM e (B) da frequência cardíaca (FC) em ratos que receberam injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com injeção de carbachol (4 nmol/µl) no VL após o pré-tratamento com injeções de salina ou prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p.	86
Figura 26: Diagrama representando o envolvimento do NPBL no controle da sede e apetite ao sódio durante estímulos dipsogênico (ativação colinérgica) ou natriorexigênico (tratamento com FURO + CAP).	105

Lista de tabelas

Tabela 1: Ingestão cumulativa de água e NaCl 1,8% NaCl em ratos normohidratados e saciados tratados com injeções bilaterais de noradrenalina ou salina no NPBL combinado com prazosin ou salina i.p.....	46
Tabela 2: Ingestão cumulativa de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções de fenilefrina no NPBL.	47
Tabela 3: Variações na PAM e FC produzidas por injeções unilaterais ou bilaterais de fenilefrina, noradrenalina ou salina no NPBL em ratos normohidratados e saciados.	51
Tabela 4: Variações na PAM e FC produzidas por injeções bilaterais de noradrenalina ou salina no NPBL de ratos tratados com FURO + CAP s.c. + prazosin ou salina i.p.....	54
Tabela 5: Ingestão cumulativa de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções bilaterais de noradrenalina ou salina em sítios fora do NPBL combinadas com prazosin i.p.....	65
Tabela 6: Número de lambidas/intervalo e análise microestrutural NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de ou salina fora do NPBL combinadas com prazosin ou SAL i.p.	67
Tabela 7: Número de lambidas/intervalo e análise microestrutural para água em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de ou salina fora do NPBL combinadas com prazosin ou SAL i.p.	67
Tabela 8: Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com bloqueio de receptores α_1 adrenérgicos ou salina i.p. e tratados com injeções de noradrenalina ou moxonidina em sítios fora do NPBL combinadas com pilocarpina i.p. ou carbacol i.c.v.	88

1. Introdução

A água e o sódio são fundamentais para a manutenção da quantidade e concentração dos líquidos corporais sendo, por isso, controlados por diferentes mecanismos ativados em situações de alterações de volume ou da osmolaridade dos líquidos corporais. A ativação desses mecanismos ajustando a ingestão e a excreção de água e sódio normalmente permite manter o equilíbrio hidroeletrólítico do organismo. A ingestão de água e de sódio ou apenas de água é estimulada diante de uma hipovolemia ou de aumento da osmolaridade. Nessas 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 comportamento de busca por água e sódio (JOHNSON e EDWARDS, 1990; THUNHORST, MORRIS e JOHNSON, 1994).

O sistema renina-angiotensina-aldosterona é um dos mais importantes sistemas hormonais ativados em situações de deficiência de água e sódio no organismo. A renina, uma enzima proteolítica secretada pelo aparelho justaglomerular renal, atua sobre o substrato angiotensinogênio (uma proteína globular sintetizada no fígado), produzindo o decapeptídeo, angiotensina I (ANG I). Sob a ação da enzima conversora de angiotensina (ECA) localizada especialmente nos endotélios da circulação pulmonar, é convertida em um octapeptídeo ativo, a angiotensina II (ANG II). A ANG II, o principal peptídeo formado pela ativação do sistema renina-angiotensina, apresenta inúmeras funções fisiológicas, como regulação da pressão arterial, controle da excreção de sódio (controla a secreção de aldosterona, e tem uma ação tubular renal direta na conservação do sódio), atua em algumas áreas do encéfalo controlando a ingestão de água e sódio e a secreção de vasopressina, além da atividade simpática (FITZSIMONS, 1998). Receptores centrais para as ações da ANG II, já foram demonstrados tanto em áreas cerebrais prosencefálicas como o órgão subfornical (OSF), órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e núcleo supra óptico (NSO), como tronco cerebral (área postrema, núcleo do trato solitário, núcleo parabraquial (LEWIS *et al.*, 1986; MCKINLEY *et al.*, 1987; ALLEN, MCKINLEY e MENDELSON, 1988). Dos vários receptores de ANG II, (existem pelo menos quatro), os mais importantes para seu efeito dipsogênico são os receptores AT1 presentes em órgãos circonventriculares prosencefálicos, tais como OSF e OVLT, podendo ter alguma participação de receptores AT2 (FITZSIMONS, 1998). Além da ANG II, hormônios esteroides adrenocorticais também podem participar da produção de apetite ao sódio na desidratação extracelular seletiva (EPSTEIN, 1991; ZHANG, EPSTEIN e SCHULKIN, 1993; ZHANG *et al.*, 1993)). Ao contrário do que ocorre na desidratação absoluta produzida por privação hídrica, na desidratação extracelular ocorre secreção de

aldosterona na zona fasciculada da adrenal, induzida pela ANG II e pela redução na concentração plasmática de sódio (RAMSAY, THRASHER e BIE, 1988; BOOTH, JOHNSON e STOCKAND, 2002). A ação natriorexigênica mineralocorticoide foi inicialmente demonstrada para a desoxicorticosterona e confirmada posteriormente para a aldosterona (BRAUN-MENENDEZ, 1952; FITZSIMONS, 1998; FORMENTI *et al.*, 2013). O mineralocorticoide aldosterona, também tem papel fundamental no controle do sódio no organismo, podendo atuar tanto periféricamente, nos ductos coletores renais e cólon para regular a (re)absorção de sódio e secreção de potássio (BOOTH, JOHNSON e STOCKAND, 2002), bem como em receptores centrais especialmente em estruturas límbicas, como o núcleo central da amígdala induzindo aumento do apetite ao sódio (GALAVARNA *et al.*, 1992; SAKAI *et al.*, 1996).

Para produzir seus efeitos, a aldosterona se liga a receptores mineralocorticoides (RM), os quais estão localizados no citosol e no núcleo da célula. Na ausência do ligante, esses receptores localizam-se preferencialmente no citosol e na presença do ligante localizam-se preferencialmente no núcleo (ODERMATT *et al.*, 2001). No entanto, esses receptores mineralocorticoides não são seletivos para a aldosterona, pois os glicocorticoides também são capazes de se ligar neles. Para que exista uma seletividade dos receptores mineralocorticoides para a aldosterona, é necessária a presença da enzima 11 β -hidroxiesteroide desidrogenase tipo 2 (HSD2). Essa enzima está localizada na membrana do retículo endoplasmático 5-6 e sua função consiste em catalisar a conversão dos glicocorticoides endógenos, cortisol (em humanos) e corticosterona (em roedores) em seus análogos biologicamente inativos 11-ceto (cortisona e 11-desidrocorticosterona, respectivamente). Portanto, a presença da enzima HSD2 permite que apenas a aldosterona tenha acesso aos receptores mineralocorticoides (NARAY-FEJES-TOTH e FEJES-TOTH, 1996; ODERMATT *et al.*, 1999; ODERMATT *et al.*, 2001). Neurônios que possuem RM, ou seja, são sensíveis à aldosterona, e que contêm a enzima HSD2 estão presentes no núcleo do trato solitário (NTS) próximo ao 4° V e podem estar envolvidos no controle da ingestão de sódio (GEERLING *et al.*, 2006; GEERLING, KAWATA e LOEWY, 2006). Esses neurônios projetam-se para importantes áreas envolvidas no equilíbrio hidroeletrólítico como o núcleo parabraquial lateral (NPBL) e amígdala e são ativados em várias condições que estimulam a ingestão de sódio (GEERLING *et al.*, 2006; GEERLING, KAWATA e LOEWY, 2006), o que sugere que eles possuem um papel na homeostase do sódio (GEERLING *et al.*, 2006; GEERLING, KAWATA e LOEWY, 2006; GEERLING e LOEWY, 2007).

Paralelamente à atuação dos mecanismos, como os acima citados, que estimulam a ingestão de água e de sódio, o organismo dispõe também de mecanismos inibitórios da ingestão de água e de sódio que atuam limitando a ingestão nas situações em que o equilíbrio está presente, ou seja, sinalizam para que ocorra a saciedade. Assim como os mecanismos excitatórios, os mecanismos inibitórios também são importantes no controle da ingestão de água e sódio. A ocitocina e o ANP são secretados na circulação sanguínea durante expansão de volume, particularmente durante expansão hipertônica, e ambos têm ação natriurética, um mecanismo importante para compensar ou pelo menos atenuar essa expansão (MCCANN, GUTKOWSKA e ANTUNES-RODRIGUES, 2003). Complementando a ação renal, esses hormônios também agem centralmente inibindo a sede e o apetite ao sódio. Injeção intracerebroventricular (i.c.v.) de ANP reduz ingestão de água e de sódio induzidos por privação hídrica, por depleção de sódio ou por injeção central de ANG II (ANTUNES-RODRIGUES, MCCANN e SAMSON, 1986; MCCANN, GUTKOWSKA e ANTUNES-RODRIGUES, 2003). Aumento na ingestão de sódio ocorre com injeção intracerebral de anticorpo para ANP (FRANCI, 1997). A ocitocina tem efeitos semelhantes aos do ANP. Injeção intracerebroventricular de ocitocina reduz a ingestão de sódio induzida por depleção de sódio e a injeção de antagonista de ocitocina pela mesma via potencia a ingestão de sódio induzida por ANG II (VERBALIS *et al.*, 1995; SATO *et al.*, 1997).

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

Assim como os mecanismos excitatórios, os mecanismos inibitórios também são importantes no controle da ingestão de água e sódio. É bem conhecido também o efeito inibitório na ingestão de água e sódio produzido pela injeção de agonistas de receptores adrenérgicos α_2 /imidazólicos como a clonidina e a moxonidina em áreas prosencefálicas (FREGLY, KELLEHER e GREENLEAF, 1981; FREGLY, ROWLAND e GREENLEAF, 1984a; b; FERRARI *et al.*, 1990; FERRARI *et al.*, 1991; CALLERA *et al.*, 1993; CALLERA *et al.*, 1994; DE PAULA *et al.*, 1996; DE-LUCA JUNIOR e MENANI, 1997; MENANI *et al.*, 1999), Tanto o efeito antidipsogênico como a inibição da ingestão de sódio pela moxonidina injetada intracerebroventricularmente (i.c.v.) foi abolido pelo tratamento prévio com RX 821002 ou ioimbina (antagonistas de receptores adrenérgicos α_2), (MENANI *et al.*, 1999; DE OLIVEIRA, DE LUCA e MENANI, 2003) sugerindo envolvimento de receptores adrenérgicos α_2 centrais no mecanismo inibitório da ingestão de água e de sódio.

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

A presença de receptores imidazólicos já foi demonstrada em várias regiões do SNC, (RUGGIERO *et al.*, 1998). A literatura tem enfatizado que os receptores adrenérgicos α_2 e os receptores imidazólicos são estruturas independentes, (BOUSQUET *et al.*, 1992; ERNSBERGER *et al.*, 1995; FRENCH, 1995; REIS e PILETZ, 1997; BOUSQUET *et al.*, 2003). De um modo geral, as drogas que atuam simultaneamente nos dois receptores são mais potentes para produzir efeitos agonistas ou antagonistas sobre a inibição da ingestão de água e de sódio. Resultados mostraram que em áreas prosencefálicas, moxonidina, um agonista α_2 /imidazólico, na dose de 5 nmol reduz a ingestão de sódio em animais depletados. Por outro lado, a noradrenalina, um agonista inespecífico de receptores adrenérgicos, reduz a ingestão de sódio em doses extremamente elevadas de 80 e 160 nmol (YADA, DE PAULA, MENANI e DE LUCA JUNIOR, 1997). Injeção de uma alta dose (80 nmol) do agonista específico adrenérgico α_2 , α metil-noradrenalina, no terceiro ventrículo também inibiu a ingestão de água induzida por privação hídrica (SUGAWARA *et al.*, 2001). Esses resultados mostram que ligantes específicos para receptores adrenérgicos necessitam de uma alta dose para produzirem seus efeitos na ingestão de líquidos comparado com ligantes mistos α_2 /imidazólicos.

Uma hipótese para se entender esses resultados é se admitir que receptores adrenérgicos α_2 e imidazólicos agem de forma sinérgica. Haveria uma interação complexa entre esses dois tipos de receptores e o efeito final dependeria de como a droga injetada estaria atuando nesses dois receptores (HIEBLE e RUFFOLO, 1995; SUGAWARA *et al.*, 2001).

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

hoje, de agonistas e antagonistas específicos de receptores imidazólicos, uma vez que todos têm pelo menos alguma afinidade pelos receptores adrenérgicos α_2 . De qualquer modo, os prévios estudos confirmaram a participação dos receptores adrenérgicos α_2 localizados em áreas prosencefálicas na inibição da ingestão de água e de sódio (FREGLY, ROWLAND e GREENLEAF, 1984b; DE PAULA *et al.*, 1996; DE-LUCA JUNIOR e MENANI, 1997; YADA, DE PAULA, MENANI e DE LUCA JUNIOR, 1997; YADA, DE PAULA, MENANI, RENZI, *et al.*, 1997; MENANI *et al.*, 1999; DE OLIVEIRA, DE LUCA e MENANI, 2003).

Se por um lado a ativação de receptores adrenérgicos em áreas prosencefálicas causa uma inibição da ingestão de sódio e de água, a ativação desses receptores, no tronco encefálico, mais especificamente no núcleo parabraquial lateral (NPBL) pode produzir efeitos opostos.

Mecanismos adrenérgicos do núcleo parabraquial lateral

No tronco encefálico, um importante mecanismo inibitório da ingestão de água e sódio foi descoberto no núcleo parabraquial lateral (NPBL), (OHMAN e JOHNSON, 1989; EDWARDS e JOHNSON, 1991; MENANI e JOHNSON, 1995; OHMAN e JOHNSON, 1995; MENANI *et al.*, 1996; MENANI *et al.*, 1998; MENANI, DE LUCA e JOHNSON, 1998; MENANI e JOHNSON, 1998; DE GOBBI, DE LUCA e MENANI, 2000; MENANI *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2004; CALLERA *et al.*, 2005; DE CASTRO E SILVA, FREGONEZE e JOHNSON, 2006; DE GOBBI *et al.*, 2009; GASPARINI *et al.*, 2009; MENEZES *et al.*, 2011). O NPBL é uma estrutura pontina que recebe projeções aferentes da área postrema (AP) e da porção medial do núcleo do trato solitário (NTSm), áreas inervadas por aferências de barorreceptores, receptores cardiopulmonares, receptores gustatórios e outros receptores viscerais que influenciam a ingestão de água e NaCl (NORGREN, 1981; LANCA e VAN DER KOOY, 1985; HERBERT, MOGA e SAPER, 1990; JOHNSON e THUNHORST, 1997; JOHNSON, 2007). Um balão inflado posicionado na junção da veia cava e átrio direito reduz a ingestão de NaCl 1,8% induzida pelo tratamento FURO + CAP e aumenta a expressão da proteína c-fos no NPBL, sugerindo que o NPBL pode ser um sítio que recebe sinais de receptores cardiovasculares e inibe a ingestão de sódio (DE GOBBI *et al.*, 2008).

O bloqueio de receptores serotoninérgicos, colecistocinérgicos, (CCK), do fator liberador do corticotrofina (CRF) ou glutamatérgicos, ou a ativação de receptores

adrenérgicos α_2 no NPBL aumenta a ingestão de salina hipertônica e ocasionalmente a de água induzida pelo tratamento com o diurético furosemida (FURO) combinado com baixas doses do inibidor da enzima conversora de angiotensina, o captopril (CAP), ambos injetados subcutaneamente (s.c.), sugerindo a existência de um importante mecanismo inibitório para o controle da ingestão de sódio e água no NPBL (DE CASTRO, DE CASTRO e MENANI, 1993; MENANI, THUNHORST e JOHNSON, 1996; MENANI e JOHNSON, 1998; FRATUCCI DE GOBBI *et al.*, 2001; ANDRADE *et al.*, 2004; DE CASTRO E SILVA, FREGONEZE e JOHNSON, 2006; DE GOBBI *et al.*, 2009; GASPARINI *et al.*, 2009).

Injeções bilaterais de noradrenalina (um agonista não seletivo de receptor adrenérgico) no NPBL também aumenta a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP e produz uma tendência em reduzir a ingestão de água (GASPARINI *et al.*, 2009) (Figura 1). Resultados não publicados de nosso laboratório mostraram que a mesma dose de noradrenalina injetada no NPBL também aumenta a pressão arterial (Figura 2). Reduções da pressão arterial facilitam a ingestão de água e sódio, enquanto que o aumento da pressão arterial tem efeitos opostos (THUNHORST e JOHNSON, 1994; THUNHORST, MORRIS e JOHNSON, 1994; JOHNSON e THUNHORST, 1997; THUNHORST, BELTZ e JOHNSON, 2007; DE GOBBI *et al.*, 2008). Entretanto, injeções de noradrenalina no NPBL aumentam a pressão arterial e facilitam a ingestão de sódio induzida por FURO + CAP.

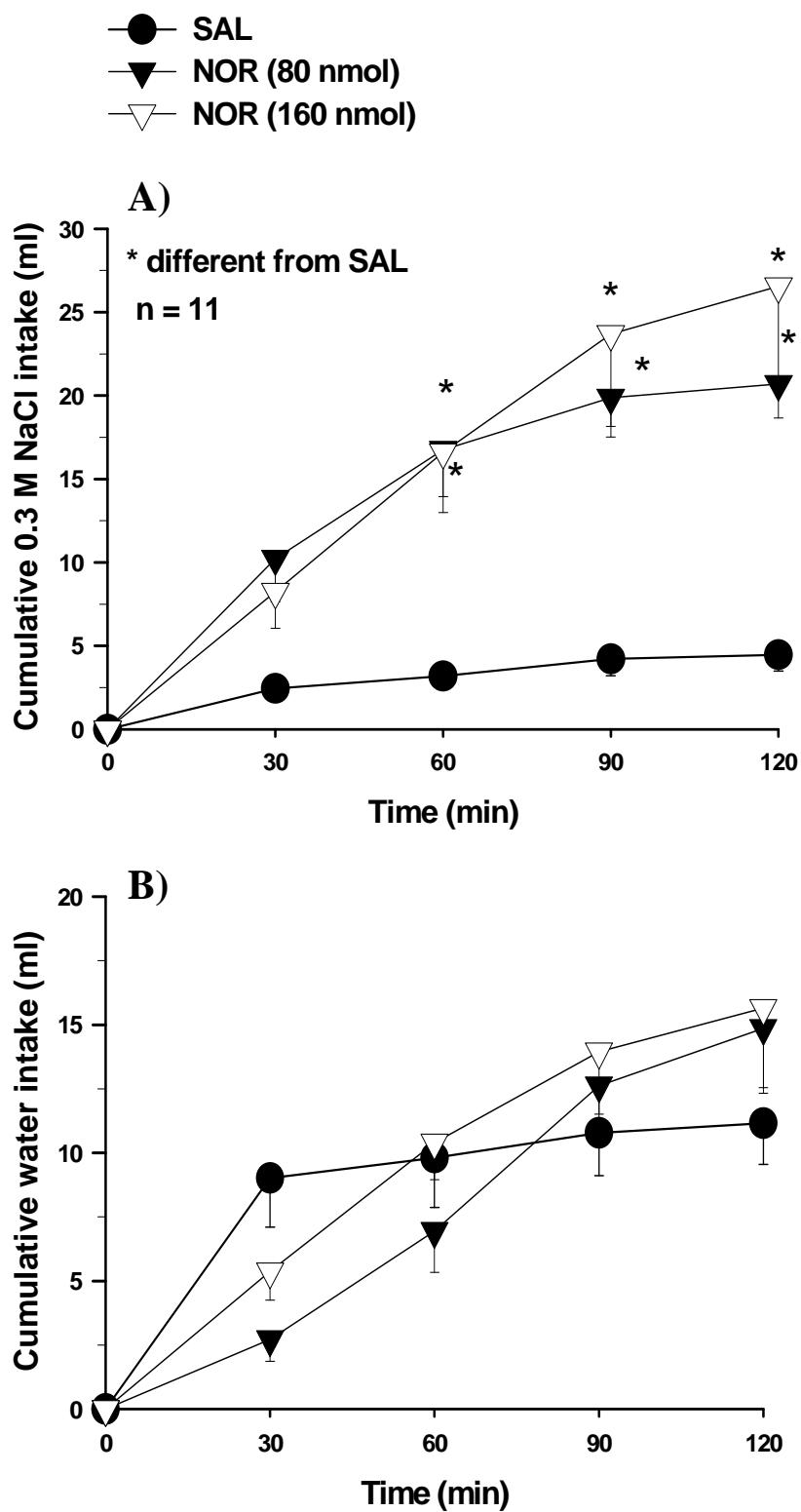


Figura 1: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 80 ou 160 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL (publicado em GASPARINI *et al.*, 2009).

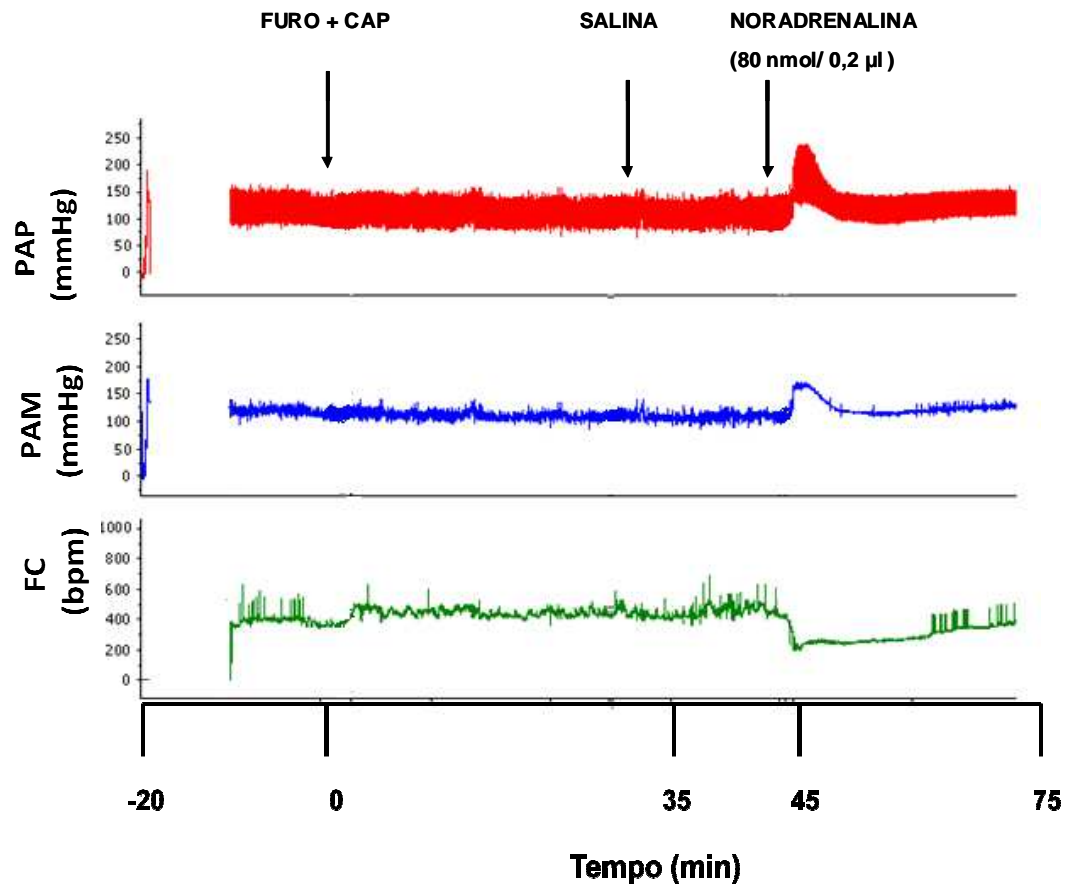


Figura 2: Traçado representativo mostrando o registro da pressão arterial pulsátil (PAP, mmHg), pressão arterial média (PAM, mmHg) e frequência cardíaca (FC, bpm) de um rato tratado com furosemida (FURO, 10 mg/kg de peso corporal) + captopril (CAP, 5 mg/kg de peso corporal) s.c. que recebeu injeções bilaterais de salina ou noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) no NPBL.

Não se sabe quais os sinais mediados por cada neurotransmissor no NPBL e particularmente quais podem ser afetados pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 produzida pela injeção de noradrenalina no NPBL. Uma das hipóteses para explicar a facilitação da ingestão de sódio produzida por noradrenalina no NPBL é que noradrenalina bloqueia os sinais inibitórios da ingestão de sódio produzidos pelo aumento da pressão arterial. Na mesma direção, sem excluir a possibilidade de um efeito inibitório direto nos mecanismos centrais da sede, a inibição da ingestão de água por injeções de noradrenalina no NPBL em ratos tratados com FURO + CAP pode ser devido a um aumento da pressão arterial. Para investigar essa hipótese seria importante testar os efeitos do bloqueio da resposta pressora produzida por noradrenalina injetada no NPBL na ingestão de sódio e água induzida por FURO + CAP.

A ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções bilaterais de moxonidina (agonista adrenérgico/imidazólico) no NPBL também aumenta a ingestão de sódio 1,8% induzida por FURO + CAP, sem alterar a ingestão de água, o que sugere que a ativação de adrenérgico α_2 no NPBL não é um mecanismo envolvido na inibição da ingestão de água produzida por injeção de noradrenalina no NPBL em ratos tratados com FURO + CAP (ANDRADE *et al.*, 2004). A ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções de moxonidina no NPBL não modifica a pressão arterial, o que também sugere que esses receptores não estão envolvidos na resposta pressora de noradrenalina injetada no NPBL (ANDRADE *et al.*, 2004). Excluindo a ativação de receptores adrenérgicos α_2 , uma possibilidade é que os receptores adrenérgicos α_1 podem ser ativados por noradrenalina para produzir respostas cardiovasculares ou mesmo para inibir a ingestão de água, entretanto, isso ainda não havia sido investigado. Adicionalmente, os mecanismos periféricos ativados por noradrenalina injetada no NPBL para produzir a resposta pressora e bradicárdica também não foram investigados.

Com o propósito de esclarecer essas questões apresentadas acima, no presente estudo, investigamos a influencia da resposta pressora na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP s.c. combinado com noradrenalina injetada no NPBL e os possíveis mecanismos (ativação simpática e/ou secreção de vasopressina) que podem ser ativados por injeções de noradrenalina injetada no NPBL para produzir sua resposta pressora.

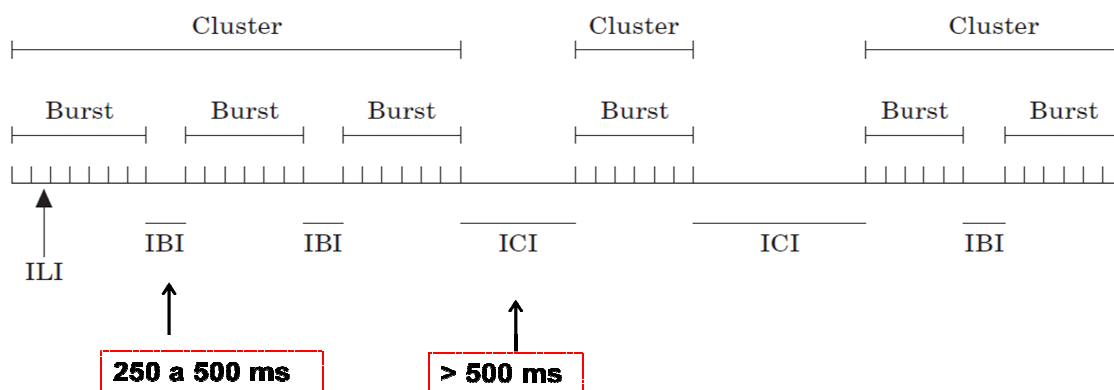
Fatores orosensoriais e pós-ingestivos envolvidos na ingestão de água e sódio

Está bem estabelecido na literatura que a ingestão de uma solução é controlada por fatores orosensoriais e pós-ingestivos. O controle orosensorial ocorre no início da ingestão quando o animal entra em contacto com a solução ou com o alimento por meio da língua. O tipo de solução, a experiência anterior e o estado psicológico do animal determina o que acontece. Se a solução é palatável, a ingestão continua. À medida que a solução é ingerida, o líquido se acumula no estômago e no intestino, evocando sinais pós-ingestivos que levam a ingestão a um final. Portanto, a quantidade que um animal ingere durante uma refeição é o resultado da ativação de sinais orosensoriais e pós-ingestivos que agem no cérebro e controlam o comportamento ingestivo (DAVIS, 1999).

Para estudar os sinais envolvidos durante a ingestão de uma solução, Stellar e Hill, em (1952), inventaram o medidor de lambidas, que é capaz de registrar o tempo de contato da língua com o tubo onde está a solução a ser ingerida e fornece informações importantes para o estudo do comportamento ingestivo. O ciclo completo do movimento de protrusão e retração da língua é chamado de lambida. O estudo deste movimento, utilizando o teste da análise da frequência de lambidas, pode-se distinguir os sinais pós-ingestivos dos sinais orosensoriais (DAVIS e SMITH, 1992; BRESLIN *et al.*, 1993; HALLOCK *et al.*, 2009) Este teste comportamental tem parâmetros como a frequência inicial de lambida e a frequência de declínio de lambida, que refletem a responsividade do animal a propriedades gustatórias e a estimulação pós-ingestiva, respectivamente (DAVIS e LEVINE, 1977; DAVIS e SMITH, 1990; DAVIS e PEREZ, 1993; FLYNN, SMITH e BIEBER, 1999; DAVIS, SMITH e MCCANN, 2002).

Analisando a frequência de lambidas (número de lambidas/intervalo de tempo) na ingestão de diferentes concentrações de solução de sacarose, Davis e Smith perceberam que esta frequência ocorre em um ritmo elevado, no qual foi organizada em *bursts* (disparos) de lambidas. Além disso, de acordo com eles, estes *bursts* ocorrem em *clusters* (grupos) que foram separados por breves interrupções (250-500 ms). Os clusters foram separados por intervalos que variaram de 500 ms a muitas centenas de segundos (DAVIS e SMITH, 1992) (Figura 3). No entanto, em nossos estudos utilizamos um software (MATLAB, MathWorks, Natick, MA, EUA), no qual o *burst* foi definido como um conjunto de pelo menos 2 lambidas separadas por não mais do que 1 segundo.

Ainda no mesmo estudo, Davis e Smith (1992) observaram que altas concentrações de solução de sacarose levaram a um contato longo e sustentável da língua com o tubo de beber.



Davis and Smith., 1992

Figura 3: Ilustração esquemática do padrão temporal de lambidas de um rato durante a ingestão de um líquido. (As linhas verticais representam lambidas individuais e o intervalo entre elas [ILI]. *Bursts* são um conjunto de lambiadas separados por um ILI < 250 ms, *clusters* são conjunto de *bursts* separadas por um ILIs < 500 ms, *interburst* [IBIs] são intervalos entre *bursts* [ILIs > 251 ms e <500 ms], e *intercluster* [ICIs] são os intervalos entre os *clusters* [ILIs > 500 ms]).

Isto se reflete no tamanho do *burst* e também no tamanho do *cluster* que podem ser utilizados para medir os sinais orosensoriais

Outros fatores estudados por Davis e Smith (1992) foram os sinais pós-ingestivos. A importância destes fatores inibitórios é demonstrada em testes com ratos *sham feeding*, em que o líquido ingerido não se acumula no estômago e/ou intestino. Davis e Smith mostraram que em ratos *sham feeding*, o aumento do comprimento de uma refeição é causado pelo aumento do número de *burst* e não pelo tamanho do *burst*. Assim, eles sugerem que o número de *burst* pode ser usado como parâmetro para medir os fatores pós-ingestivos.

Utilizando a análise microestrutural, Wirtshafter e colaboradores (2012), perceberam que em animais que passaram por duas depleções de sódio feitas com furosemida e dieta pobre em sódio, ocorre um aumento na ingestão de sódio na segunda depleção comparada com a primeira depleção devido a um aumento no tamanho de *clusters*, sugerindo uma alteração na palatabilidade.

A análise microestrutural também foi utilizada por Davis e colaboradores em (1998) para se estudar os mecanismos do trato gastrointestinal envolvidos na saciedade produzida por

sinais pós-ingestivos decorrentes da ingestão de água e salina isotônica. Neste estudo foi possível observar que a estimulação pós-ingestiva produziu alteração no número de *clusters*, mostrando e sugerindo que a análise microestrutural de lambidas é uma importante metodologia para se estudar os sinais envolvidos no comportamento ingestivo.

Flynn e colaboradores (2003) utilizando a análise da frequência de lambidas demonstraram que ratos espontaneamente hipertensos (SHR) são menos responsivos aos fatores inibitórios para a ingestão de sódio quando comparados com os ratos Wistar. Além disso, demonstraram que quando os sinais inibitórios são reduzidos ou minimizados, os ratos deficientes de sódio ingerem mais NaCl do que normalmente ingeririam (TORDOFF, SCHULKIN e FRIEDMAN, 1987; FLYNN, SMITH e BIEBER, 1999).

Outros estudos também utilizaram a análise da frequência inicial de lambidas, nos quais os sinais inibitórios pós-ingestivos são mínimos, para investigar os fatores envolvidos na ingestão de sódio. Curtis e colaboradores (2001) verificaram que em animais privados de sódio a frequência inicial de lambidas para diferentes soluções de sódio aumentou após dois dias de privação, sugerindo que a privação de sódio produz alteração na palatabilidade ao sódio. Além disso, Breslin e colaboradores (1993), utilizando também a análise da frequência inicial de lambidas demonstraram que a concentração plasmática de sódio de um animal interage com o sinal gustatório em um centro neural integrador. Apesar de muito úteis para se analisar o comportamento ingestivo e os fatores envolvidos na ingestão de uma solução, as frequências iniciais e de declínio de lambidas de uma solução não são a única forma de se analisar os fatores envolvidos no comportamento ingestivo.

Sabendo que a ativação de receptores adrenérgico α_2 no NPBL altera a ingestão de NaCl 1,8% e água induzida por FURO + CAP foi interessante utilizar o medidor de lambidas e análise microestrutural de lambidas (tamanho e número de *burst*) para estudar os sinais envolvidos neste comportamento. Assim, no presente estudo, investigamos a influência da noradrenalina no NPBL e seu efeito pressor ou de injeções de moxonidina no NPBL sobre a análise microestrutural de lambidas em animais tratados com FURO + CAP.

Ativação colinérgica e equilíbrio hidroeletrólítico

Um estímulo que produz significativa ingestão de água, mas nenhuma ou pouca ingestão de NaCl hipertônico, é a estimulação colinérgica com injeção i.c.v. de carbacol (FITTS, THUNHORST e SIMPSON, 1985b; a; SATO *et al.*, 1996) ou injeção intraperitoneal (i.p.) de pilocarpina (BORELLA *et al.*, 2008).

Além da resposta dipsogênica, a injeção de carbacol i.c.v. ou de pilocarpina i.p. ativam receptores colinérgicos localizados em áreas prosencefálicas e produzem potentes respostas pressoras (TRENDELENBURG, 1961; HOFFMAN *et al.*, 1977; IMAI *et al.*, 1989; MOREIRA *et al.*, 2003; TAKAKURA *et al.*, 2005; BORELLA *et al.*, 2008; TAKAKURA *et al.*, 2011). Estas respostas produzidas por carbacol ou pilocarpina estão associadas com uma condição de hiperosmolaridade plasmática, uma vez que a ativação de receptores colinérgicos prosencefálicos está relacionada à desidratação intracelular (FITTS e SIMPSON, 1986) e talvez por isso ocorreria uma ativação significativa de mecanismos inibitórios que poderiam bloquear a ingestão de sódio por estes estímulos (FITTS e SIMPSON, 1986).

Entretanto, estudos demonstraram que metisergida, um antagonista de receptor serotoninérgico não seletivo, administrada no NPBL em conjunto com injeção de carbacol i.c.v., produz uma significativa ingestão de NaCl 1,8% (MENANI *et al.*, 2002). Além disso, após a injeção de metisergida no NPBL, em ratos submetidos à sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M ocorre uma potente ingestão de NaCl hipertônico. Por outro lado, o tratamento apenas com metisergida no NPBL não produz alteração na ingestão de sódio nem de água. Esses resultados sugerem que circuitos cerebrais do apetite ao sódio, assim como os da sede, são ativados por desidratação intracelular. Informações de osmorreceptores podem ativar a ingestão de sódio paralelamente à ingestão de água, porém o NPBL inibe este circuito e impede a ingestão de sódio hipertônico, prevenindo uma desidratação celular (DE LUCA, BARBOSA e MENANI, 2003) (Figura 4). É provável que injeções de metisergida no NPBL bloqueiem influências inibitórias provenientes, por exemplo, de aferências de barorreceptores, receptores viscerais ou gustatórios.

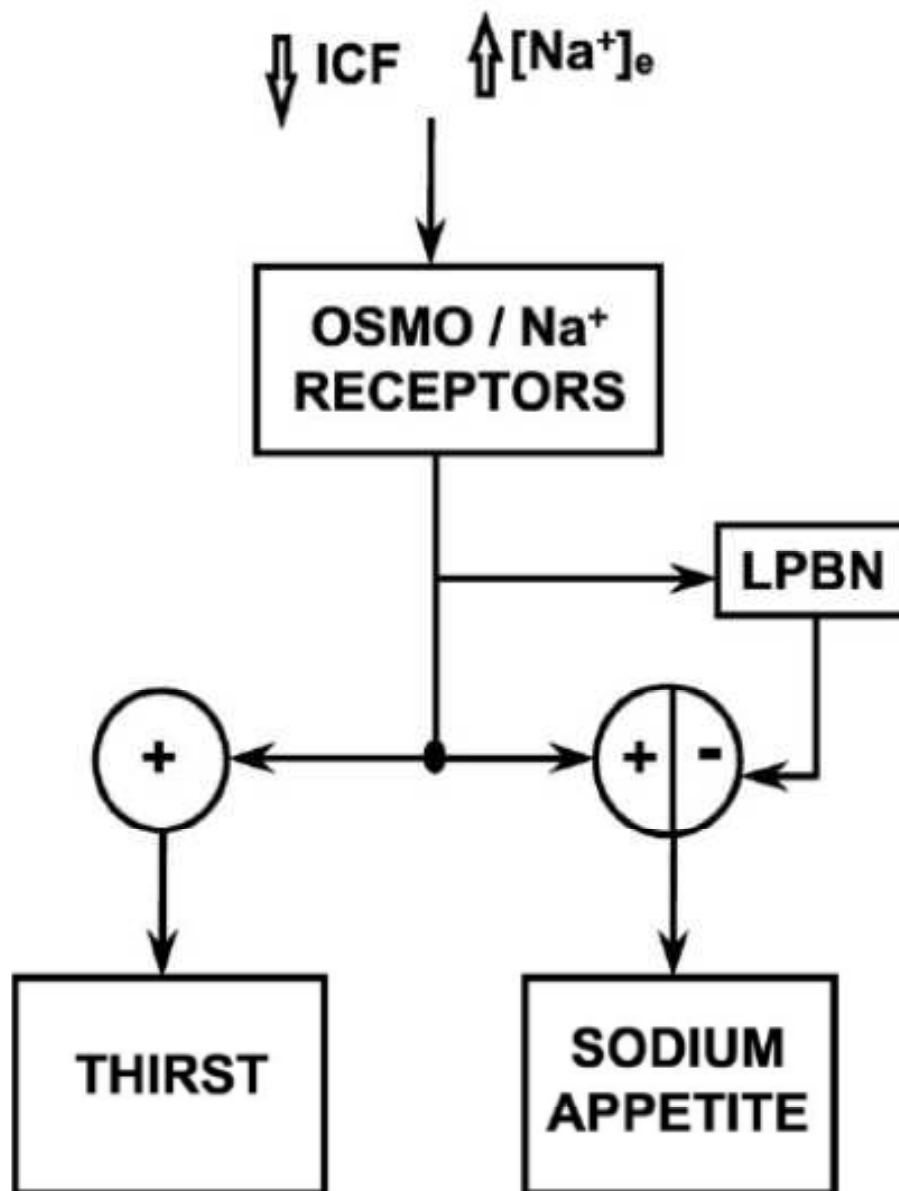


Figura 4: Diagrama mostrando possível envolvimento do NPBL no controle da sede e do apetite ao sódio durante desidratação celular. Osmorreceptores ou receptores de sódio ativam circuitos que facilitam a sede e o apetite ao sódio, mas também um circuito paralelo inibitório do apetite ao sódio que envolve o NPBL. Líquido intracelular, ICF, concentração extracelular de sódio, $[Na^+]_e$ (publicado em DE LUCA, BARBOSA e MENANI, 2003).

Além dos mecanismos serotoninérgicos, sabe-se que a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 produzida por injeções de moxonidina no NPBL também produz intensa ingestão de NaCl hipertônico em condições de hiperosmolaridade (ANDRADE *et al.*, 2006). Porém, ainda não foi investigado se a ativação de receptores adrenérgicos no NPBL, com noradrenalina, combinada com injeção de carbacol i.c.v. altera a ingestão de água e NaCl 1,8%. Além disso, não se sabe se a resposta pressora tem alguma influência na ingestão de sódio quando os mecanismos colinérgicos juntamente com os mecanismos adrenérgicos do NPBL estão ativados. Portanto, uma proposta no presente trabalho foi se testar a ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com carbacol i.c.v. ou pilocarpina i.p. combinados com noradrenalina injetada no NPBL e prazosin i.p. Espera-se que ao se bloquear a resposta pressora estes tratamentos produzam uma significativa ingestão de sódio, o que confirmaria que o aumento da pressão arterial é um forte mecanismo inibitório da ingestão de sódio. Além disso, no presente trabalho, também foi investigado se a injeção de moxonidina no NPBL, que não produz resposta pressora (ANDRADE *et al.*, 2004), produziria um aumento na ingestão de NaCl 1,8% em animais tratados com pilocarpina i.p., embora, neste caso, a resposta pressora da pilocarpina continuasse presente. Ou seja, se seria possível alguma ingestão de sódio após injeção de moxonidina no NPBL combinada com pilocarpina i.p. embora a potente resposta pressora produzida pela pilocarpina ainda estivesse presente. Após verificar o comportamento ingestivo em animais tratados com pilocarpina i.p. e moxonidina no NPBL, também verificamos se as respostas cardiovasculares produzidas por pilocarpina i.p. eram modificadas por injeções bilaterais de moxonidina no NPBL. Desta forma, poderia se verificar se a ativação de mecanismos adrenérgicos era capaz de alterar a resposta pressora produzida por ativação colinérgica e se o aumento da pressão arterial é um forte mecanismo inibitório da ingestão de sódio.

2. Objetivos

No presente estudo, verificamos:

- 1) se o bloqueio da resposta pressora da noradrenalina injetada no NPBL pela injeção de prazosin (antagonista específico de receptores adrenérgicos α_1) intraperitonealmente (i.p.) altera a ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP;
- 2) os efeitos das injeções de diferentes doses de noradrenalina uni ou bilateralmente no NPBL na pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC);
- 3) os efeitos de injeções de fenilefrina (agonista adrenérgico α_1 específico) no NPBL na PAM, FC e na ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP;

- 4) os efeitos da injeção intravenosa (i.v.) de antagonista de receptores de vasopressina combinado com hexametônio (bloqueador ganglionar) na resposta pressora e na bradicardia produzida por injeção de noradrenalina no NPBL;
- 5) a influência de injeções de noradrenalina no NPBL e sua resposta pressora ou de injeções de moxonidina no NPBL na análise microestrutural de lambidas durante a ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP.
- 6) se ocorre modificação na ingestão de água e NaCl 1,8% após injeções de noradrenalina no NPBL, em animais tratados com pilocarpina i.p. (um agonista colinérgico que produz ingestão de água, mas não de sódio), e se alterações na resposta pressora produzida por essas mesmas injeções no NPBL também alteram a ingestão de água e NaCl 1,8% em animais tratados com pilocarpina i.p.;
- 7) se ocorre alterações na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com moxonidina no NPBL combinada com pilocarpina i.p., e se injeções de moxonidina no NPBL alteram as respostas cardiovasculares produzidas por pilocarpina i.p.;
- 8) se ocorrem modificações na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com injeções de noradrenalina no NPBL e carbacol i.c.v., e se alterações na resposta pressora produzida por essas mesmas injeções no NPBL e por carbacol i.c.v. também alteram a ingestão de água e NaCl 1,8%;

3. Procedimentos experimentais

3.1. Animais

Foram utilizados ratos Holtzman com peso em torno de 300 g . Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, em salas climatizadas (23 ± 2 °C), com ciclo claro-escuro 12-12 h, tendo disponível ração (Paulínia, SP, Brazil), água e NaCl 1,8% *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Odontologia de Araraquara- UNESP.

Para os protocolos realizados na Universidade de Buffalo, NY a fim de se verificar a análise microestrutural de lambidas, foram utilizados ratos Sprague Dawley com peso de 280 a 300 g. Os animais foram mantidos nas mesmas condições experimentais descritas acima, com exceção da ração, que era da marca Harlan Teklad (Harlan Teklad, Madison, WI, USA). Os protocolos realizados no exterior foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da University at Buffalo- UB.

3.2. Cirurgia cerebral

Os ratos foram anestesiados com cetamina (80 mg/kg de peso corporal i.p.) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal i.p.) e adaptados a um aparelho estereotáxico (modelo Kopf 900). O lambda e o bregma foram utilizados como referência para se nivelar a cabeça dos ratos. Utilizando-se o bregma como referência, foram determinados os pontos de introdução das cânulas de aço inoxidável nas cabeças dos ratos. Nestes pontos foi feita trepanação do osso do crânio com uma broca esférica, abrindo-se orifícios de aproximadamente 1,5 mm de diâmetro. Para o NPBL, cânulas de aço inoxidável (12 X 0,6 mm d.i.) foram posicionadas bilateralmente no cérebro conforme as coordenadas: 9,4 mm caudal ao bregma, 2,0 mm lateral à linha mediana e 4,1 mm abaixo da dura-máter. Além do NPBL, três grupos de ratos também receberam cânulas no ventrículo lateral (VL) conforme as coordenadas 0,6 mm caudal ao bregma, 1,6 mm lateral à linha mediana e 3,6 mm abaixo da dura-máter. As cânulas foram fixadas nas cabeças dos ratos com parafusos e resina acrílica. Ao final da cirurgia cerebral, os ratos receberam injeção intramuscular (0,2 ml/rato) de Pentabiótico Veterinário – Pequeno Porte (Fort Dodge Saúde Animal Ltda.) e do analgésico/anti-inflamatório Ketoflex (cetoprofeno 1%, 0,03 ml/rato).

Depois da cirúrgica, os ratos passaram por um período de recuperação de uma semana antes dos testes de ingestão de água e NaCl ou dos registros de pressão arterial.

3.3. Medida da pressão arterial e frequência cardíaca

A pressão arterial média (PAM) e frequência cardíaca (FC) foram registradas em ratos não anestesiados. Um dia antes do registro da PAM e FC, os animais foram anestesiados com cetamina (100 mg/kg i.p.) e xilazina (7 mg/kg de peso corporal i.p.), um tubo de (PE 10 conectado com um tubo de polietileno PE 50) foi inserido na aorta abdominal através da femoral. Ao mesmo tempo, em alguns animais, um segundo tubo de polietileno foi inserido na veia femoral para administração de drogas. Ambos foram exteriorizados pelo dorso do animal. Para registro de pressão arterial pulsátil (PAP), PAM e FC, o cateter arterial foi conectado com um transdutor de pressão conectado a um amplificador (ETH-200, CB Sciences) e a um sistema computadorizado de registro (Mac Lab/Power Lab).

3.4. Drogas a serem injetadas

Todas as drogas foram compradas da Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA. Noradrenalina (bitartrato de norepinefrina, 10, 15, 20 ou 40 nmol/0,2 µl), foi injetada no NPBL para verificar os efeitos na PAM e FC. Noradrenalina na dose de 20 nmol/0,2 µl

também foi injetada i.v, enquanto nas doses de 40 e 80 nmol/0,2 µl foi utilizada para os testes de ingestão comportamental. Cloridrato de fenilefrina (80 nmol/0,2 µl) e cloridrato de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) foram injetados no NPBL para os testes de ingestão e respostas cardiovasculares. Cloridrato de carbacol foi injetado no ventrículo lateral (VL). Cloridrato de prazosin (1 mg/kg de peso corporal) e pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) foram injetados i.p. Furosemida (10 mg/kg de peso corporal) e captopril (5 mg/kg de peso corporal) foram injetados s.c. [β -Mercapto- β -, β -cyclopentamethylenepropionyl, O-me-Tyr², Arg⁸] vasopressin (Composto de Manning ,10 mg/kg de peso corporal), arginina vasopressina (12,5 ng/rato) e cloridrato de hexametônio (30 mg/kg de peso corporal) foram injetados intravenosamente (i.v.).

Noradrenalina, fenilefrina, prazosin, vasopressina, Composto de Manning, hexametônio, pilocarpina, e carbacol foram dissolvidos em salina isotônica. Moxonidina foi dissolvida em veículo (propilenoglicol/água 2:1). Salina ou veículo foi injetado no NPBL como tratamento controle.

As doses das drogas utilizadas foram baseadas em estudos prévios do nosso laboratório que utilizaram as mesmas doses para injeções centrais ou periféricas (MENANI, DE LUCA e JOHNSON, 1998; SUGAWARA *et al.*, 1999; MENANI *et al.*, 2000; GASPARINI *et al.*, 2009).

3.5. Injeção das drogas no encéfalo

As injeções foram feitas utilizando-se uma seringa Hamilton (5 µl), conectada por meio de um tubo de polietileno PE-10 a uma agulha injetora que foi introduzida no encéfalo pela cânula guia previamente fixada no cérebro. A cânula injetora (0,3 mm diâmetro) foi 2 mm mais longa do que a cânula guia. O volume de injeção foi 0,2 µl no NPBL em cada lado e 1 µl no VL.

3.6. Testes de ingestão de água e de NaCl 1,8%

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

A ingestão de água e NaCl 1,8% foi induzida por diferentes tratamentos. Em um dos tratamentos a ingestão de água e NaCl 1,8% foi induzida pelo tratamento combinado de furosemida (10 mg/kg de peso corporal) + captopril (5 mg/kg de peso corporal) sc.

Imediatamente após o tratamento com furosemida + captopril, os ratos foram mantidos sem água e sem NaCl 1,8% por uma hora. Após esse período, foi oferecido aos animais água e NaCl 1,8% e a ingestão cumulativa foi medida por 2 h (ratos tratados com fenilefrina) ou 3h (ratos tratados com noradrenalina).

Além do tratamento FURO + CAP, a ingestão de água e NaCl 1,8% foi induzida pelo tratamento com pilocarpina i.p. ou carbacol no VL. Imediatamente após as injeções i.p. ou i.c.v., foi oferecido aos animais água e NaCl 1,8% e a ingestão cumulativa foi medida por 3h (para noradrenalina ou moxonidina).

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

3.7. Análise microestrutural de lambidas

As gaiolas utilizadas para a análise microestrutural foram modificadas pela Unifab. Água e solução de NaCl 1,8% foram fornecidos em garrafas de vidro (237 ml), equipados com rolhas de borracha e bicos de aço inoxidável com abertura no centro de curvatura, 1/10 (Girton Manufacturing Company, Inc., Millville, PA) As gaiolas foram modificadas de modo que os ratos foram obrigados a lambem através de uma abertura numa placa de aço inoxidável para minimizar falsas lambidelas (quando um rato completa o circuito por tocar o bico com outra coisa que não a sua língua). Lambidas foram gravadas usando um medidor de lambidas de contato personalizado (Loja de Psicologia eletrônica, da Universidade da Pensilvânia, em Filadélfia, PA, EUA). A Aquisição de dados e o processamento pós-aquisição foram realizados por um software MATLAB (MathWorks, Natick, MA, EUA), antes de ser transportado para o Microsoft Excel para análise final. O *burst* foi definido como um conjunto de pelo menos 2 lambidas separadas por não mais do que 1 segundo.

3.8. Histologia cerebral para confirmação dos pontos de injeção central

Terminados os experimentos, os ratos receberam injeções de corante (azul de Evans, 0,2 µl) no NPBL ou no VL, foram profundamente anestesiados e submetidos a uma perfusão cerebral através de injeção no coração de solução salina tamponada (50 ml) seguida de solução de formalina a 10% (50 ml). A seguir os cérebros foram retirados e fixados em formalina 10% por alguns dias. Cortes transversais (60 µm de espessura) foram feitos nos pontos de injeção com auxílio de um criostato (Leica). Os cortes histológicos, montados em

lâmina foram corados com Giemsa e analisados para se localizar os pontos das injeções de acordo com o Atlas de Paxinos e Watson (PAXINOS e WATSON, 1997).

3.9. Análise dos resultados

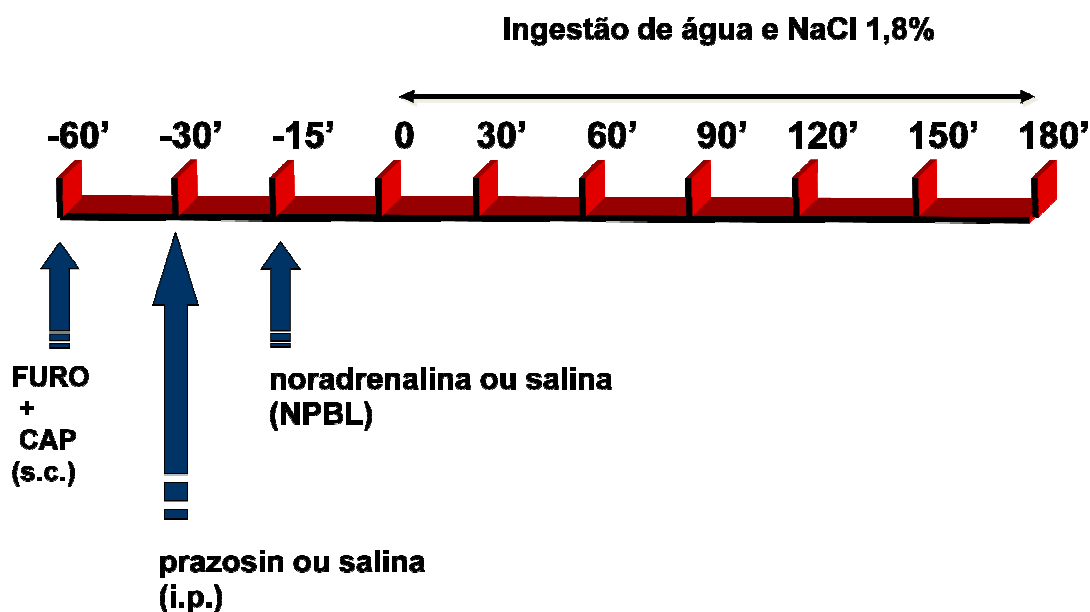
Os resultados foram analisados por two-way repeated measures ANOVA (testes contrabalanceados) ou por two-way ANOVA quando os tratamentos e tempos eram fatores e por one way ANOVA quando apenas os diferentes tratamentos foram analisados. Em todos os casos, ANOVA foi seguida do teste de Newman Keuls. Os resultados foram reportados como média \pm S.E.M. Diferenças foram consideradas significantes para $p < 0,05$.

4. Protocolos experimentais

4.1. Ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com noradrenalina no NPBL combinada com prazosin i.p.

Ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL foram tratados com FURO (10 mg/kg de peso corporal) + CAP (5 mg/kg de peso corporal) sc. Injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol) ou salina foram feitas no NPBL 45 minutos após o tratamento FURO + CAP. Prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou salina foi injetado i.p. 15 minutos antes das injeções de noradrenalina ou salina no NPBL. A medida da ingestão de água e sódio foi realizada a cada trinta minutos durante 180 minutos, começando 15 minutos após as injeções no NPBL (ver o esquema abaixo).

Para testar os efeitos da noradrenalina no NPBL combinada com prazosin i.p., os ratos tratados com FURO + CAP receberam as seguintes combinações de tratamentos: salina i.p. + salina no LPBN; salina i.p. + noradrenalina no LPBN; prazosin i.p. + salina no LPBN; prazosin i.p. + noradrenalina no LPBN. Em cada teste, depois do tratamento com FURO + CAP, os grupos de ratos foram divididos em dois e a metade do grupo recebeu um tratamento descrito acima e a outra metade dos animais recebeu o outro tratamento no NPBL. A sequência das combinações de tratamentos no mesmo rato nos diferentes testes foi aleatória e no final de 4 testes todos os ratos receberam todas as combinações de tratamentos.



4.2. Ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com fenilefrina no NPBL.

Ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL foram tratados com FURO (10 mg/kg de peso corporal) + CAP (5 mg/kg de peso corporal) sc. Injeções bilaterais de fenilefrina (80 nmol) ou salina foram feitas no NPBL 45 minutos após o tratamento FURO + CAP. A medida da ingestão de água e sódio foi realizada a cada trinta minutos durante 120 minutos, começando 15 minutos após as injeções no NPBL.

Para este estudo, os ratos foram divididos em 2 subgrupos e submetidos a 2 testes. Em cada teste, um subgrupo recebeu fenilefrina e o outro recebeu salina no NPBL de forma contrabalanceada. O intervalo entre os testes foi de 48 horas.

4.3. Respostas cardiovasculares produzidas por noradrenalina ou fenilefrina injetada no NPBL ou em estruturas pontinas ao redor do NPBL

Ratos normotensos, repletos e não anestesiados com implante de cânulas de aço inoxidável na região do NPBL, bem como o implante de cânulas de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) na artéria e veia femorais foram utilizados. Após um período controle de registro da PAM e FC, (em torno de 20 minutos), os ratos receberam injeções unilaterais ou bilaterais de salina ou noradrenalina em diferentes doses (10, 20, 40 nmol/0,2 µl) no NPBL e o registro continuou por mais 30 minutos. Cada rato recebeu pelo menos 3 doses de

noradrenalina no NPBL com intervalo de 4 horas entre duas injeções. A sequência das diferentes doses de noradrenalina no NPBL foi randomizada.

Um grupo diferente de ratos repletos recebeu injeção unilateral de salina, fenilefrina (80 nmol/0,2 µl) ou noradrenalina (20 nmol/0,2 µl) no NPBL seguindo o mesmo protocolo da noradrenalina descrito acima.

Depois das análises histológicas, os resultados dos ratos que receberam injeção de noradrenalina em sítios fora do NPBL também foram analisados para comparar os efeitos das injeções direcionadas corretamente no NPBL.

4.4. Respostas cardiovasculares da noradrenalina injetada no NPBL combinada com prazosin i.p.

Ratos normotensos, repletos e não anestesiados com implante de cânulas de aço inoxidável na região do NPBL, bem como o implante de cânulas de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) na artéria foram utilizados. Após um período controle de registro da PAM e FC, (em torno de 20 minutos), prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou salina foram injetados i.p. 15 minutos antes das injeções unilaterais de noradrenalina (20 nmol/0,2 µl) no NPBL. PAM e FC foram registrados por um período de 30 min após as injeções de noradrenalina. PAM e FC foram registradas em duas diferentes sessões com um intervalo de 24 horas entre elas. Em uma sessão os ratos receberam injeções de salina e na outra injeção de prazosin i.p. antes de noradrenalina. A ordem das injeções de salina ou prazosin i.p. em cada sessão foi randomizada.

Para confirmar que prazosin também era capaz de abolir os efeitos de noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) injetada no NPBL nos testes comportamentais, ratos tratados com FURO + CAP receberam injeções de salina e noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) no NPBL 40 e 45 minutos após o tratamento FURO + CAP. Prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou salina foi injetado i.p. 15 minutos antes das injeções de noradrenalina no NPBL. PAM e FC foram registradas por um período adicional de 30 minutos depois das injeções de noradrenalina. PAM e FC foram registradas no mesmo grupo de ratos em duas diferentes sessões com um intervalo de 24 horas entre elas. Em uma das sessões os ratos receberam injeções de prazosin i.p. e em outra de salina i.p. A ordem das injeções de salina ou prazosin i.p. em cada sessão em diferentes ratos foi randomizada.

4.5. Respostas cardiovasculares da noradrenalina injetada no NPBL de ratos tratados com hexametônio combinado com antagonista de receptores de vasopressina injetado i.v.

Ratos normotensos, repletos e não anestesiados com implante de cânulas de aço inoxidável no VL e bilateralmente no NPBL, bem como o implante de cânulas de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) na artéria e veia femorais foram utilizados. Após um período controle de registro da PAM e FC, (em torno de 20 minutos), os ratos receberam injeções de salina i.v. ou do antagonista de vasopressina (Composto de Manning, 10 µg/kg de peso corporal) combinado injeções i.v. de hexametônio (30 mg/kg de peso corporal). Dez e quinze minutos após os animais receberam injeções unilaterais de salina e noradrenalina (20 nmol/0,2 µl) no NPBL, respectivamente. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os ratos receberam injeções i.c.v. de carbacol (4 nmol/1 µl). PAM e FC foram registradas por mais 15 minutos após as injeções de carbacol. PAM e FC foram registradas em duas diferentes sessões com um intervalo de 24 h entre elas. Em uma das sessões os ratos receberam injeções de salina i.v. e na outra a combinação do antagonista de receptores vasopressinérgicos combinado com hexametônio i.v. antes de noradrenalina. A ordem das injeções i.v. nos ratos em cada sessão foi randomizada.

Antes das injeções i.v. do antagonista vasopressinérgico combinado com hexametônio e depois das injeções de noradrenalina no NPBL, os animais receberam injeções de vasopressina (12,5 ng/ 0,1 ml/ rato) para confirmar o bloqueio do receptor vasopressinérgico.

4.6. Análise microestrutural de lambidas na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de noradrenalina no NPBL

Em ratos Sprague Dawley foi realizado o mesmo protocolo descrito no item 4.1. No entanto, neste protocolo foi utilizado um contador de lambidas e a medida do volume de água ou NaCl 1,8% foi feita através da pesagem das garrafas que continham os líquidos, antes e após os experimentos.

4.7. Análise microestrutural de lambidas na ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de moxonidina no NPBL

Ratos Sprague Dawley com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL foram tratados com FURO (10 mg/kg de peso corporal) + CAP (5 mg/kg de peso corporal) sc. Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 µl) ou salina foram feitas no NPBL 45

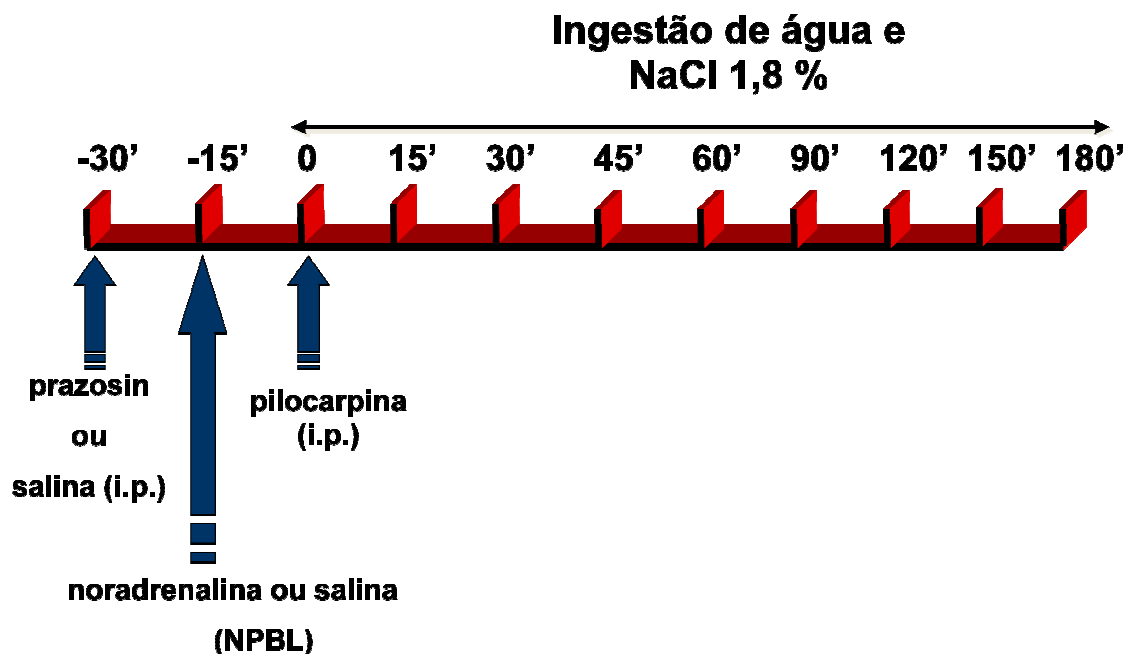
minutos após o tratamento FURO + CAP. A medida da ingestão de água e sódio foi realizada antes e após os experimentos, começando 15 minutos após as injeções no NPBL, através da pesagem das garrafas que continham os líquidos.

Para testar os efeitos da moxonidina no NPBL, os ratos tratados com FURO + CAP receberam as seguintes combinações de tratamentos: salina ou moxonidina no LPBN. Em cada teste, depois do tratamento com FURO + CAP, os grupos de ratos foram divididos em dois e a metade do grupo recebeu um tratamento descrito acima e a outra metade dos animais recebeu o outro tratamento no NPBL. A sequência das combinações de tratamentos no mesmo rato nos diferentes testes foi aleatória e no final de 2 testes todos os ratos receberam todas as combinações de tratamentos.

4.8. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com noradrenalina combinada com prazosin i.p. em ratos tratados com pilocarpina i.p.

Ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL foram tratados com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou salina i.p. e após 15 minutos foram feitas injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) ou salina no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, foram feitas injeções de pilocarpina i.p. e buretas contendo água e NaCl 1,8% foram oferecidas. A medida da ingestão de água e sódio foi realizada a cada trinta minutos durante 180 minutos, quinze minutos após as injeções no NPBL (ver o esquema abaixo).

Para este estudo, os ratos foram submetidos a 4 testes com um intervalo de pelo menos 48 h entre eles. Em cada teste, o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um das seguintes combinações de tratamentos: 1) prazosin i.p. + salina NPBL + pilocarpina i.p.; 2) prazosin i.p. + noradrenalina NPBL + pilocarpina i.p.; 3) salina i.p. + noradrenalina NPBL + pilocarpina i.p. 4) salina i.p. + salina no NPBL + pilocarpina i.p. A sequência das combinações de tratamentos no mesmo rato nos diferentes testes foi aleatória e no final de 4 testes todos os ratos receberam todas as combinações de tratamentos. O intervalo mínimo de 48 horas entre cada teste.



4.7. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com moxonidina combinada com pilocarpina i.p.

Ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL foram tratados injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou veículo no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, foram feitas injeções de pilocarpina i.p. e buretas contendo água e NaCl 1,8% foram oferecidas. A medida da ingestão de água e sódio foi realizada a cada trinta minutos durante 180 minutos, quinze minutos após as injeções no NPBL.

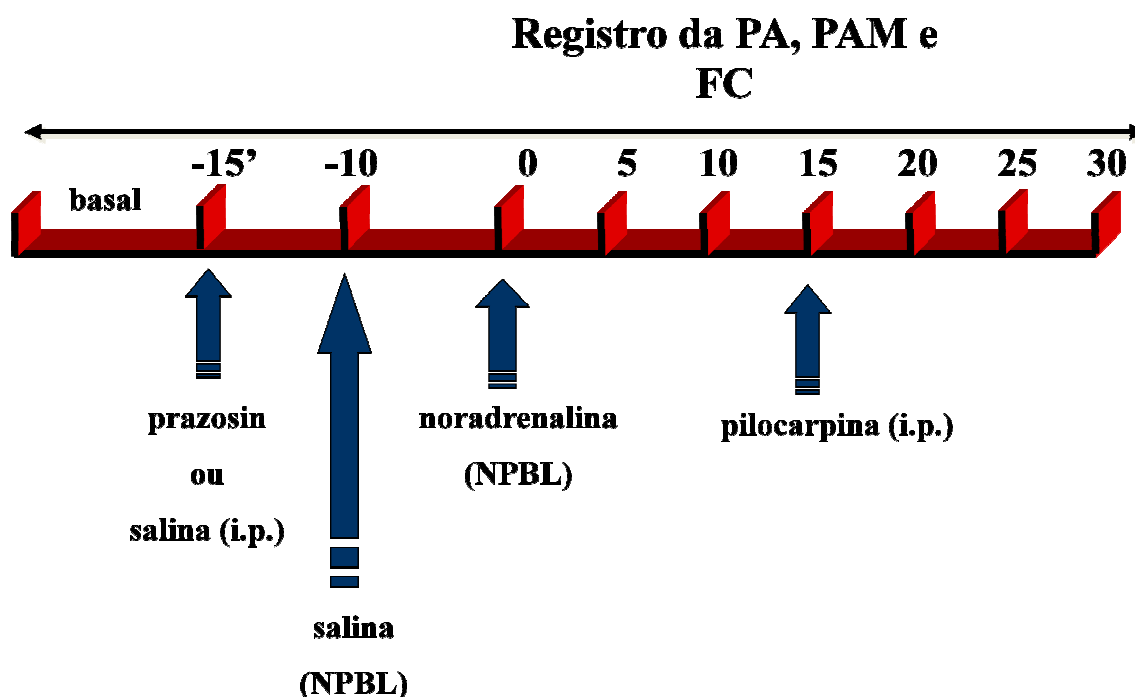
Para este estudo, os ratos foram divididos em 2 subgrupos e submetidos a 2 testes. Em cada teste, um subgrupo recebeu moxonidina no NPBL + pilocarpina i.p. e o outro recebeu veículo no NPBL + pilocarpina i.p. de forma contrabalanceada. O intervalo entre os testes foi de 48 horas.

4.9. Respostas cardiovasculares produzidas por injeções noradrenalina no NPBL combinada com prazosin i.p. em ratos tratados com pilocarpina i.p.

Ratos normotensos, repletos e não anestesiados com implante de cânulas de aço inoxidável na região do NPBL, bem como o implante de cânulas de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) na artéria femoral foram utilizados. Após um período controle de registro da PAM e FC, (em torno de 20 minutos), os ratos receberam injeções de salina ou prazosin (1

mg/kg de peso corporal) i.p. Cinco e quinze minutos após, os ratos receberam injeções bilaterais de salina e noradrenalina (80 nmol) no NPBL, respectivamente. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os animais receberam injeções de pilocarpina i.p. Foi feito o registro da PAM e FC por mais 30 minutos após a última injeção.

Cada rato foi submetido a duas sessões de registro da PAM e FC com um intervalo de 24 h entre elas. Em uma das sessões foi injetado prazosin i.p. e na outra sessão foi injetada salina i.p. antes das injeções no NPBL.



4.10. Respostas cardiovasculares produzidas por injeções moxonidina no NPBL em ratos tratados com pilocarpina i.p.

Ratos normotensos, repletos e não anestesiados com implante de cânulas de aço inoxidável na região do NPBL, bem como o implante de cânulas de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) na artéria femoral foram utilizados. Após um período controle de registro da PAM e FC, (em torno de 20 minutos), os ratos receberam injeções de salina ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os animais receberam injeções de pilocarpina i.p. Foi feito o registro da PAM e FC por mais 30 minutos após a última injeção.

Cada rato foi submetido a duas sessões de registro da PAM e FC com um intervalo de 24 h entre elas. Em uma das sessões foi injetado salina e outra sessão foi injetada moxonidina no NPBL.

4.11. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com bloqueio de receptores adrenérgicos α_1 tratados com injeções de noradrenalina no NPBL combinadas com carbacol i.c.v.

Ratos com cânulas implantadas bilateralmente no NPBL foram tratados com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou salina i.p. e após 15 minutos foram feitas injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) ou salina no NPBL. Quinze minutos após as injeções no NPBL, foram feitas injeções de carbacol i.c.v. e buretas contendo água e NaCl 1,8% foram oferecidas. A medida da ingestão de água e sódio foi realizada a cada trinta minutos durante 180 minutos, quinze minutos após as injeções no NPBL.

Para este estudo, os ratos foram submetidos a 4 testes com um intervalo de pelo menos 48 h entre eles. Em cada teste, o grupo de ratos foi dividido em dois e cada metade do grupo recebeu um das seguintes combinações de tratamentos: 1) prazosin i.p. + salina NPBL + carbacol i.c.v. 2) prazosin i.p. + noradrenalina NPBL + carbacol i.c.v. 3) salina i.p. + noradrenalina NPBL + carbacol i.c.v. 4) salina i.p. + salina no NPBL + carbacol i.c.v. A sequência das combinações de tratamentos no mesmo rato nos diferentes testes foi aleatória e no final de 4 testes todos os ratos receberam todas as combinações de tratamentos. O intervalo mínimo de 48 horas entre cada teste.

4.12. Respostas cardiovasculares produzidas pela combinação de noradrenalina injetada no NPBL combinadas com carbacol i.c.v. em ratos com bloqueio receptores adrenérgicos α_1 .

Ratos normotensos, repletos e não anestesiados com implante de cânulas de aço inoxidável na região do NPBL, bem como o implante de cânulas de polietileno (PE-10 conectado a PE-50) na artéria e veia femorais foram utilizados. Após um período controle de registro da PAM e FC, (em torno de 20 minutos), os ratos receberam injeções de salina ou prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. Cinco e quinze minutos após, os ratos receberam injeções bilaterais de salina e noradrenalina (80 nmol) no NPBL, respectivamente. Quinze minutos após as injeções no NPBL, os animais receberam injeções de carbacol i.c.v. Foi feito o registro da PAM e FC por mais 30 minutos após a última injeção.

Cada rato foi submetido a duas sessões de registro da PAM e FC com um intervalo de 24 h entre elas. Em uma das sessões foi injetado prazosin i.p. e na outra sessão foi injetada salina i.p. antes das injeções no NPBL.

5. Resultados

5.1. Análise histológica

Os pontos de injeção localizaram-se principalmente nas porções centro lateral e dorso lateral do NPBL [vide Fulwiler e Saper para definições dos subnúcleos do NPBL (FULWILER e SAPER, 1984)]. Os pontos de injeção no NPBL nos ratos testados no presente estudo são similares àqueles em que estudos anteriores mostraram os efeitos de metisergida, moxonidina e noradrenalina no NPBL sobre a ingestão de água e sódio (MENANI e JOHNSON, 1995; MENANI, THUNHORST e JOHNSON, 1996; MENANI, DE LUCA e JOHNSON, 1998; MENANI *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2004; GASPARINI *et al.*, 2009) (Figura 5A).

Os resultados com injeções fora do NPBL também foram analisados. As figuras 5B a 5G ilustram os pontos de injeções mais comuns fora do NPBL.

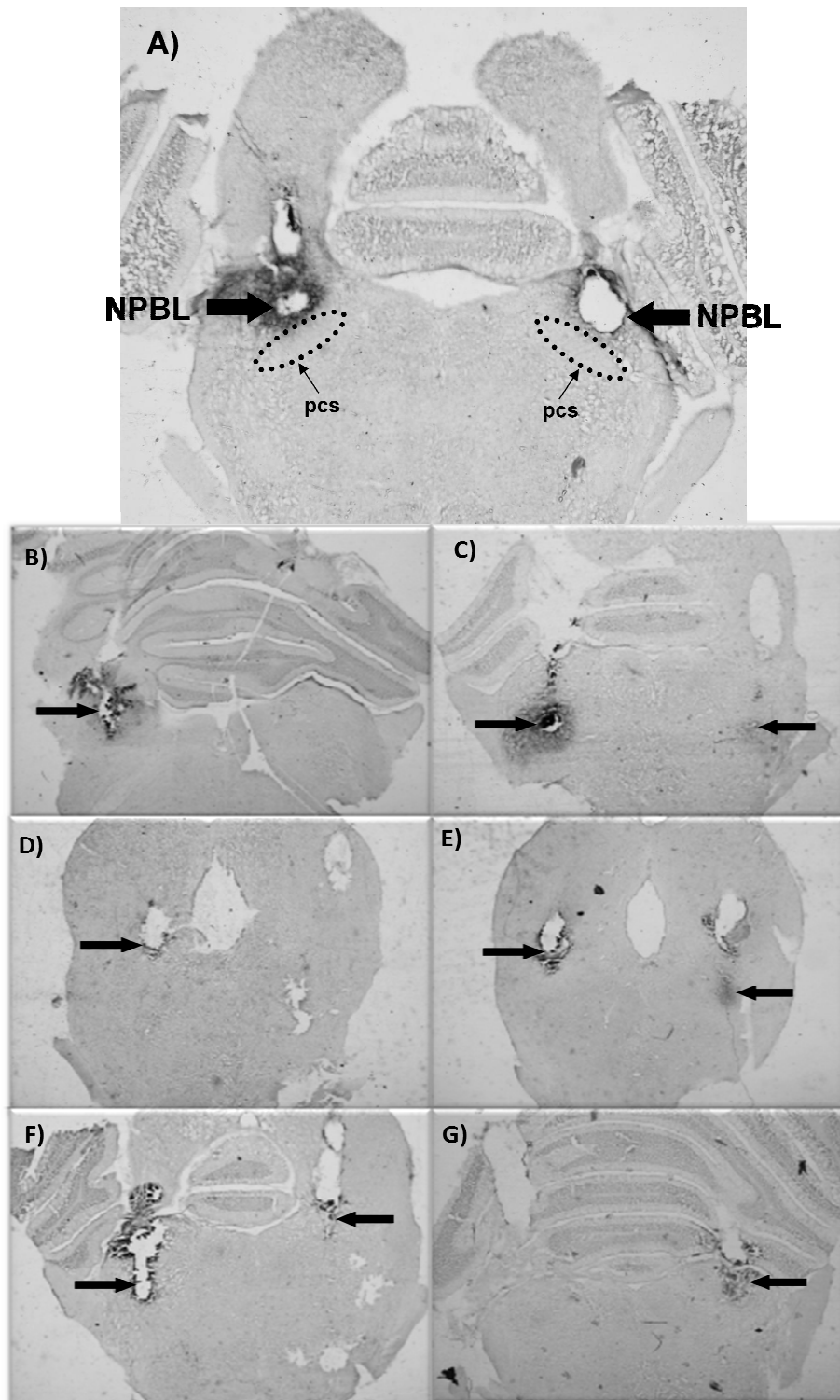


Figura 5: Fotomicrografia de cortes transversais do encéfalo de ratos mostrando (A) injeções no NPBL e (B, C, D, E, F e G) injeções em sítios fora do NPBL (setas). p.c.s. pedúnculo cerebelar superior.

5.2. Ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com fenilefrina ou noradrenalina no NPBL combinadas com prazosin i.p.

Injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 1,8% induzida pelo tratamento FURO + CAP [$F(3,30) = 5,89$; $p < 0,05$] (Figura 2A) e reduziram a ingestão de água nos primeiros 90 minutos do teste [$F(3,30) = 5,69$; $p < 0,05$] (Figura 6B). Quando os ratos foram tratados previamente com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p., as injeções bilaterais de noradrenalina no NPBL produziram um aumento maior da ingestão de NaCl 1,8% e, em adição, também aumentaram a ingestão de água (Figura 6B).

Injeções de prazosin i.p. sozinho em ratos normohidratados e saciados ou tratados com FURO + CAP não alteraram a ingestão de NaCl 1,8%, entretanto, aumentaram a ingestão de água (Figura 6, Tabela 1).

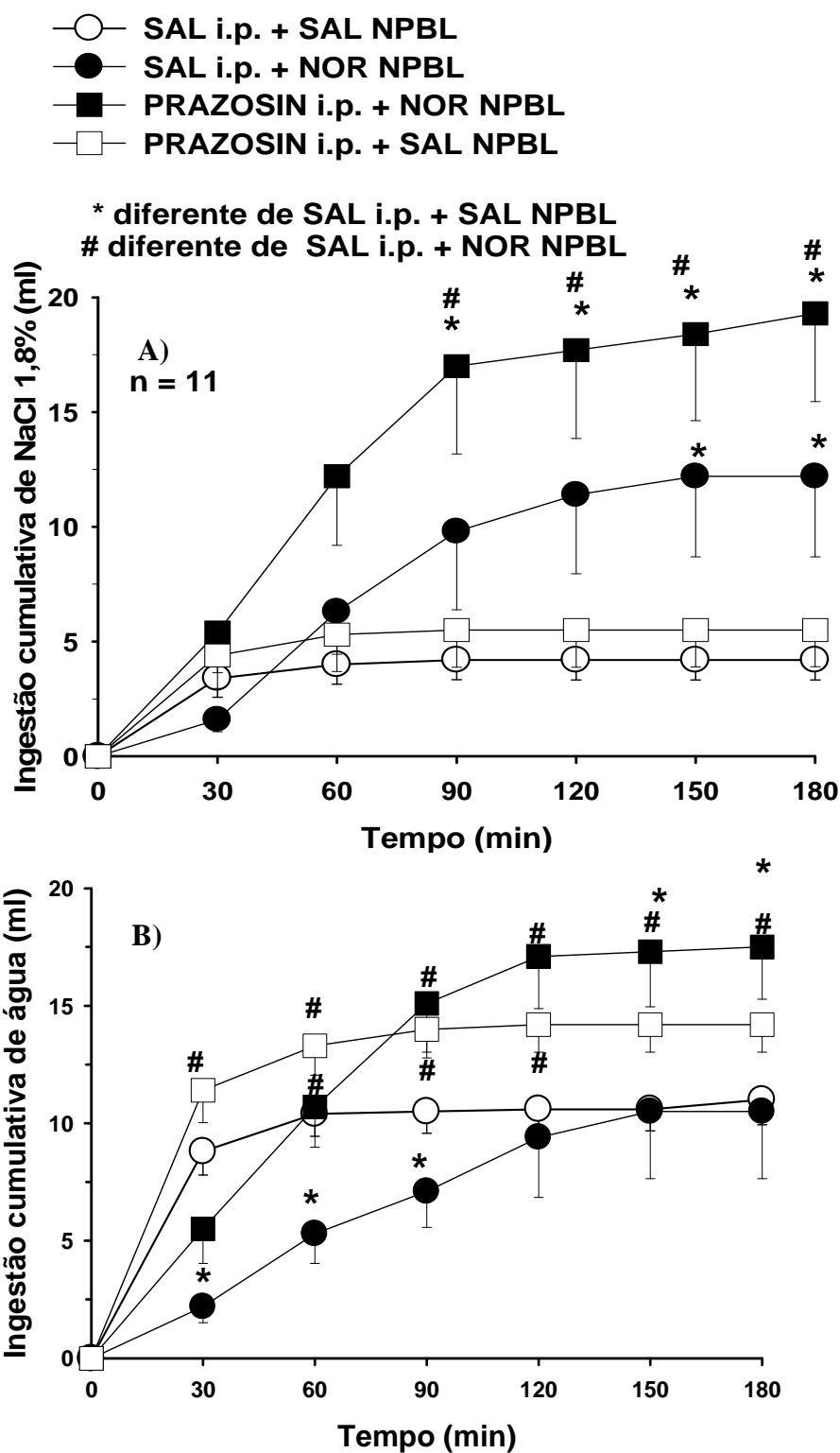


Figura 6: Ingestão cumulativa de NaCl 1,8% (A) e água (B) induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL combinada com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p. Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais

Tabela 1: Ingestão cumulativa de água e NaCl 1,8% NaCl em ratos normohidratados e saciados tratados com injeções bilaterais de noradrenalina ou salina no NPBL combinado com prazosin ou salina i.p.

Tratamentos	Ingestão de NaCl 1.8% (ml/2 h)	Ingestão de água (ml/2 h)
SAL i.p. + SAL NPBL	0,6 ± 0,3	0,9 ± 0,6
SAL i.p. + NOR NPBL	0,3 ± 0,2	0,3 ± 0,2
PRAZOSIN i.p. + SAL NPBL	0,7 ± 0,3	2,8 ± 0,6*
PRAZOSIN i.p. + NOR NPBL	1,5 ± 0,9	2,2 ± 0,7

Os resultados estão reportados como média ± EPM. Número de animais = 6. Noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 µl); prazosin (1 mg/kg de peso corporal); salina (SAL). * Diferente de SAL + SAL.

5.3. Ingestão de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com fenilefrina no NPBL.

Injeções bilaterais de fenilefrina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 1,8% [F(1,5) = 0,00015; p > 0,05]. Entretanto, injeções de fenilefrina no NPBL reduziram a ingestão de água induzida pelo tratamento FURO + CAP nos primeiros 30 minutos do teste (1,2 \pm ml/30 min vs. salina 8,8 \pm ml/30 min) [F (3,15) = 20,00; p < 0.05] (Tabela 2).

Tabela 2: Ingestão cumulativa de água e NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP em ratos tratados com injeções de fenilefrina no NPBL.

	Ingestão cumulativa de NaCl 1.8% (ml)			
	30	60	90	120 min
Salina	5,3 \pm 1,5	6,4 \pm 2,3	6,6 \pm 1,6	6,9 \pm 1,4
Fenilefrina	1,4 \pm 1	6,3 \pm 2,3	8,1 \pm 2,6	9,2 \pm 2,9

	Ingestão cumulativa de água (ml)			
	30	60	90	120 min
Salina	8,8 \pm 1,2	11,7 \pm 0,8	12 \pm 0,6	12,0 \pm 0,6
Fenilefrina	2,3 \pm 1,1*	9,5 \pm 1,6	11,6 \pm 1,5	12,6 \pm 2,0

Os resultados estão reportados como média \pm EPM. Número de animais = 6. Fenilefrina (80 nmol/0,2 μ l). * Diferente de SAL.

5.4. Respostas cardiovasculares produzidas por noradrenalina ou fenilefrina injetada no NPBL em estruturas pontinas ao redor do NPBL

Em ratos normotensos, normohidratados e saciados (PAM basal 107 ± 2 mmHg e FC basal 381 ± 27 bpm), a injeção unilateral de noradrenalina (15, 20 ou 40 nmol/0,2 μ l) ou injeções bilaterais de noradrenalina (20 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram a PAM [F(6, 63) = 13,91; $p < 0,05$] (Figura 7A). A injeção unilateral de noradrenalina (20 ou 40 nmol/0,2 μ l) ou injeções bilaterais de noradrenalina (20 nmol/0,2 μ l) no NPBL também reduziram a FC [F(6, 63) = 13,14; $p < 0,05$] (Figura 7B e 8A). A injeção unilateral de noradrenalina (20 ou 40 nmol/0,2 μ l) ou injeções bilaterais de noradrenalina (20 nmol/0,2 μ l) no NPBL produziram efeitos similares na PAM.

Injeções unilaterais de noradrenalina (20 nmol/0,2 μ l) fora do NPBL também aumentaram a PAM e diminuíram a FC de forma semelhante à injeção no NPBL (Figura 7A e 8B). A injeção i.v. de noradrenalina (20 nmol/0,1 ml/rato) também aumentou a PAM (73 ± 7 , vs. salina i.v.: 3 ± 3 mmHg) [F(1, 9) = 71,85; $p < 0,05$] e diminuiu a FC (-167 ± 27 , vs. salina i.v.: -5 ± 9 bpm) [F(1, 9) = 25,85; $p < 0,05$] similar aos efeitos das injeções centrais da mesma dose de noradrenalina.

A injeção i.v. de noradrenalina (20 nmol/0,1 ml/rato) também aumentou a PAM (73 ± 7 , vs. salina i.v.: 3 ± 3 mmHg) [F(1, 9) = 71,85; $p < 0,05$] e diminuiu a FC (-167 ± 27 , vs. salina i.v.: -5 ± 9 bpm) [F(1, 9) = 25,85; $p < 0,05$] similar aos efeitos produzidos por injeções centrais na mesma dose de noradrenalina.

Injeções uni ou bilaterais de fenilefrina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL não alteram a PAM nem a FC (Tabela 3). Entretanto, injeções uni ou bilaterais de noradrenalina (20 nmol/0,2 μ l) no NPBL nos mesmos animais aumentaram a PAM [F(4, 28) = 17,88; $p < 0,05$] e diminuíram a FC (4, 28) = 4,40; $p < 0,05$] (Tabela 3).

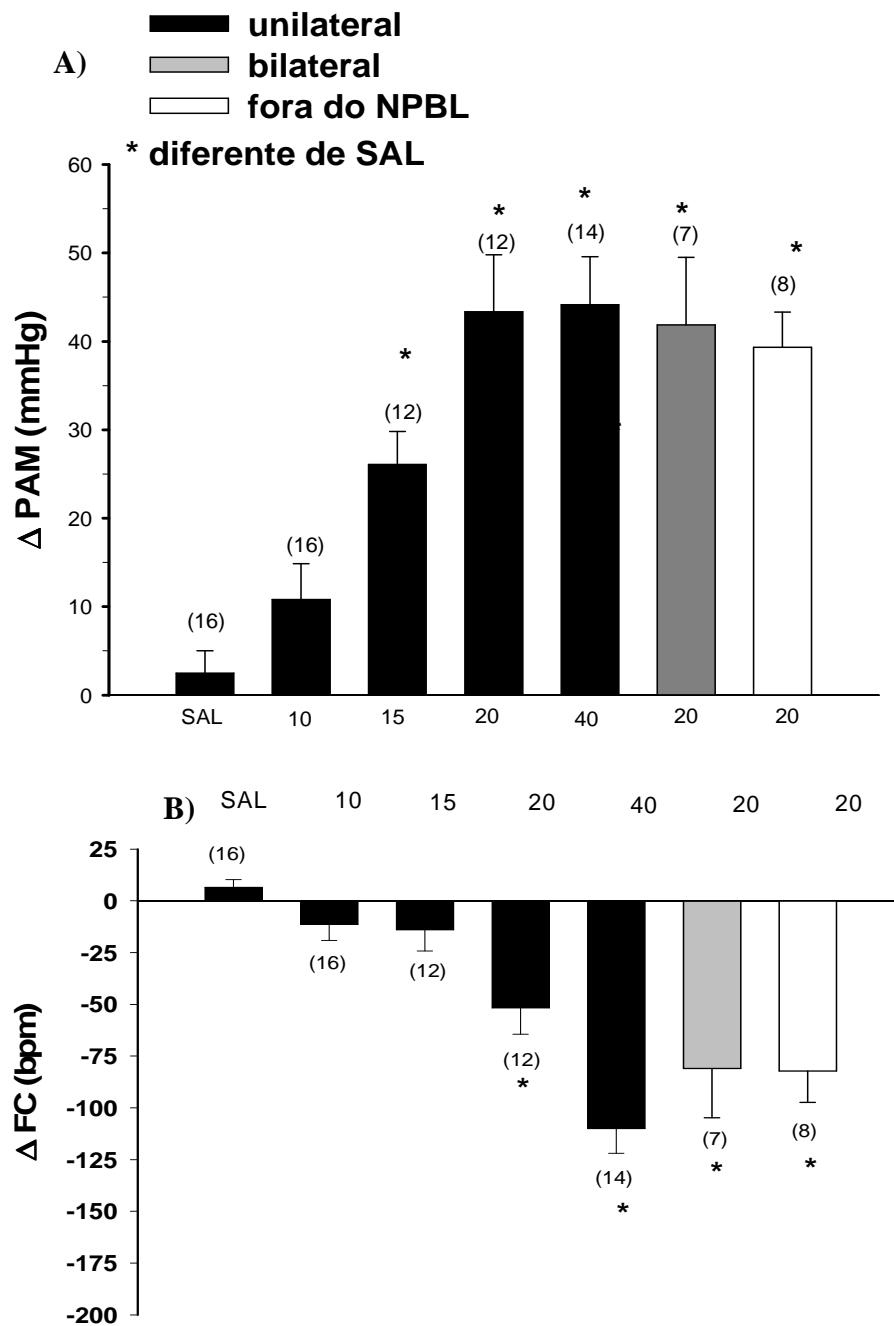


Figura 7: Variações na (A) PAM e (B) FC produzidas por injeções uni ou bilaterais de salina (SAL) ou noradrenalina (NOR, 10, 15, 20 ou 40 nmol/0,2 μ l) no NPBL ou fora do NPBL. Os resultados estão reportados como média \pm EPM. O número de animais está indicado acima de cada barra.

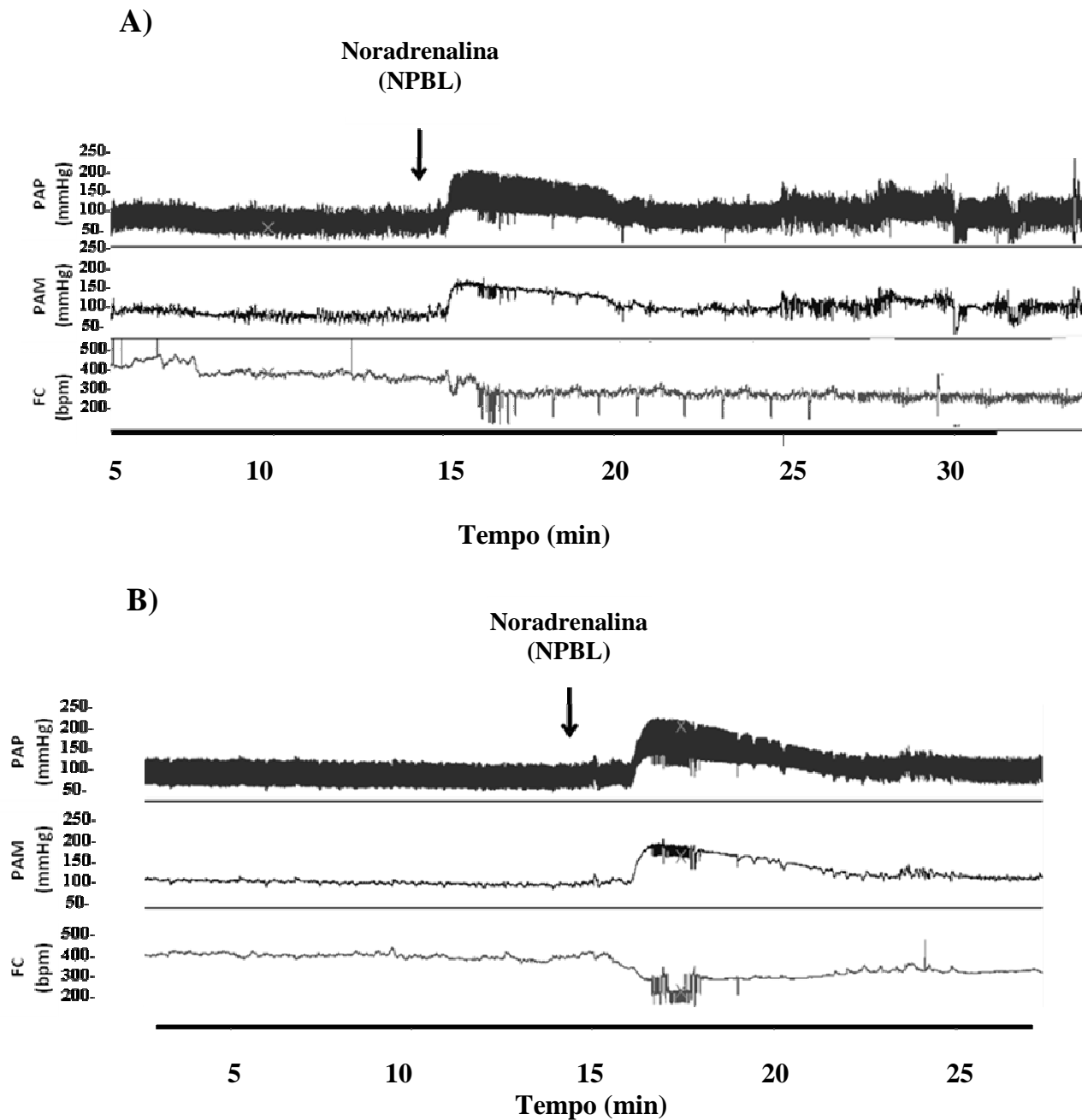


Figura 8: Traçados representativos mostrando as variações na PAP, PAM e FC produzidas pelas injeções unilaterais noradrenalina (NOR, 20 nmol/0,2 μ l) no NPBL (A) ou fora do NPBL (B) de diferentes ratos.

Tabela 3: Variações na PAM e FC produzidas por injeções unilaterais ou bilaterais de fenilefrina, noradrenalina ou salina no NPBL em ratos normohidratados e saciados.

Tratamentos	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)
Salina	1 ± 3	-23 ± 16
Fenilefrina unilateral	10 ± 3	7 ± 12
Fenilefrina bilateral	12 ± 4	-23 ± 20
Noradrenalina unilateral	$48 \pm 5^*$	$-109 \pm 29^*$
Noradrenalina bilateral	$42 \pm 7^*$	$-86 \pm 30^*$

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. Número de animais = 8. * diferente de salina. Fenilefrina (80 nmol/0,2 μ l), noradrenalina (20 nmol/0,2 μ l).

5.5. Respostas cardiovasculares produzidas pela noradrenalina injetada no NPBL combinada com prazosin i.p.

Em ratos normotensos e normohidratados e saciados, o tratamento prévio com prazosin i.p. aboliu a resposta pressora [$F(3, 15) = 19,25$; $p < 0,05$] (Figura 9A) e a bradicardia [$F(3, 15) = 10,96$; $p < 0,05$] (Figura 9B) produzida por noradrenalina (20 nmol/0,2 μ l) injetada no NPBL.

De maneira similar aos animais normohidratados e saciados, as injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 μ l) no NPBL em animais tratados com FURO + CAP s.c. também aumentaram a PAM [$F(3,15) = 38,53$; $p < 0,05$] e reduziram a FC [$F(3, 15) = 9,38$; $p < 0,05$] (Tabela 4). Injeções prévias de prazosin i.p. (1 mg/kg de peso corporal) também aboliram a resposta pressora e a bradicardia produzidas por injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 μ l) injetada no NPBL de ratos tratados com FURO + CAP s.c. (Tabela 4).

Injeções i.p. de prazosin diminuíram a PAM em animais normohidratados e saciados ou tratados com FURO + CAP (-11 ± 1 e -34 ± 3 mmHg, respectivamente, vs. salina i.p.: 2 ± 3 mmHg) [$F(2, 19) = 58,14$; $p < 0,05$]. Prazosin i.p. em animais normohidratados e saciados ou tratados com FURO + CAP aumentou a FC (95 ± 21 e 101 ± 10 bpm, respectivamente, v.s. salina i.p.: 20 ± 12 bpm) [$F(2, 19) = 4,02$; $p < 0,05$].

Os registros de PAP, PAM e FC de um rato representativo do grupo mostrando as respostas típicas produzidas pelas injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 μ l) no NPBL de animais tratados com FURO + CAP, antes e depois das injeções i.p. de prazosin estão representados na Figura 10.

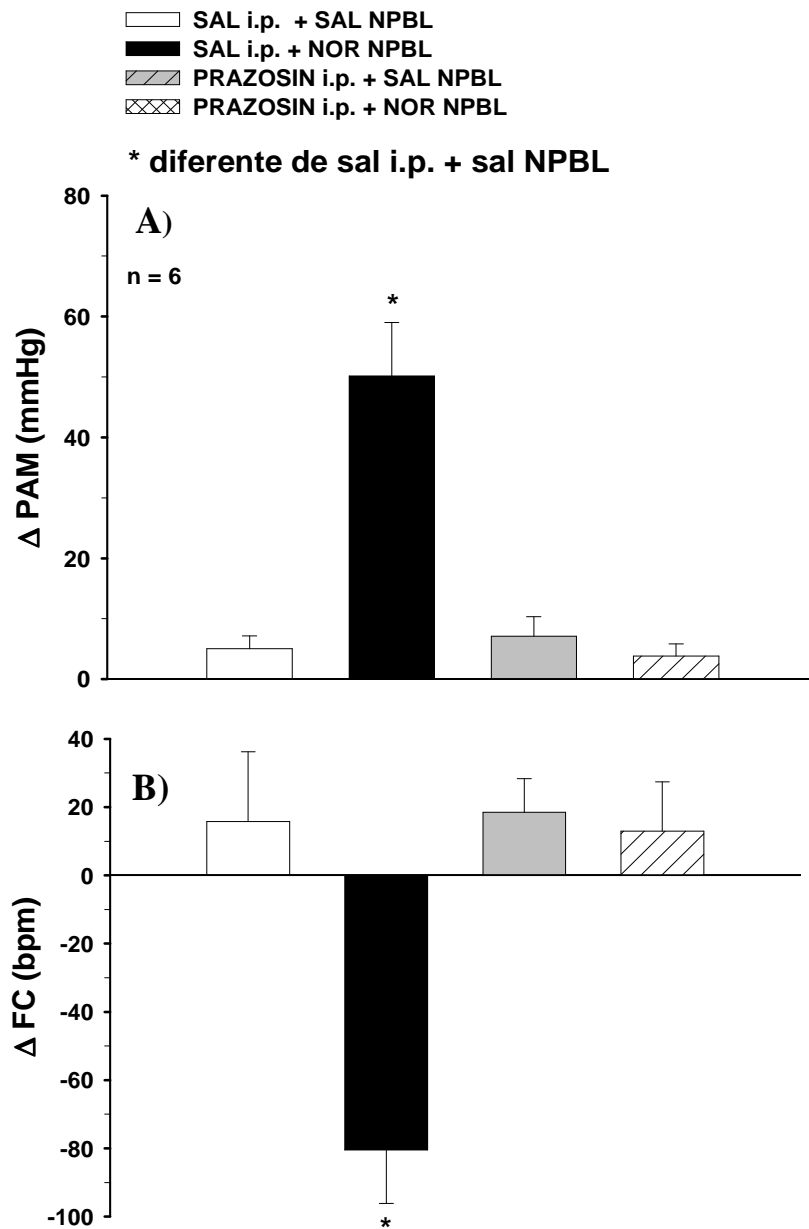


Figura 9: Variações na PAM e FC produzidas por injeções unilaterais de noradrenalina (NOR, 20 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL em animais normohidratados e saciados pré-tratados com prazosin ou salina i.p. Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais.

Tabela 4: Variações na PAM e FC produzidas por injeções bilaterais de noradrenalina ou salina no NPBL de ratos tratados com FURO + CAP s.c. + prazosin ou salina i.p.

Tratamentos	Δ PAM (mmHg)	Δ FC (bpm)
SAL i.p. + SAL LPBN	1 \pm 1	1 \pm 4
SAL i.p. + NOR LPBN	50 \pm 7*	-62 \pm 13*
Prazosin i.p. + NOR LPBN	9 \pm 4	-13 \pm 13
Prazosin i.p. + SAL LPBN	0.7 \pm 0.8	0.4 \pm 4

Os resultados estão expressos como média \pm EPM. Número de animais = 6. Prazosin (1 mg/kg de peso corporal.), noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 μ l), salina (SAL). * Diferente de SAL + SAL.

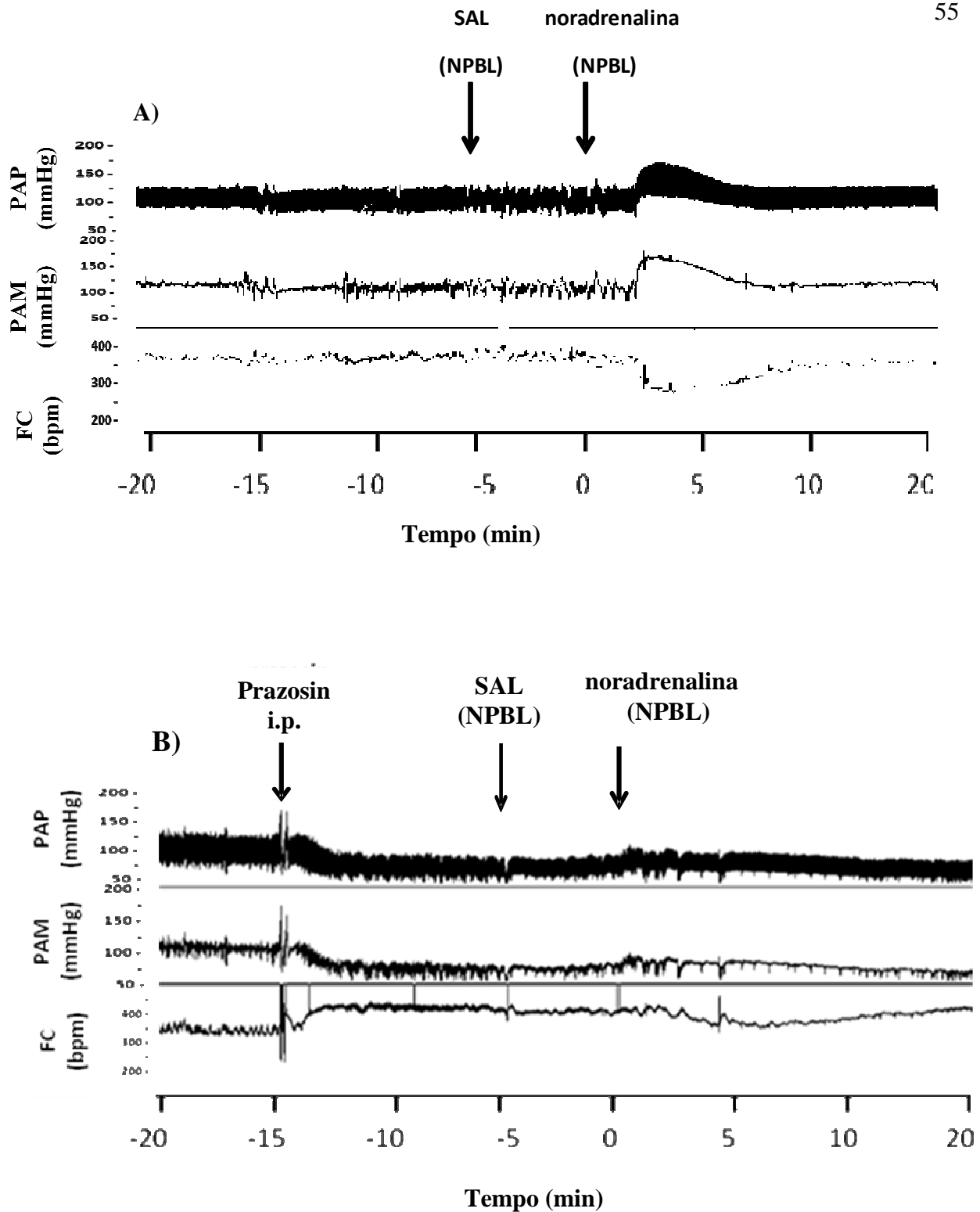


Figura 10: Traçados representativos mostrando as variações na PAP, PAM e FC produzidas pelas injeções bilaterais de salina (SAL) ou noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 μ l) no NPBL de um rato tratado com FURO + CAP sc + prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p.

5.6. Respostas cardiovasculares produzidas pela noradrenalina injetada no NPBL de ratos pré-tratados com hexametônio combinado com o antagonista de receptores de vasopressina injetados i.v.

Em ratos normotensos normohidratados e saciados, o tratamento com a injeção i.v. do antagonista de receptores vasopressinérgicos (Composto de Manning, 10 µg/kg de peso corporal) combinada com injeção de hexametônio (30 mg/kg de peso corporal) i.v. diminuiu a PAM basal (73 ± 4 mmHg, vs. PAM basal pré-tratamento: 113 ± 3 mmHg) [F (3, 15) = 19,25; $p < 0,05$] e aumentou a FC (479 ± 19 bpm, vs. FC basal pré-tratamento 403 ± 17 bpm) [F (3, 15) = 10,96; $p < 0,05$].

A resposta pressora da noradrenalina (20 nmol/0,2 µl) injetada unilateralmente no NPBL aumentou em ratos pré-tratados com antagonista de receptores vasopressinérgicos combinado com hexametônio i.v. [F (3, 12) = 15,83; $p < 0,05$] (Figura 11A). Entretanto, a bradicardia produzida por injeções de noradrenalina no NPBL foi abolida pelo pré-tratamento [F (3, 12) = 3,66; $p < 0,05$] (Figura 11B). Nos mesmos animais, o antagonista vasopressinérgico combinado com hexametônio i.v. aboliu a resposta pressora do carbachol (4 nmol/1 µl) injetado i.c.v. (Figura 11A), confirmando a eficiência dos bloqueios do simpático e vasopressinérgicos.

A resposta pressora da vasopressina i.v. (12,5 ng/rato) foi abolida pela injeção do antagonista de receptores vasopressinérgicos (2 ± 4 mmHg, vs. controle pré-antagonista: 36 ± 3 mmHg) o que confirma a eficiência do bloqueio dos receptores da vasopressina.

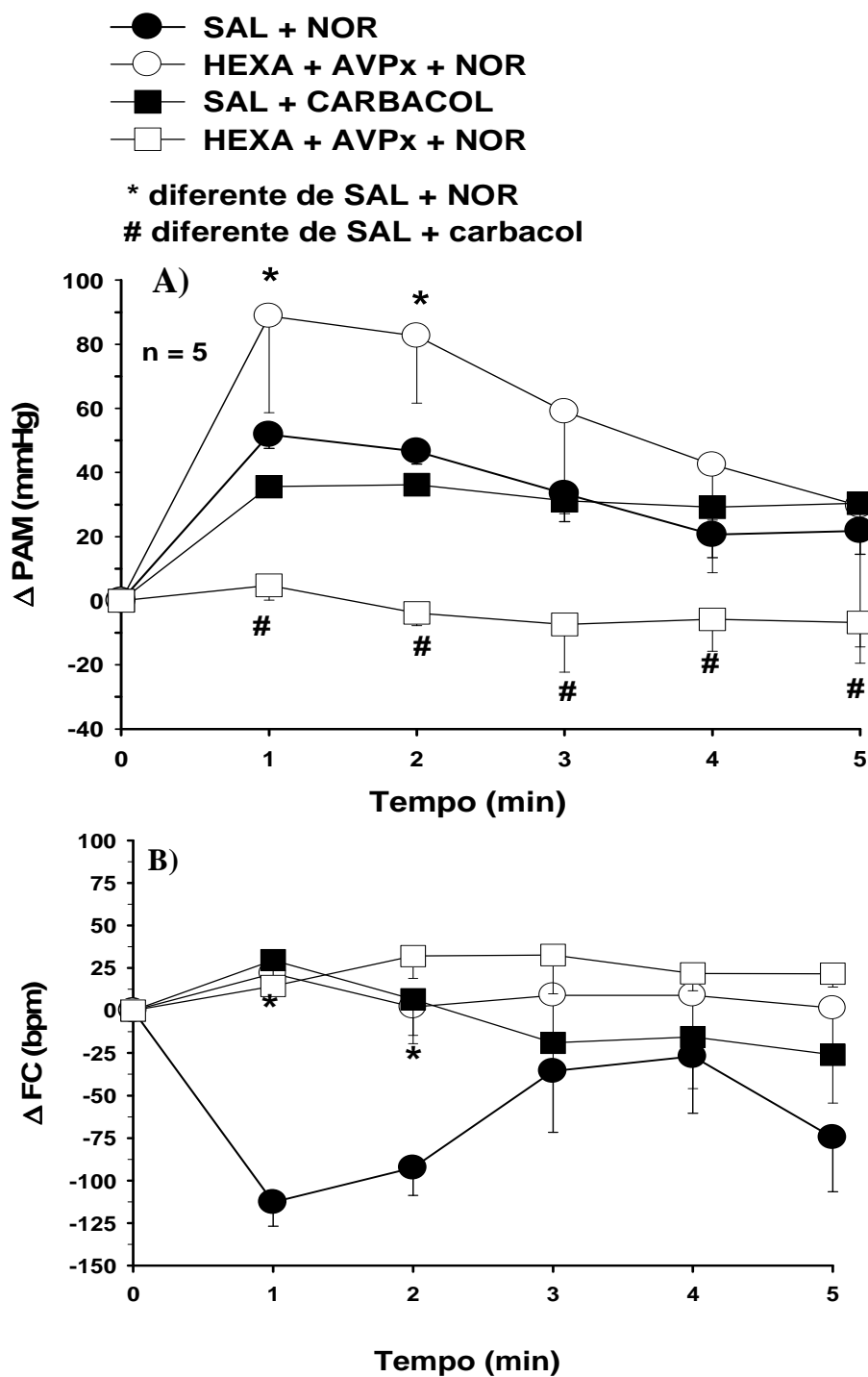


Figura 11: Variações na (A) PAM e (B) FC produzidas por injeções unilaterais de noradrenalina (NOR, 20 nmol/0,2 μ l) no NPBL ou carbaccol (4 nmol/1 μ l) i.c.v. em ratos pré-tratados com injeções de salina (SAL) ou hexametônio (HEXA, 30 mg/kg de peso corporal) + antagonista vasopressinérgico (AVPx, 10 μ g/kg de peso corporal) injetados i.v. Os resultados estão expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

5.7. Análise microestrutural das lambidas durante a ingestão de água e NaCl 1,8% dos ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de noradrenalina no NPBL sozinhas ou combinadas com prazosin i.p.

5.7.1. Volume total ingerido

As injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP [$F(3, 24) = 12,16; p < 0,05$] (Figura 12A), mas não alteraram a ingestão total de água [$F(3, 25) = 5,52; p < 0,05$] (Figura 12B). Injeções prévias de prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. produziram um aumento adicional na ingestão de NaCl 1,8% NaCl dos ratos tratados com noradrenalina no NPBL, mas não afetaram a ingestão de NaCl na ausência de noradrenalina (Figure 12A). Prazosin i.p. também aumentou a ingestão de água em comparação com tratamento com FURO + CAP combinado com noradrenalina ou salina no NPBL (Figura 12B).

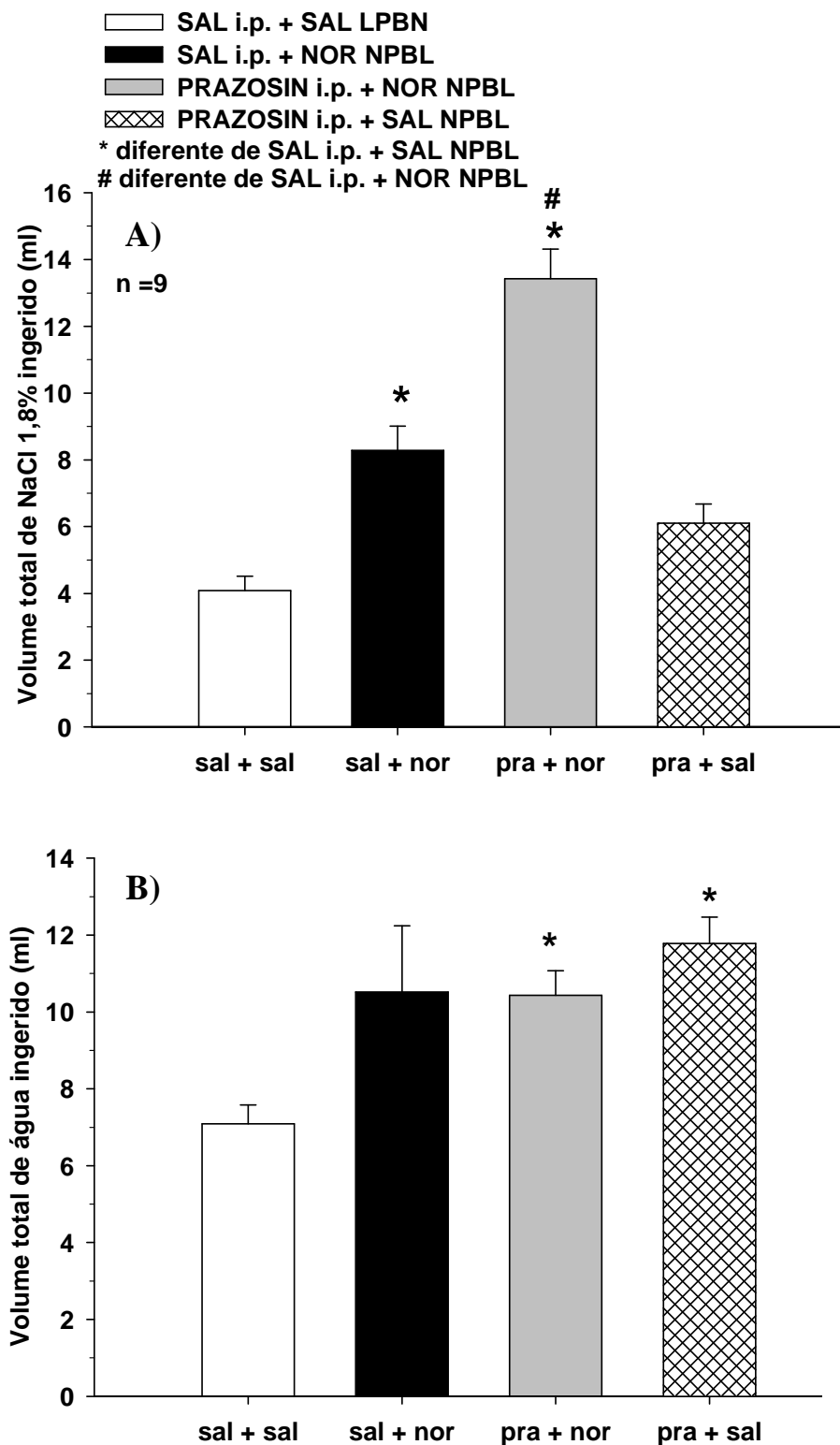
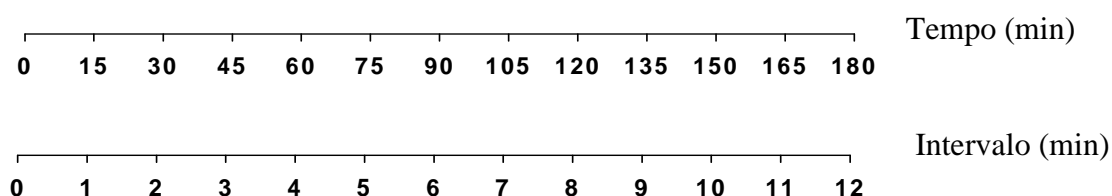


Figura 12: Volume total ingerido de NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p. Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais.

5.7.2. Número de lambidas por intervalo

Durante todo o teste a ingestão foi medida pelo peso das garrafas antes e depois dos testes enquanto o tempo de ingestão em cada teste foi determinado pelas lambidas. O tempo de ingestão foi dividido em intervalos de 15 min, como mostrado abaixo. O intervalo 1 corresponde ao tempo de 0 a 15 minutos, o intervalo 2 corresponde ao tempo de 15 a 30 minutos e assim sucessivamente, sendo um total de 180 minutos dividido em 12 intervalos.



Injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram o número de lambidas/intervalo para NaCl 1,8% entre 15 e 30 min de teste [$F(3, 24) = 5,38$; $p < 0,05$] (Figura 13A). O pré-tratamento com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. combinado com noradrenalina injetada no NPBL aumentou o número de lambidas/intervalo para NaCl 1,8% dos 30 aos 90 minutos de teste em comparação com o controle (salina i.p. + salina NPBL) ou com o tratamento com salina i.p. + noradrenalina no NPBL, porém promoveu redução do número de lambidas nos primeiros 15 minutos em comparação com o tratamento com salina i.p. + noradrenalina no NPBL (Figura 13A).

Injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram o número de lambidas/intervalo para a água nos entre 15 e 30 min de teste [$F(3, 24) = 6,35$; $p < 0,05$] (Figura 13B). Injeções prévias de prazosin i.p. combinadas com noradrenalina injetada no NPBL aumentaram o número de lambidas/intervalo para água entre 30 e 60 minutos de teste e também entre 75 e 90 minutos de teste comparando-se com o controle (salina i.p. + salina NPBL). Entre 30 e 60 minutos, injeções de prazosin i.p. combinadas com noradrenalina injetada no NPBL também aumentaram o número de lambidas/intervalo para a água comparando-se com o tratamento com salina i.p. + noradrenalina no NPBL (Figura 13B). Prazosin i.p. + salina no NPBL aumentaram o número de lambidas para água nos primeiros 15 minutos do teste.

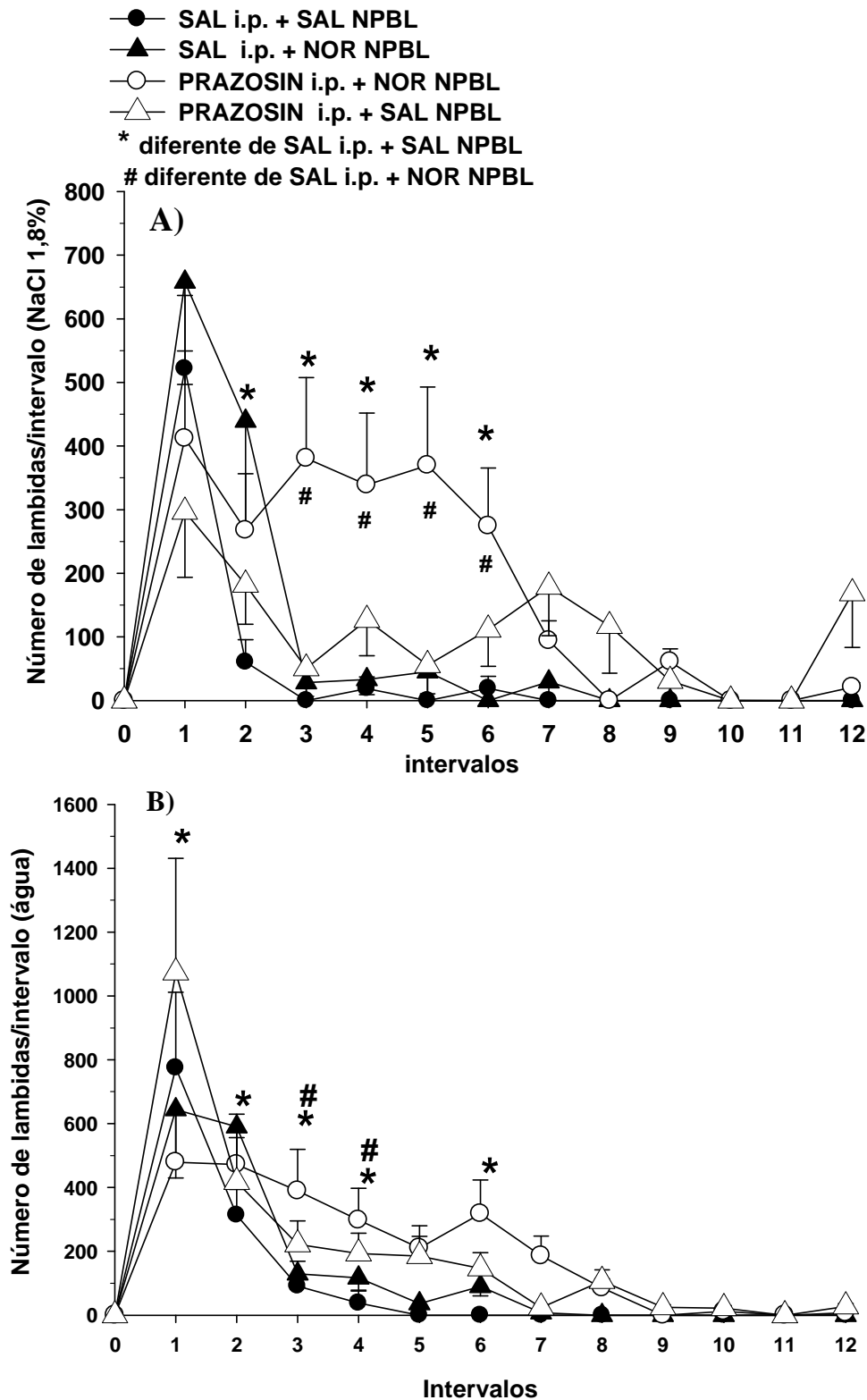


Figura 13: Número de lambidas/intervalo para (A) NaCl 1,8% e (B) água em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p. Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais.

5.7.3. Análise microestrutural de lambidas

Para avaliar a natureza dos sinais envolvidos na ingestão de água e NaCl, foi realizada uma análise no comportamento das lambidas e estudado o padrão do *burst*, sendo avaliadas as diferenças no número de *burst* ou no tamanho do *burst*.

Injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram o número de *burst/intervalo* para NaCl 1,8% aos dos 15 aos 30 min do teste [$F(3,24) = 3,16$; $p < 0,05$] (Figura 14A), sem alterar o número de lambidas/*burst* em animais tratados com FURO + CAP [$F(3, 24) = 4,16$; $p < 0,05$] (Figura 15A). As injeções de prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. combinadas com noradrenalina aumentaram o número de *bursts/intervalo* para NaCl 1,8% de 15 a 60 minutos do teste e também aumentaram o número de lambidas/*burst* para NaCl 1,8% de 30 a 45 minutos do teste (Figura 15A). O número de *bursts/intervalo* para NaCl 1,8% também aumentou entre 30 e 45 min com a mesma combinação de prazosin e noradrenalina quando se compara com o tratamento apenas com noradrenalina. Prazosin combinado com salina no NPBL aumentou o número de *bursts/intervalo* de 0 a 15 min assim como aumentou o número de lambidas/*burst* para o NaCl 1,8% entre 45 e 60 minutos e entre 90 e 105 minutos de testes (Figura 15A).

Injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) no NPBL aumentaram o número de *bursts/intervalo* para a ingestão de água de 30 aos 45 min [$F(3, 24) = 6,351$; $p < 0,05$] (Figura 14B). Entretanto, injeções de noradrenalina no NPBL combinadas com prazosin i.p. aumentaram o número de *bursts/intervalo* para água dos 15 aos 60 minutos do teste, um efeito que também foi diferente do tratamento apenas com noradrenalina no NPBL no mesmo período (Figura 14B). Nenhum tratamento modificou o número de lambidas/*burst* para água (Figura 15B).

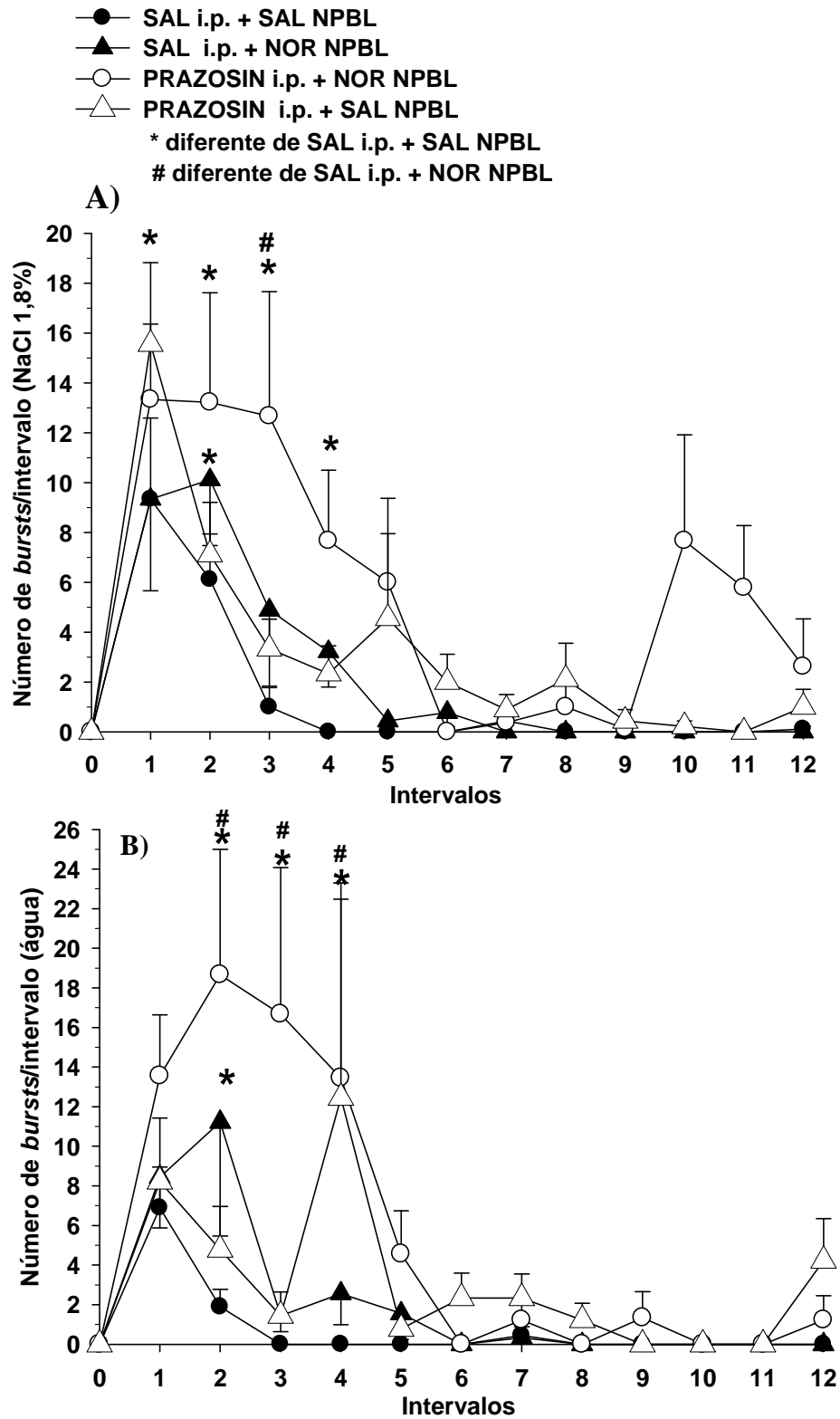


Figura 14: Número de *bursts*/intervalo para (A) NaCl 1,8% E (B) água em ratos tratados com FURO + CAP que receberam Injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p. Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais.

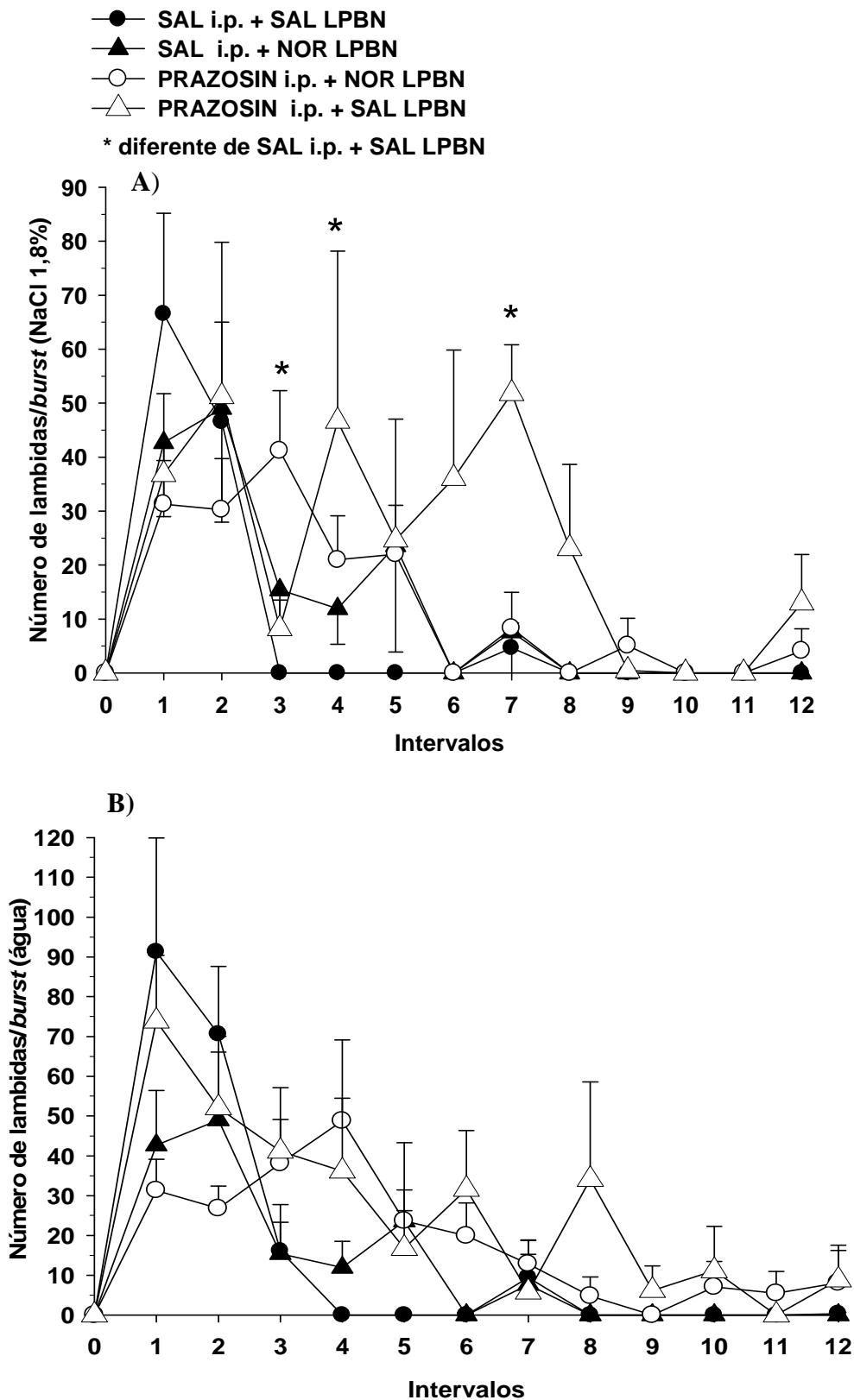


Figura 15: Número de lambidas/bursts para (A) NaCl 1,8% e (B) água em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções bilaterais de noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) ou SAL i.p. Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais.

5.8. Análise microestrutural das lambidas durante a ingestão de água e NaCl 1,8% dos ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de noradrenalina fora do NPBL sozinhas ou combinadas com prazosin i.p.

5.8.1. Volume total ingerido

A especificidade do NPBL como sítios onde as injeções de noradrenalina produzem efeitos na ingestão de NaCl 1,8% foi confirmada pelos resultados de ratos em que as injeções não alcançaram o NPBL.

Injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) em sítios fora do NPBL não alteraram a ingestão de NaCl 1,8% [$F(3,18) = 1,518$; $p > 0,05$] ou a ingestão de água [$F(3,18) = 1,418$; $p > 0,05$] em animais tratados com FURO + CAP (Tabela 5).

Tabela 5: Ingestão cumulativa de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções bilaterais de noradrenalina ou salina em sítios fora do NPBL combinadas com prazosin i.p.

Tratamento	NaCl 1,8 % (ml/3 h)	água (ml/3 h)
SAL i.p. + SAL LPBN	3,1 ± 0,5	7,1 ± 0,2
SAL i.p. + NOR LPBN	5,6 ± 0,6	5,4 ± 0,6
PRAZOSIN i.p. + NOR LPBN	4,5 ± 0,6	7,5 ± 1,1
PRAZOSIN i.p. + SAL LPBN	5,1 ± 0,4	9,2 ± 0,9

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Número de animais = 7 Prazosin (PRA, 1 mg/kg de peso corporal), noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 µl), salina (SAL).

5.8.2. Número de lambidas por intervalo e análise microestrutural

Injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) fora do NPBL aumentaram o número de lambidas/intervalo para NaCl 1,8% nos primeiros 15 minutos do teste [F(3, 198) = 3,160; p < 0,05] (Tabela 6). O pré-tratamento com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. combinado com noradrenalina injetada fora do NPBL aumentou o número de lambidas/intervalo para NaCl 1,8% dos 15 aos 45 minutos (segundo e terceiro intervalos) de teste em comparação com o controle (salina i.p. + salina NPBL) ou com o tratamento com salina i.p. + noradrenalina fora do NPBL. Porém, este mesmo tratamento promoveu redução do número de lambidas nos primeiros 15 minutos em comparação com o tratamento com salina i.p. + sal fora do NPBL ou salina i.p. + noradrenalina fora do NPBL (Tabela 6).

Injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) fora do NPBL diminuíram o número de lambidas/intervalo para a água nos 15 de teste [F(3, 198) = 4,125; p < 0,05] (Tabela 7). Injeções prévias de prazosin i.p. combinadas com noradrenalina injetada fora do NPBL também diminuíram o número de lambidas/intervalo para nos primeiros 15 minutos do teste (primeiro intervalo) comparando-se com o controle (salina i.p. + salina fora do NPBL).

Em relação à análise microestrutural, injeções bilaterais de noradrenalina (40 nmol/0,2 µl) fora do NPBL não alteraram o número de *burst*/intervalo para NaCl 1,8% [F(3,18) = 2,250; p > 0,05] (Tabela 6), nem o número de lambidas/*burst* em animais tratados com FURO + CAP [F(3, 18) = 1,590; p > 0,05] (Tabela 6). As injeções de prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. com noradrenalina fora do NPBL diminuíram o número de *bursts*/intervalo para NaCl 1,8% nos primeiros 15 minutos e de 30 a 45 minutos do teste e aumentaram o número de *burst*/intervalo dos 15 a 30 minutos do teste, que corresponde ao segundo intervalo (Tabela 6). Injeções de noradrenalina fora do NPBL e prazosin i.p. aumentaram o número de lambidas/*burst* nos primeiros 15 minutos do teste. Por outro lado, prazosin combinado com salina no NPBL diminuiu o número de *bursts*/intervalo de 0 a 15 min.

Em relação à análise microestrutural para água, nenhum tratamento foi capaz de modificar o número de *burst*/intervalo [F(3, 18) = 0,672; p > 0,05] ou o número de lambidas/*burst* [F(3, 18) = 0,092; p > 0,05] (Tabela 7).

Tabela 6: Número de lambidas/intervalo e análise microestrutural NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de ou salina fora do NPBL combinadas com prazosin ou SAL i.p.

Tratamento	Intervalos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Lambidas/intervalo											
SAL i.p. + SAL NPBL	413± 109	57± 31	20± 14	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
SAL i.p. + NOR NPBL	755 ± 153*	118 ± 52	45 ± 45	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PRA i.p. + NOR NPBL	199 ± 75*#	414 ± 156*#	249 ± 94*#	42 ± 16	175 ± 66	83 ± 31	0 ± 0	7 ± 2	7 ± 3	7 ± 2	19 ± 7	58 ± 21
PRA i.p. + SAL NPBL	203 ± 94*	209 ± 84	89 ± 54	0 ± 0	0 ± 0	110 ± 83	74 ± 49	0 ± 0	0 ± 0	37 ± 36	79 ± 79	0 ± 0
	Burst /intervalo											
SAL i.p. +SAL NPBL	11 ± 2	3 ± 1	28 ± 9	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
SAL i.p. + NOR NPBL	14 ± 4	7 ± 3	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PRA i.p. + NOR NPBL	6 ± 2*#	12 ± 4*	10 ± 6*#	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1
PRA i.p. + SAL NPBL	3 ± 1*#	3 ± 1	2 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 1	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	1 ± 1	0 ± 0
	Licks/burst											
SAL i.p. +SAL NPBL	28 ± 5	28 ± 9	42 ± 27	6 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	6 ± 6	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
SAL i.p. + NOR NPBL	49 ± 13	19 ± 7	7 ± 7	0 ± 0	4 ± 4	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PRA i.p. + NOR NPBL	203 ± 94*	209 ± 84	89 ± 54	0 ± 0	0 ± 0	110 ± 83	74 ± 49	0 ± 0	0 ± 0	37 ± 36	79 ± 79	0 ± 0
PRA i.p. + SAL NPBL	41 ± 15	30 ± 21	86 ± 73	0 ± 0	0 ± 0	15 ± 10	16 ± 10	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 5	10 ± 10	0 ± 0

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Número de animais = 7 Prazosin (PRA, 1 mg/kg de peso corporal), noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 µl), salina (SAL).

Tabela 7: Número de lambidas/intervalo e análise microestrutural para água em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de ou salina fora do NPBL combinadas com prazosin ou SAL i.p.

Tratamento	Intervalos											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	Lambidas/intervalo											
SAL i.p. + SAL NPBL	946± 181	158± 105	52± 52	0 ± 0	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
SAL i.p. + NOR NPBL	410 ± 131*	265 ± 97	316 ± 170	83 ± 77	0 ± 0	0 ± 0	13 ± 13	48 ± 48	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PRA i.p. + NOR NPBL	224 ± 84*#	253 ± 95	409 ± 154	171 ± 64	286 ± 108	173 ± 65	88 ± 33	54 ± 20	64 ± 24	14 ± 5	10 ± 3	28 ± 10
PRA i.p. + SAL NPBL	1118 ± 448	277 ± 104	266 ± 100	76 ± 29	62 ± 23	55 ± 21	24 ± 9	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Burst /intervalo											
SAL i.p. +SAL NPBL	14 ± 4	1 ± 1	52 ± 54	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	2 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
SAL i.p. + NOR NPBL	8 ± 3	7 ± 2	8 ± 3	3 ± 2	1 ± 2	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PRA i.p. + NOR NPBL	11 ± 5	14 ± 7	12 ± 3	6 ± 7	12 ± 6	5 ± 5	2 ± 2	1 ± 1	2 ± 1	1 ± 1	1 ± 1	1 ± 1
PRA i.p. + SAL NPBL	18 ± 7	3 ± 1	5 ± 2	1 ± 1	0 ± 0	1 ± 1	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
	Licks/burst											
SAL i.p. +SAL NPBL	44 ± 28	47 ± 37	42 ± 27	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	5 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
SAL i.p. + NOR NPBL	50 ± 24	74 ± 22	26 ± 13	10 ± 7	2 ± 2	0 ± 0	15 ± 13	4 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
PRA i.p. + NOR NPBL	10 ± 4	18 ± 5	33 ± 13	10 ± 6	38 ± 18	3 ± 3	5 ± 5	5 ± 5	13 ± 9	3 ± 3	3 ± 3	15 ± 12
PRA i.p. + SAL NPBL	86 ± 15	61 ± 28	78 ± 34	25 ± 16	40 ± 26	5 ± 5	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0

Os resultados estão expressos como média ± EPM. Número de animais = 7 Prazosin (PRA, 1 mg/kg de peso corporal), noradrenalina (NOR, 40 nmol/0,2 µl), salina (SAL).

5.9. Ingestão de água e NaCl 1,8% e análise microestrutural das lambidas de ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções de moxonidina no NPBL

5.9.1. Volume total ingerido

Injeções bilaterais de moxonidina (0.5 nmol/0.2 µl) no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP [$F(1,5) = 26,93$; $p < 0,05$] (Figura 16A) porém não alteraram o volume total de água ingerido [$F(1,5) = 0,16$; $p > 0,05$] (Figura 16B).

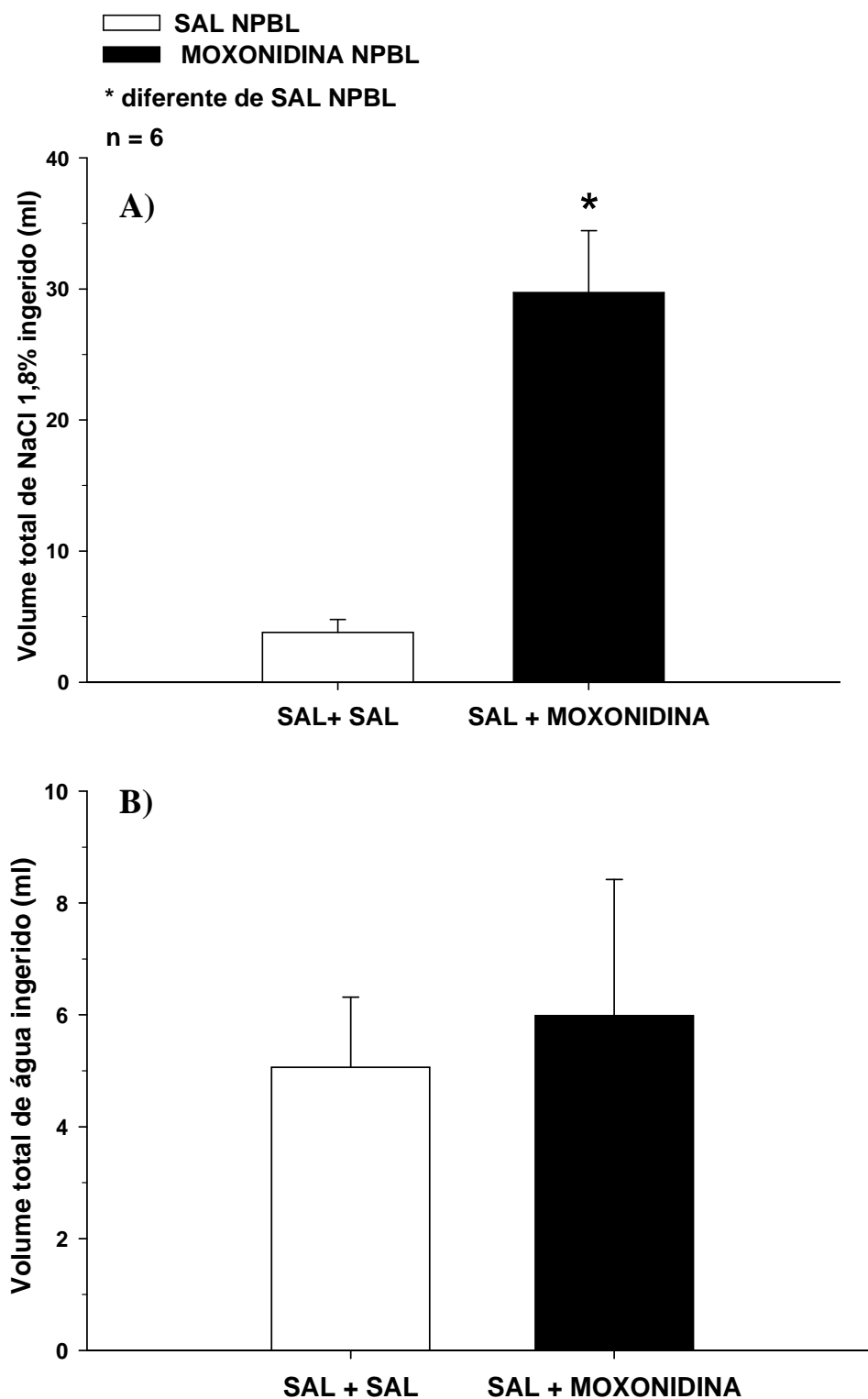


Figura 16: Volume total ingerido de NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de moxonidina (moxonidina, 0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL. Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais.

5.9.2. Número de lambidas por intervalo

Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL aumentaram o número de lambidas/*intervalo* para NaCl 1,8% até os 60 minutos do teste em animais tratados com FURO + CAP [F(1,5) = 20,83; $p < 0,05$] (Figura 17A). Entretanto, injeções bilaterais de moxonidina no NPBL não modificaram o número de lambidas/*intervalo* para água [F(1,5) = 0,95; $p > 0,05$] (Figura 17B).

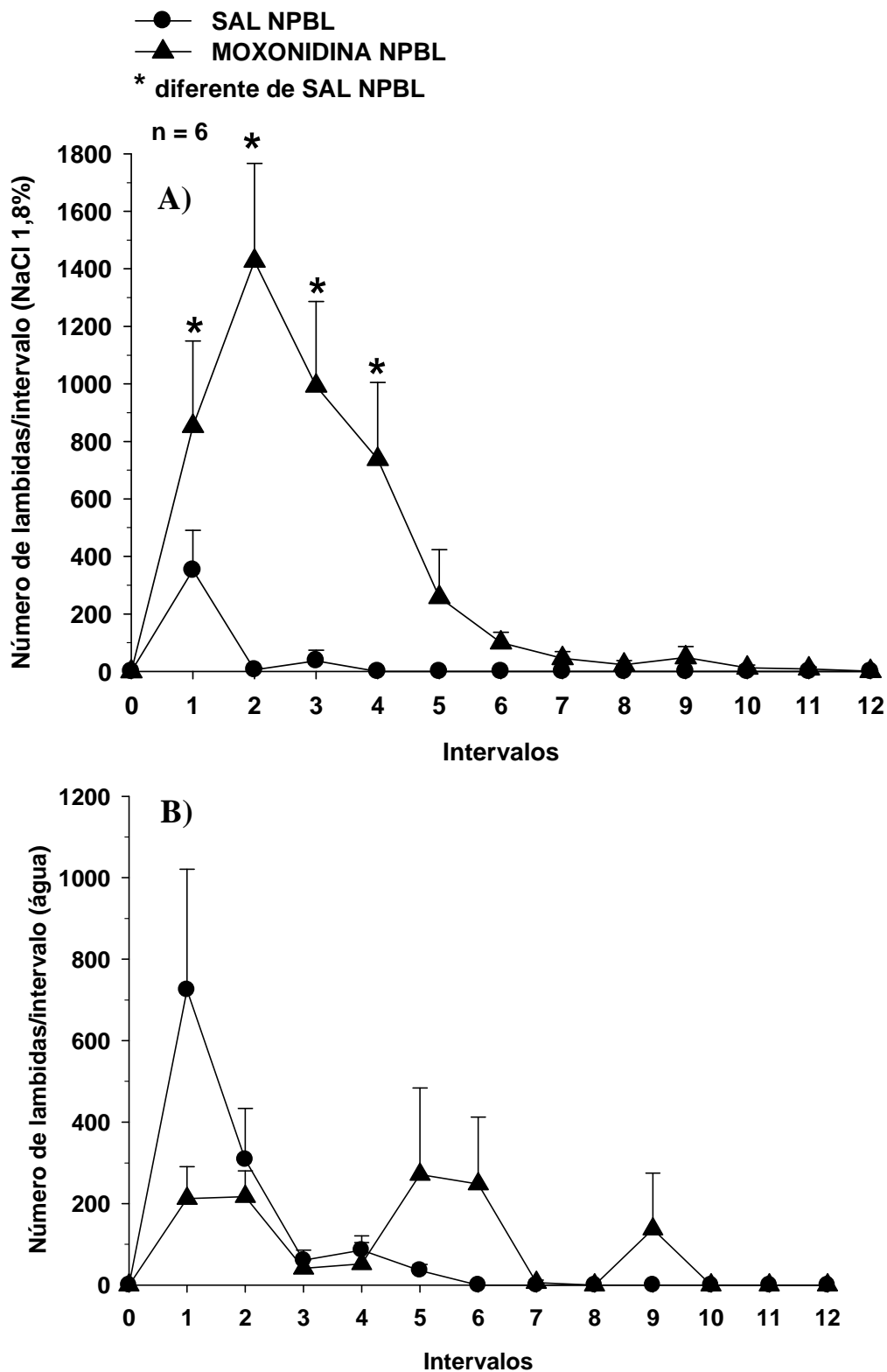


Figura 17: Número de lambidas/intervalo para NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam com injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL). Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais.

5.9.3. Número de *bursts*/intervalo

Injeções bilaterais de moxonidina no NPBL aumentaram o número de *bursts/intervalo* [$F(1,5) = 27,309$ $p < 0,05$] (Figura 18A) de 0 a 75 min e também modificaram o número de *lambidas/burst* [$F(1,5) = 15,60$; $p < 0,05$] para NaCl 1,8% dos 15 aos 60 min do teste (Figura 19A) em animais tratados com FURO + CAP. Entretanto, injeções bilaterais de moxonidina no NPBL não modificaram o número *bursts/intervalo* [$F(1,5) = 1,25$; $p > 0,05$] (Figura 18B) nem o número de *lambidas/burst* para a ingestão de água [$F(1,5) = 0,04$; $p > 0,05$] (Figura 19B).

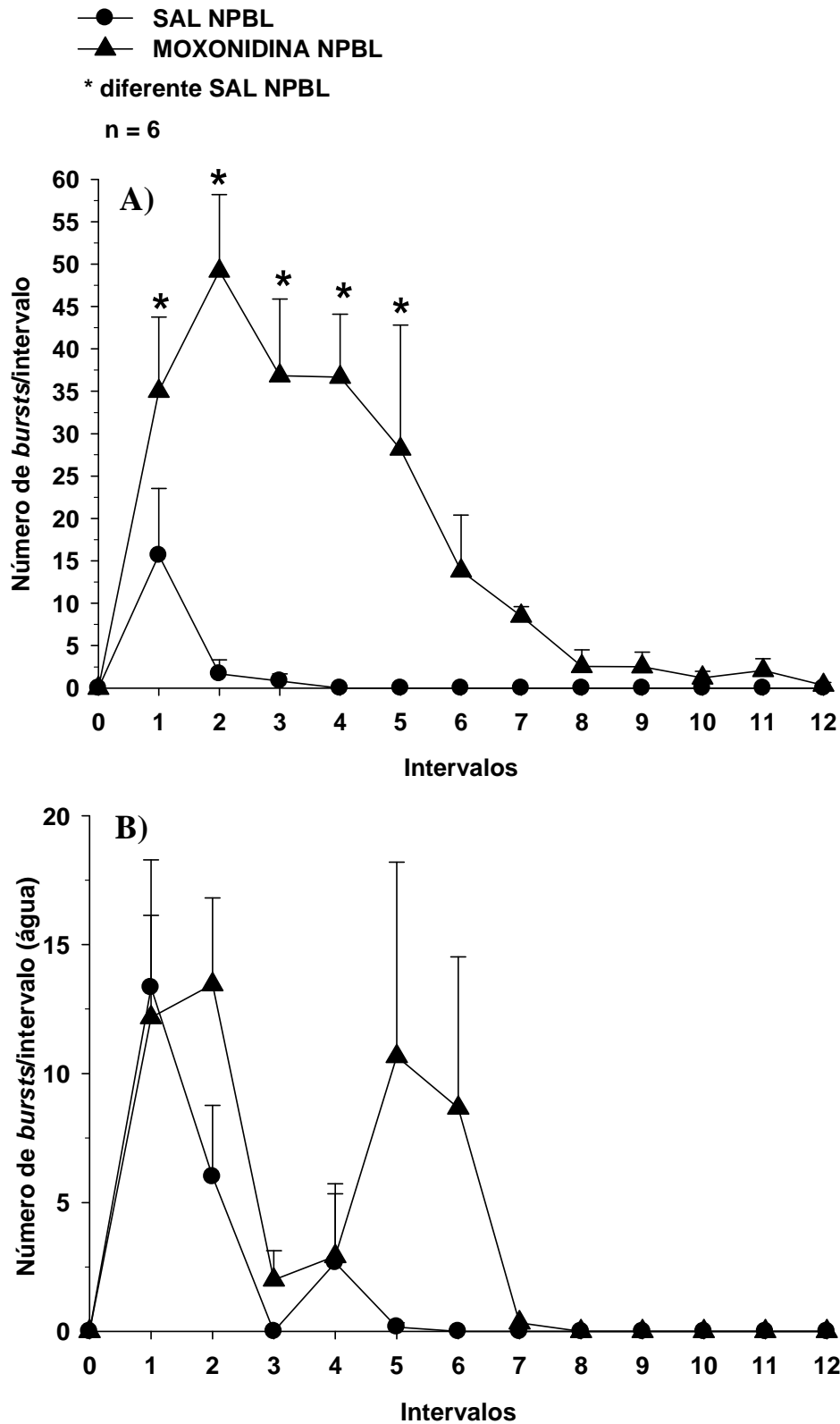


Figura 18: Número de *bursts*/intervalo para NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0.5 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL. Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais.

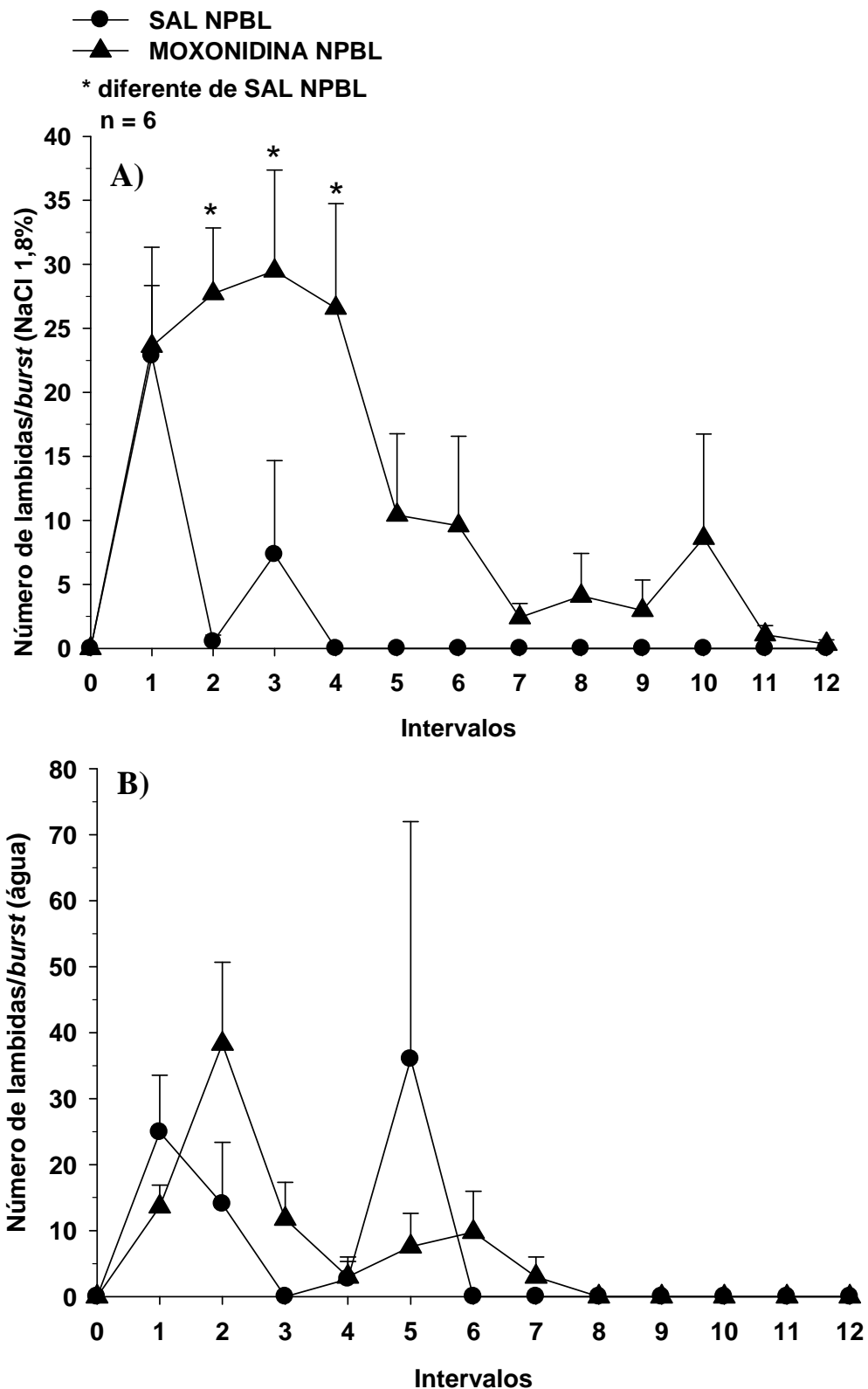


Figura 19: Número de lambidas/burst para NaCl 1,8% (A) e água (B) em ratos tratados com FURO + CAP que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) ou salina (SAL) no NPBL. Os resultados estão reportados com média \pm EPM. n = número de animais.

5.10. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com noradrenalina no NPBL combinada com prazosin i.p. em ratos tratados com pilocarpina i.p.

A injeção de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p. combinada com injeção de salina i.p. + injeções bilaterais de salina ou noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) no NPBL não induziu ingestão de NaCl 1,8% ($0,5 \pm 0,3$ e $0,8 \pm 2,4$ ml/180 min, respectivamente) (Figura 20A). Porém, ratos tratados com pilocarpina i.p. que receberam injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. apresentaram uma intensa ingestão de NaCl 1,8% ($14,7 \pm 3,5$ ml/180 min) [$F(3,33) = 13,17$; $p < 0,05$] (Figura 20A).

A injeção de pilocarpina i.p. combinada com injeção de salina i.p. + injeções bilaterais de salina no NPBL induziu ingestão de água ($2,9 \pm 0,3$ ml/180 min) [$F(3,33) = 7,14$; $p < 0,05$], (Figura 20B). Injeções de noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) no NPBL em ratos tratados com salina i.p. diminuíram a ingestão de água induzida por pilocarpina i.p. ($0,8 \pm 0,3$ ml/180 min) (Figura 20B). Porém, ratos tratados com pilocarpina i.p. que receberam injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. apresentaram um aumento da ingestão de água ($6,3 \pm 1,7$ ml/180 min) (Figura 16B).

Prazosin i.p. combinado com salina no NPBL não alterou a ingestão de NaCl 1,8% induzida por pilocarpina i.p. ($0,5 \pm 0,3$ ml/180 min) nem a ingestão de água ($4,8 \pm 3,6$ ml/180 min).

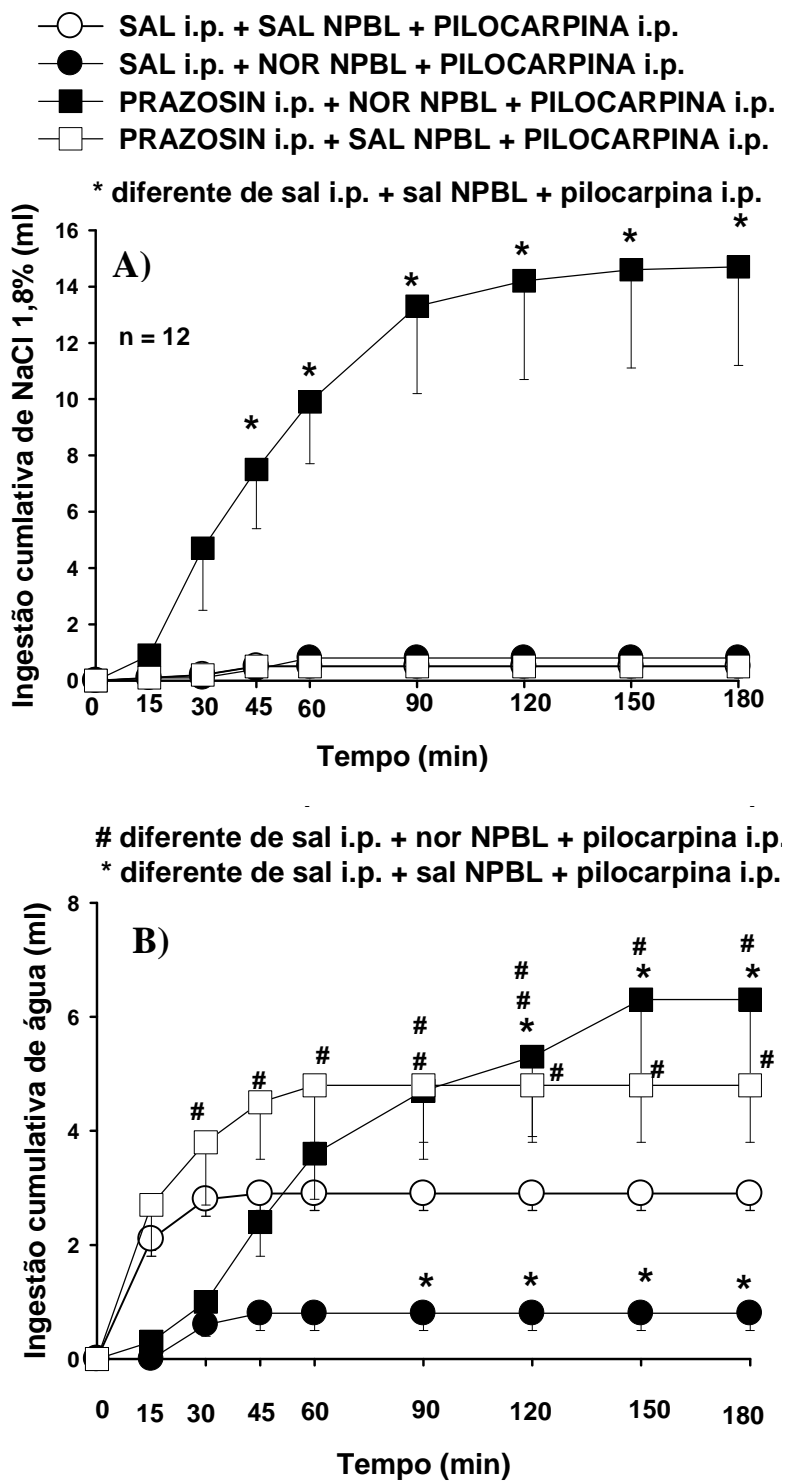


Figura 20: Ingestão cumulativa de (A) NaCl 1,8% e (B) água em ratos com injeções bilaterais de SAL ou noradrenalina (NOR, 80 nmol/0,2 µl) no NPBL combinadas com salina (SAL) ou prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. em ratos tratados com pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p. Resultados expressos como média ± EPM. n = número de animais.

5.11. Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de noradrenalina no NPBL combinadas com prazosin i.p. em ratos tratados com pilocarpina i.p.

O tratamento com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. reduziu a PAM basal (70 ± 3 mmHg, vs. pré-tratamento: 107 ± 3 mmHg) [$F(1,10) = 70,9$; $p < 0,05$] e aumentou a frequência cardíaca (525 ± 13 bpm, vs. pré-tratamento: 402 ± 11 bpm) [$F(1,10) = 49,84$; $p < 0,05$].

Injeções prévias de prazosin i.p. reduziram a variação da pressão arterial produzida por injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL, sendo a maior variação no tempo de 0,5 min após a injeção no NPBL (60 ± 4 mmHg antes de prazosin i.p. vs. 13 ± 2 mmHg depois de prazosin i.p.) ou de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p. com a maior variação 5 minutos após a injeção i.p. (30 ± 7 mmHg antes de prazosin i.p., vs. 8 ± 3 mmHg depois de prazosin i.p.) [$F(1,5) = 45,07$ $p < 0,05$] (Figura 21A). Prazosin i.p. também reduziu a bradicardia produzida por injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL (-114 ± 29 , vs. sal: -31 ± 22 bpm depois de prazosin i.p.) [$F(1,5) = 131,62$ $p < 0,05$] (Figura 21B).

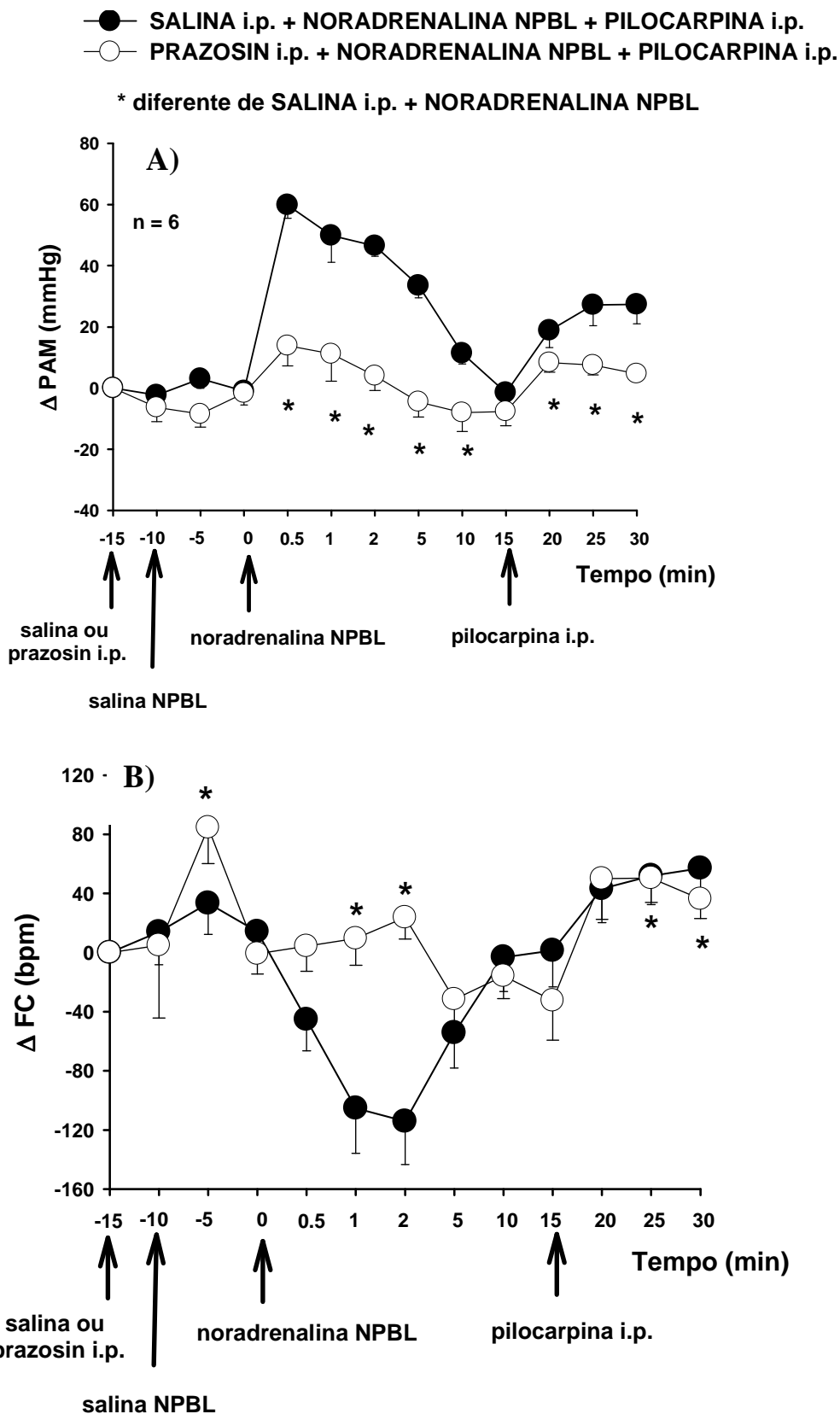


Figura 21: Variações (A) da PAM e (B) da frequência cardíaca (FC) em ratos que receberam injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL combinadas com pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p após o pré-tratamento com injeções de salina ou prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

5.12. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos tratados com moxonidina combinada com pilocarpina i.p.

Ratos tratados com pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p. que receberam injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL apresentaram uma intensa ingestão de NaCl 1,8% ($14,1 \pm 5,5$ ml/180 min, vs. salina LPBN + pilocarpina i.p.: $0,8 \pm 0,5$ ml/180 min) [$F(1,7) = 6,544$; $p < 0,05$] (Figura 22A) sem alterações significativas na ingestão de água induzida por pilocarpina i.p. ($7,6 \pm 3,1$ ml/180 min, vs. salina LPBN + pilocarpina i.p.: $3,8 \pm 0,7$ ml/180 min) [$F(1,7) = 0,665$; $p > 0,05$] (Figura 22B).

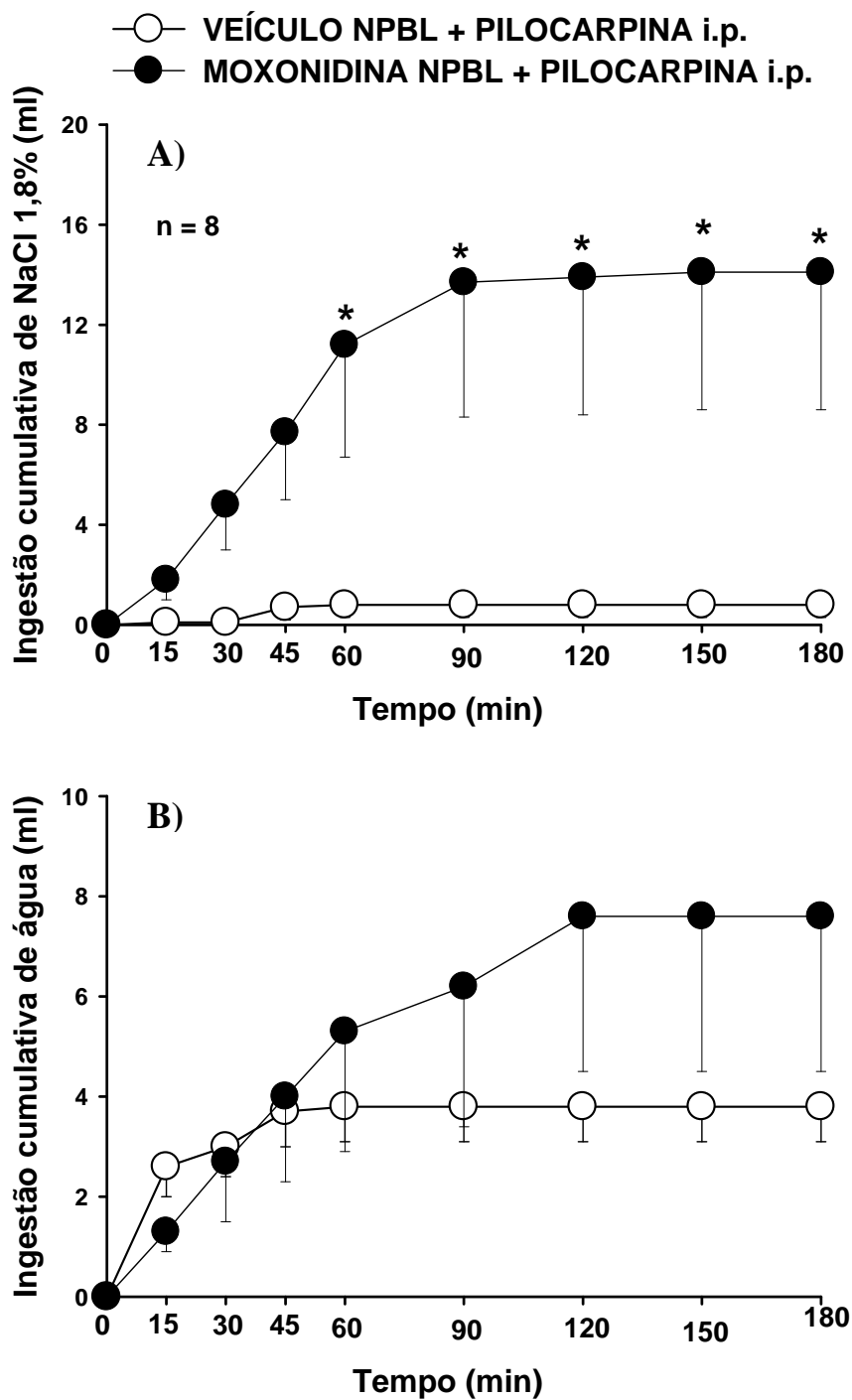


Figura 22: Ingestão cumulativa de (A) NaCl 1,8% e (B) água em ratos tratados com veículo ou moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL combinada com pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

5.13. Respostas cardiovasculares produzidas por injeções de pilocarpina i.p. em ratos tratados com moxonidina no NPBL

Injeções bilaterais de moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l) no NPBL não alteraram a pressão arterial (118 ± 3 mmHg, vs. PAM basal: 112 ± 2 mmHg) [$F(1,7) = 2,15$; $p > 0,05$] (Figura 23A), nem a frequência cardíaca (482 ± 18 bpm, vs. FC basal: 401 ± 16 bpm) [$F(1,7) = 1,45$; $p > 0,05$] no período de 15 minutos após as injeções (Figura 23B).

A resposta pressora produzida pela pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p. não foi modificada após as injeções de moxonidina no NPBL (28 ± 5 mmHg antes de moxonidina, vs. 30 ± 3 mmHg depois de moxonidina) (Figura 23A)

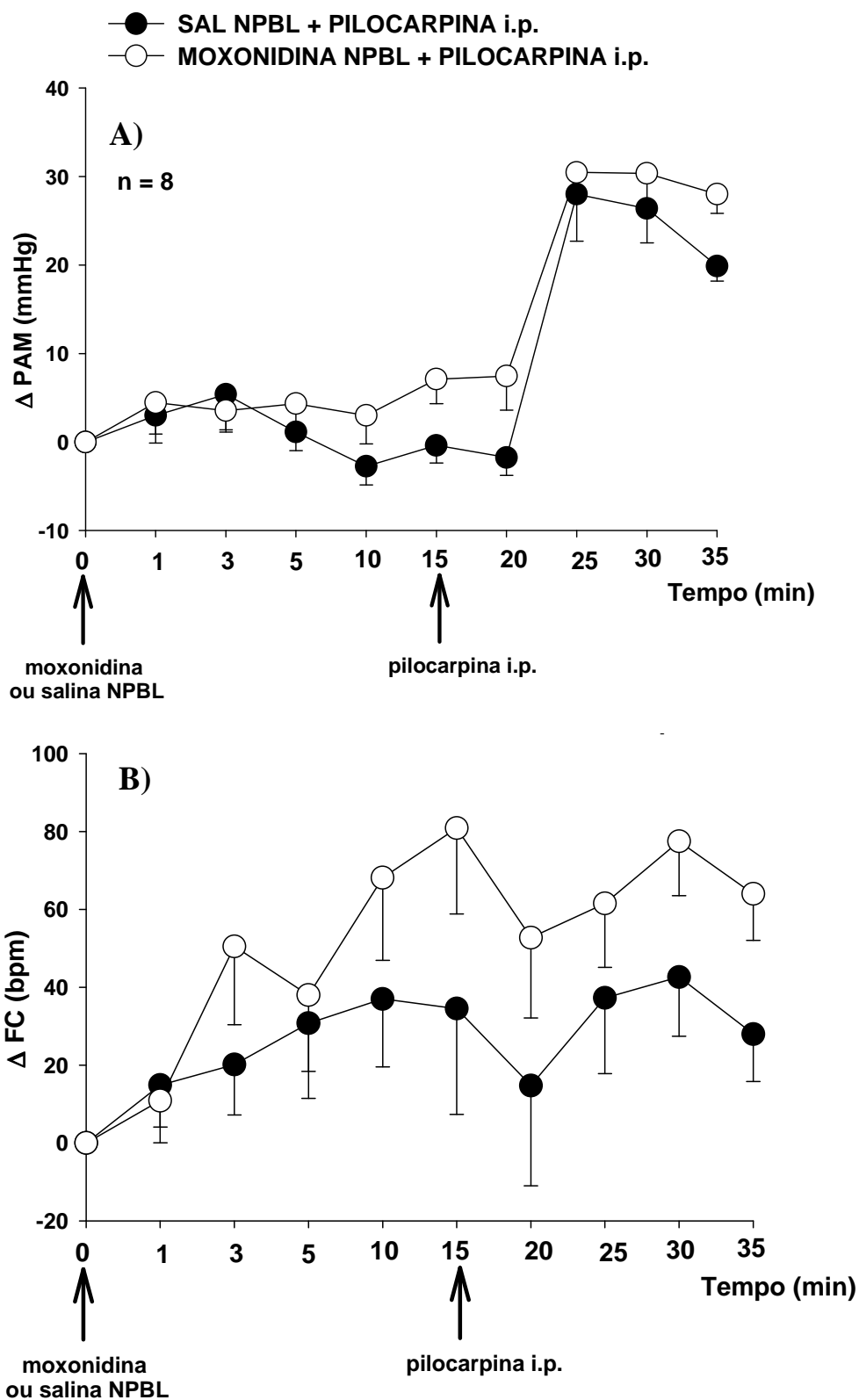


Figura 23: Variações (A) da PAM e (B) da frequência cardíaca produzidas por injeções de pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal) i.p. e ratos tratados com injeções bilaterais de salina ou moxonidina (0,5 nmol/ 0,2 μ l) no NPBL. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

5.14. Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com bloqueio de receptores adrenérgicos α_1 tratados com injeções de noradrenalina no NPBL combinadas com carbacol i.c.v.

Injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL em ratos tratados com salina i.p. não alteraram a ingestão de NaCl 1.8% ($5,6 \pm 1,7$ ml/180 min, vs. salina i.p. + salina LPBN: $1,9 \pm 0,8$ ml/180 min) nem ingestão de água ($7,7 \pm 1,1$ ml/180 min; vs. salina i.p. + salina LPBN: $9,4 \pm 1,4$ ml/180 min) induzida por carbacol (4 nmol/1 μ l) i.c.v. (Figura 24). Porém, injeções bilaterais de noradrenalina no NPBL combinadas com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. aumentaram a ingestão de NaCl 1.8% induzida por carbacol i.c.v. ($8,2 \pm 3,9$ ml/180 min) $F(3,30) = 2,95$; $p < 0,05$] (Figura 24A), sem modificações na ingestão de água ($8,1 \pm 2,4$ ml/180 min) [$F(3,30) = 2,10$; $p > 0,05$] (Figura 24B).

Prazosin i.p. não alterou a ingestão de NaCl 1.8% induzida carbacol i.c.v. ($1,0 \pm 0,2$ ml/180 min) nem a ingestão de água ($11 \pm 1,1$ ml/180 min) em animais tratados com salina no NPBL.

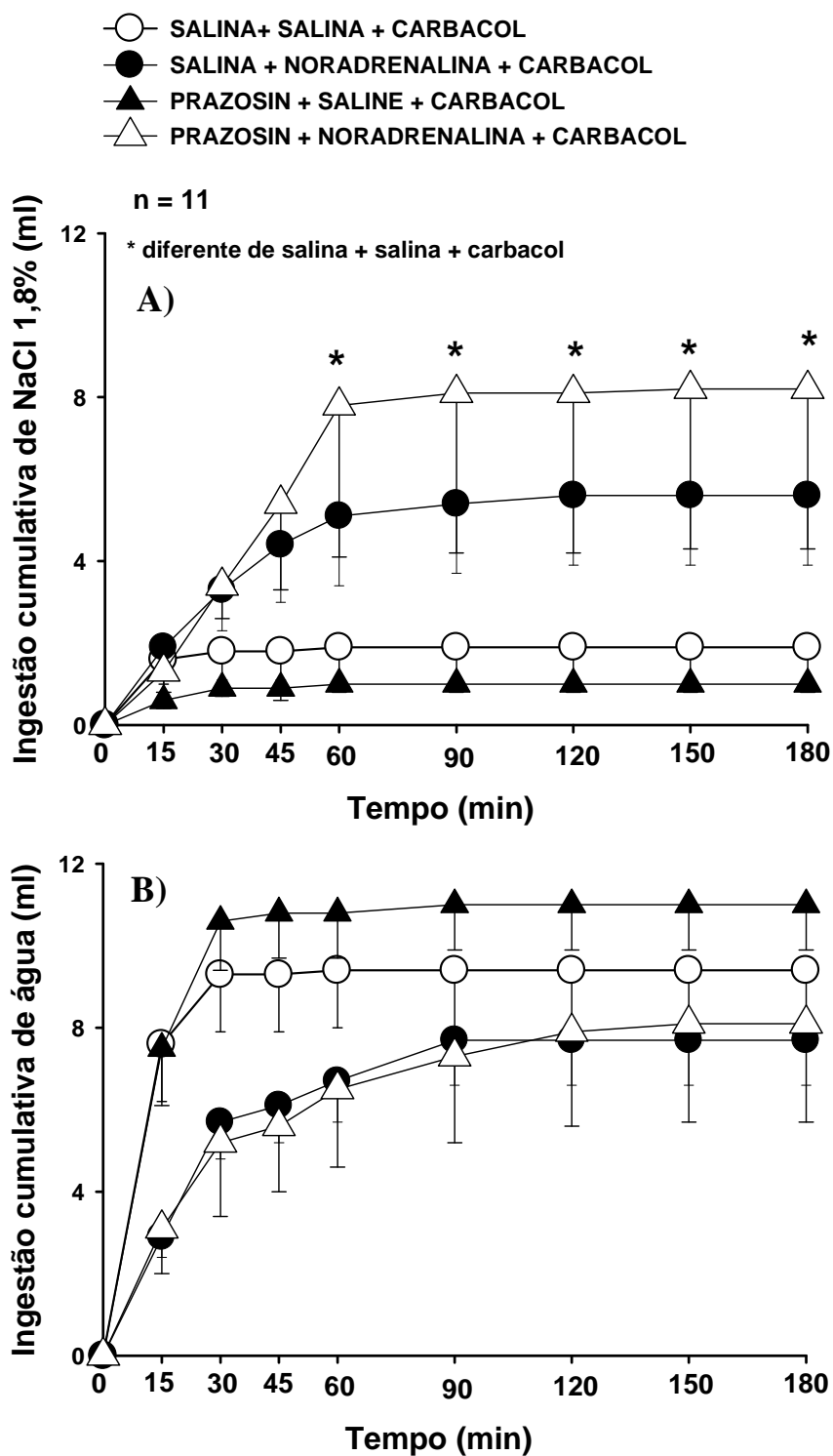


Figura 24: Ingestão cumulativa de (A) NaCl 1,8% e (B) água induzida por carbacol (4 nmol/1 μ l) i.c.v em ratos que receberam injeções SAL ou noradrenalina (NOR, 80 nmol/0,2 μ l) no NPBL combinada com salina ou prazosin i.p. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

5.15. Respostas cardiovasculares produzidas pela combinação de noradrenalina injetada no NPBL com carbacol i.c.v. em ratos com bloqueio receptores adrenérgicos α_1 .

O tratamento com prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. reduziu a PAM basal (90 ± 3 mmHg, vs. pré-tratamento: 101 ± 3 mmHg) [$F(1,5) = 13,91$; $p < 0,05$] e aumentou a frequência cardíaca (494 ± 7 bpm, vs. pré-tratamento: 354 ± 24 bpm) [$F(1,5) = 9,97$; $p < 0,05$].

Injeções prévias de prazosin i.p. reduziram a resposta pressora produzida por injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL (50 ± 9 mmHg antes de prazosin i.p., v.s. 15 ± 7 mmHg depois de prazosin i.p., vs.) [$F(1,5) = 25,066$ $p < 0,05$] mas não alteraram a resposta pressora produzida por injeção de carbacol (4 nmol/0,2 μ l) no VL, sendo a resposta máxima 5 minutos após a injeção no VL (26 ± 6 mmHg antes de prazosin i.p., vs. 29 ± 6 mmHg depois de prazosin i.p.) (Figura 25A). Prazosin i.p. também reduziu a variação da frequência cardíaca produzida por injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL (-171 ± 29 bpm antes de prazosin i.p., vs.: -65 ± 45 bpm depois de prazosin i.p.) [$F(1,5) = 5,459$ $p < 0,05$] (Figura 25B).

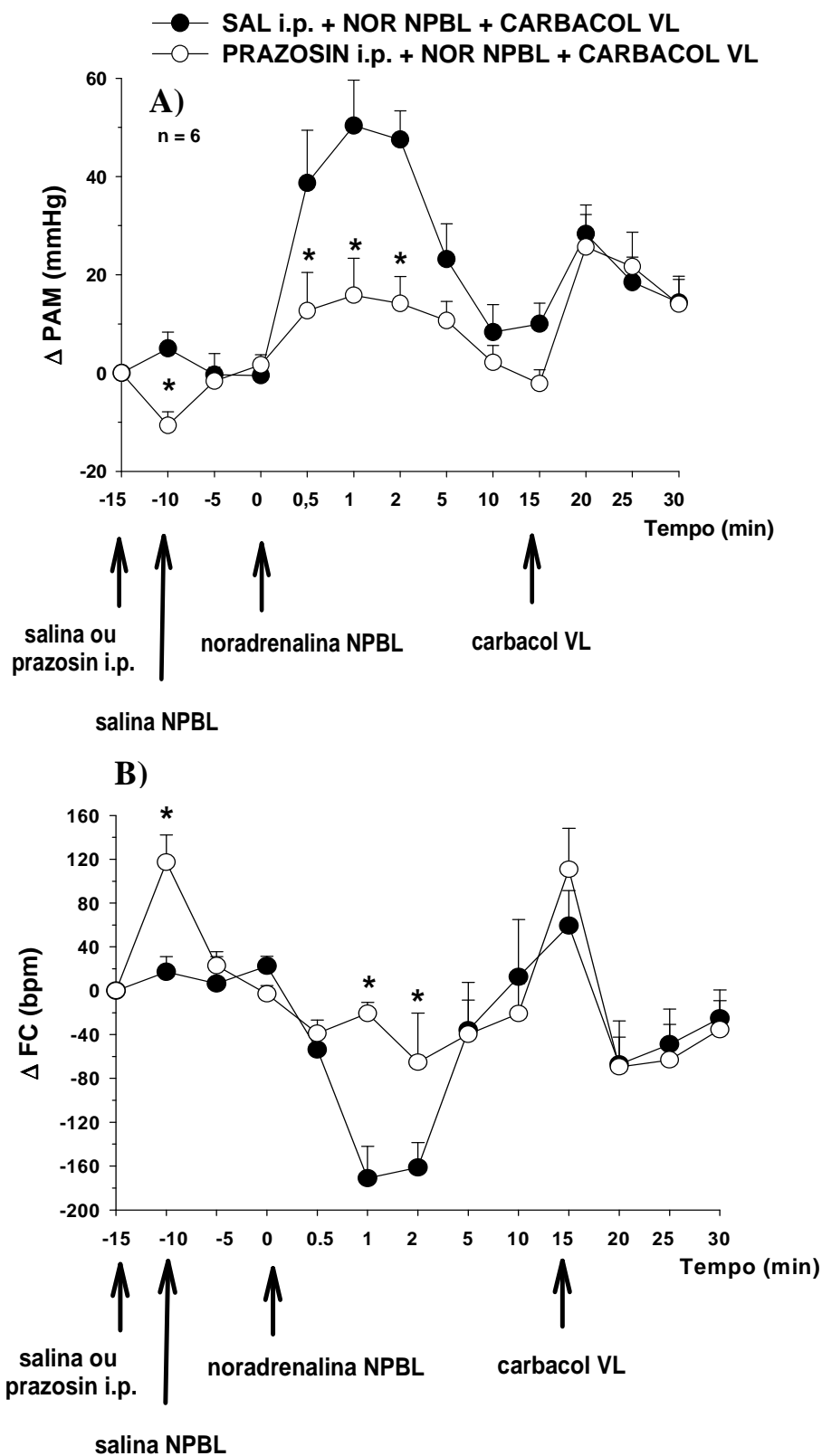


Figura 25: Variações (A) da PAM e (B) da frequência cardíaca (FC) em ratos que receberam injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 μ l) no NPBL combinadas com injeção de carbacol (4 nmol/ μ l) no VL após o pré-tratamento com injeções de salina ou prazosin (1 mg/kg de peso corporal) i.p. Resultados expressos como média \pm EPM. n = número de animais.

5.16. Efeitos de injeções bilaterais de noradrenalina em sítios fora do NPBL na ingestão de água e de NaCl 1,8% induzida por ativação colinérgica.

A especificidade do NPBL como um sítio onde as injeções de noradrenalina ou moxonidina produzem efeitos na ingestão de NaCl 1,8% também foi demonstrada em animais tratados com pilocarpina i.p. ou carbacol i.c.v. Injeções bilaterais de noradrenalina (80 nmol/0,2 µl) em sítios fora do NPBL, combinada com salina ou prazosin i.p, não alteraram a ingestão de NaCl 1,8% induzida por pilocarpina i.p. [F(3,24) = 1,222; p > 0,05] ou por carbacol i.c.v. [F(3,18) = 0,953; p > 0,05] (Tabela 8). Por outro lado, injeções de noradrenalina combinada com salina i.p. em ratos tratados com pilocarpina i.p. reduziram a ingestão de água [F(3,24) = 7,343; p < 0,05], provavelmente devido ao efeito pressor da noradrenalina. No entanto, injeções de noradrenalina combinada com salina ou prazosin i.p. não alteraram a ingestão de água induzida por carbacol i.c.v. [F(3,218) = 1,686; p > 0,05]

Injeções de moxonidina fora do NPBL também não produziram efeitos na ingestão de NaCl 1,8% em animais tratados com pilocarpina i.p. [F(1,9) = 1,469; p > 0,05]. Assim como nos animais onde injeções de moxonidina alcançaram o NPBL, injeções de moxonidina fora do NPBL não produziram efeitos na ingestão de água induzida por pilocarpina i.p. [F(1,9) = 0,374; p > 0,05] (Tabela 8).

Tabela 8: Ingestão de água e NaCl 1,8% em ratos com bloqueio de receptores adrenérgicos α_1 ou salina i.p. e tratados com injeções de noradrenalina ou moxonidina em sítios fora do NPBL combinadas com pilocarpina i.p. ou carbacol i.c.v.

Tratamento	NaCl 1,8% (ml/3 h)	água (ml/3 h)
PILOCARPINA i.p. (n = 9)		
SAL i.p. + SAL NPBL	1,2 ± 0,7	3,2 ± 0,6
SAL i.p. + NOR NPBL	0,2 ± 0,1	0,7 ± 0,4*
PRAZOSIN i.p. + NOR NPBL	0,8 ± 0,1	2,2 ± 0,9
PRAZOSIN i.p. + SAL NPBL	0,8 ± 0,6	5,1 ± 0,8
PILOCARPINA i.p. (n = 10)		
SAL NPBL	0,2 ± 0,2	3,9 ± 0,5
MOXONIDINA NPBL	0,8 ± 0,3	4,4 ± 1,0
CARBACOL i.c.v. (n = 7)		
SAL i.p. + SAL NPBL	1,7 ± 0,5	8,6 ± 1,5
SAL i.p. + NOR NPBL	2,8 ± 1,3	5,8 ± 1,5
PRAZOSIN i.p. + NOR NPBL	2,1 ± 1,0	3,9 ± 1,4
PRAZOSIN i.p. + SAL NPBL	2,2 ± 0,8	6,5 ± 1,6

Os resultados estão expressos como média ± EPM. n = número de animais. Prazosin (1 mg/kg de peso corporal), noradrenalina (NOR, 80 nmol/0,2 μ l), moxonidina (0,5 nmol/0,2 μ l), salina (SAL), pilocarpina (1 mg/kg de peso corporal), carbacol (4 nmol/1 μ l). * Diferente de SAL i.p. + SAL NPBL.

6. Discussão

Resposta pressora da noradrenalina no NPBL reduz a facilitação na ingestão de água e sódio em animais tratados com FURO + CAP

Estudos prévios de nosso laboratório demonstraram que injeções de noradrenalina agindo nos receptores adrenérgicos α_2 no NPBL aumenta ingestão de água e de NaCl 1,8 % induzida por FURO + CAP (GASPARINI *et al.*, 2009). Os presentes resultados confirmam esses efeitos de noradrenalina injetada no NPBL e também mostram que o bloqueio de receptores adrenérgicos α_1 com prazosin i.p. abole a resposta pressora da noradrenalina injetada no NPBL e ao mesmo tempo aumenta a ingestão de NaCl 1,8% comparado com a ingestão produzida pela combinação de FURO + CAP s.c. com noradrenalina no NPBL. A ingestão de água induzida por FURO + CAP foi reduzida por noradrenalina injetada no NPBL e aumentada pela combinação de noradrenalina no NPBL e prazosin i.p. Esses resultados sugerem que a redução na atividade de barorreceptores e provavelmente de receptores de volume facilitam a ingestão de água e de NaCl 1,8% em ratos tratados com FURO + CAP combinado com noradrenalina injetada no NPBL. Além disso, os resultados mostram que injeções bilaterais de fenilefrina (agonista adrenérgico α_1 específico) no NPBL não produz alteração na pressão arterial nem na frequência cardíaca, sugerindo que os receptores adrenérgicos α_1 do NPBL não estão envolvidos no controle da ingestão de água e sódio ou na regulação cardiovascular. Apesar do prazosin i.p. abolir a resposta pressora da noradrenalina injetada no NPBL, o bloqueio ganglionar com hexametônio combinado com o bloqueio periférico com antagonista de receptor vasopressinérgico (Composto de Manning), ao invés de reduzir, aumentou a resposta pressora da noradrenalina injetada no NPBL, o que sugere que a resposta pressora parece ser resultado da noradrenalina agindo periféricamente e não centralmente.

Sinais aferentes de barorreceptores e receptores cardiopulmonares que podem inibir a ingestão de água e sódio alcançam a área postrema e a porção média do núcleo do trato solitário (AP/NTSm) e ascendem ao NPBL (NORGREN, 1981; JOHNSON e THUNHORST, 1997; JOHNSON, 2007). Além disso, o NPBL recebe outros sinais viscerais importantes para o controle da ingestão de água e sódio, como sinais de receptores gustatórios e osmorreceptores (KOBASHI *et al.*, 1993; YAMAMOTO *et al.*, 1993; NORGREN, 1995; FRANCHINI e VIVAS, 1999). A inflação de um balão colocado na junção do átrio direito e veia cava superior reduz a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP e aumenta a expressão da proteína c-fos no NPBL (DE GOBBI *et al.*, 2008). A ativação de receptores da

junção do átrio direito e da veia cava superior também atenua a ingestão de água induzida por isoproterenol em ratos intactos, e esta inibição é abolida por lesão eletrolítica do NPBL (OHMAN e JOHNSON, 1995). Esses resultados sugerem que o NPBL é um sítio que recebe sinais de receptores cardiovasculares que inibem a ingestão de sódio e água. Os presentes resultados mostram que o pré-tratamento com prazosin i.p. abole a resposta pressora e aumenta a ingestão de água e de NaCl em ratos tratados com FURO + CAP combinado com noradrenalina no NPBL. Em adição ao bloqueio da resposta pressora da noradrenalina, o prazosin i.p. também reduz a pressão arterial basal e isso pode também ajudar a reduzir a inibição produzida pela atividade de receptores cardiovasculares. Logo, bloqueando a resposta pressora da noradrenalina injetada no NPBL e/ou reduzindo a pressão arterial basal, prazosin injetado i.p. causa uma redução da atividade de barorreceptores e possivelmente de receptores de volume o que pode facilitar a ingestão de água e de NaCl. Neste caso, parece que os sinais inibitórios de receptores cardiovasculares (aqueles removidos pelo prazosin i.p.) ainda afetam a ingestão de água e de NaCl depois das injeções de noradrenalina no NPBL, pelo menos na dose testada. Assim, parece que a noradrenalina no NPBL não remove completamente os sinais inibitórios produzidos pela ativação de receptores cardiovasculares, particularmente os sinais que resultam da ativação extra desses receptores produzidos pelo aumento da pressão arterial. Estudos que investigaram a ingestão de NaCl 1,8% e água em ratos tratados com FURO + CAP sugerem que uma redução branda da pressão arterial (em torno de 10 mmHg) produzida por esse tratamento é importante para estimular a ingestão (THUNHORST e JOHNSON, 1994). Apesar do pico da resposta pressora da noradrenalina ser transitório e ocorrer antes da ingestão, um longo e duradouro pequeno aumento da pressão arterial é mantido por pelo menos 30 min ($\Delta = 12 \pm 4$ mmHg aos 30 min depois da injeção de noradrenalina) o que é oposto aos efeitos do tratamento de FURO + CAP, e, logo, pode inibir a ingestão de sódio e água.

A sugestão de que o bloqueio de sinais inibitórios pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL facilita a ingestão de NaCl hipertônico induzida por FURO + CAP é reforçada por resultados de estudos prévios que demonstram que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções de moxonidina no NPBL reduz as respostas aversivas e aumenta as respostas hedônicas à infusão intra-oral de NaCl hipertônico em ratos (ANDRADE *et al.*, 2011). Antes do acesso a água e NaCl 1,8%, ratos tratados com FURO + CAP apresentam um baixo número de respostas aversivas e um alto número de respostas hedônicas à infusão intra-oral de NaCl hipertônico. Assim que os ratos ingerem água e NaCl 1,8%, o número de respostas aversivas aumenta e o número de respostas hedônicas é

fortemente inibida. Entretanto, se os ratos são tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL o baixo número de respostas aversivas e o alto número de respostas hedônicas não se altera com a ingestão de água e NaCl por pelo menos uma hora, sugerindo que sinais que reduzem a palatabilidade na medida em que o sódio é consumido são bloqueados pela ativação de receptores α_2 no NPBL. Neste caso, apesar da forte ingestão de NaCl hipertônico, a palatabilidade é mantida no mesmo nível de animais tratados com FURO + CAP que não ingeriram sódio (ANDRADE *et al.*, 2011). A única diferença entre a injeção de noradrenalina e moxonidina no NPBL é a ausência de resposta pressora quando moxonidina é injetada no NPBL (ANDRADE *et al.*, 2004). A exclusiva ativação dos receptores adrenérgicos α_2 no NPBL pela moxonidina sem causar mudanças na pressão arterial produz intensa facilitação da ingestão de sódio provavelmente como consequência de uma menor ação de sinais inibitórios nesta condição. Com injeções de noradrenalina no NPBL, o mesmo nível de facilitação é alcançado apenas quando se combina com prazosin i.p., o que sugere, novamente, que pelo menos em parte os sinais inibitórios provavelmente de origem cardiovascular estão ainda inibindo a ingestão de sódio mesmo após noradrenalina injetada no NPBL. Em adição aos sinais cardiovasculares, o NPBL também recebe outros sinais inibitórios para a ingestão de sódio, como sinais de osmorreceptores viscerais, que provavelmente são modificados pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 nesta área facilitando a ingestão de sódio (ANDRADE *et al.*, 2011). Além disso, apesar do mecanismo adrenérgico α_2 , outros receptores e neurotransmissores como a serotonina, CCK, CRF, glutamato, opioides, ATP e GABA no NPBL modulam o mecanismo inibitório que controla a ingestão de sódio (ANDRADE *et al.*, 2004; CALLERA *et al.*, 2005; DE CASTRO E SILVA, DE GOBBI *et al.*, 2009; GASPARINI *et al.*, 2009; MENANI *et al.*, 1996; MENANI e JOHNSON, 1998; MENEZES *et al.*, 2011) Logo, sinais não modificados ou parcialmente modificados pela ativação dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL, como os sinais cardiovasculares sugeridos no presente estudo, ainda poderiam ser modulados ou mediados por outros neurotransmissores no NPBL. Quais neurotransmissores/receptores medeiam ou modulam cada sinal é um importante passo a ser testado em estudos futuros.

Apesar da ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções de noradrenalina especificamente no NPBL ser um mecanismo que facilita a ingestão de NaCl 1,8% (GASPARINI *et al.*, 2009) e presentes resultados), o principal sítio e os mecanismos envolvidos na resposta pressora não estão claros. Injeções bilaterais ou unilaterais de noradrenalina nas mesmas doses no NPBL ou fora do NPBL produzem potentes e similares

respostas pressora e bradicardia, sugerindo que a resposta pressora não é dependente especificamente da ação da noradrenalina no NPBL.

Injeções de moxonidina (agonista adrenérgico α_2 /imidazólico) ou fenilefrina (agonista específico adrenérgico α_1) no NPBL não produzem mudança na pressão arterial ou na frequência cardíaca, o que sugere que a ativação desses receptores pela noradrenalina no NPBL não seria o mecanismo envolvido na resposta pressora (ANDRADE *et al.*, 2004). Mesmo excluindo a ação da noradrenalina nos receptores adrenérgicos α no NPBL para produzir resposta pressora e bradicardia, é possível que noradrenalina esteja se espalhando e ativando receptores adrenérgicos α localizados em área ao redor para produzir resposta pressora e bradicardia. A ativação simpática e/ou a secreção de vasopressina são os principais mecanismos usualmente envolvidos na resposta pressora produzida pela estimulação de áreas centrais. Injeções de noradrenalina, em diferentes doses (3, 7, 10, 15, 30 e 45 nmol/100 nl) no córtex insular de animais anestesiados, produziu uma potente resposta pressora e bradicárdica decorrente da liberação de vasopressina. Injeções do agonista adrenérgico α_1 , fenilefrina, produziram semelhante resposta pressora, reforçando a ideia que a ativação desses receptores adrenérgicos no córtex insular produz alterações cardiovasculares (ALVES *et al.*, 2011). Além disso, injeções de noradrenalina no núcleo supra-óptico (1, 3, 10, 30 e 45 nmol/100 nl) produziram resposta pressora que também foram dependentes da liberação de vasopressina. No entanto, nesta área parece que a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 é responsável pela resposta pressora produzida pelas injeções de noradrenalina (BUSNARDO, TAVARES e CORREA, 2009). Noradrenalina (10 nmol/100 nl) injetada no núcleo da stria terminal também produz uma potente resposta pressora dependente tanto da ativação de receptores α_1 como e adrenérgicos α_2 (CRESTANI *et al.*, 2007; 2008). Portanto, já é bem estabelecido na literatura, que injeções de noradrenalina em algumas áreas centrais ativam a liberação de vasopressina para produzir uma resposta pressora. Além da ativação de receptores adrenérgicos em áreas centrais, sabe-se que ativação colinérgica em áreas prosencefálicas produz uma resposta pressora dependente da ativação simpática e de liberação de vasopressina (HOFFMAN *et al.*, 1977; IMAI *et al.*, 1989; MENANI *et al.*, 1990; TAKAKURA *et al.*, 2011). Logo, para investigar se noradrenalina injetada no NPBL estava agindo centralmente para produzir resposta pressora, as respostas cardiovasculares produzidas por noradrenalina injetada no NPBL foram testadas depois do bloqueio ganglionar com hexametônio combinado com o bloqueio periférico de receptores de vasopressina feito com o Composto de Manning. Como esperado, o duplo bloqueio (receptores vasopressinérgicos + bloqueio ganglionar) aboliu a resposta pressora produzida

pela ativação colinérgica central. O duplo bloqueio também aboliu a bradicardia produzida pela injeção de noradrenalina no NPBL e a resposta pressora produzida por injeção endovenosa de vasopressina, confirmando que o tratamento com hexametônio produziu um efetivo bloqueio ganglionar (neste caso o gânglio parassimpático estava relacionado com a bradicardia) e o antagonista de vasopressina foi efetivo em bloquear os receptores periféricos de vasopressina. Entretanto, o duplo bloqueio, ao invés de reduzir, aumentou a resposta pressora produzida por injeções de noradrenalina no NPBL, sugerindo que noradrenalina não ativa mecanismos usualmente envolvidos na resposta pressora resultantes da ativação de áreas centrais ou que noradrenalina não está agindo centralmente para produzir resposta pressora. O aumento da resposta pressora produzida pela noradrenalina em ratos com duplo bloqueio é provavelmente consequência da remoção da bradicardia reflexa. Apesar dos resultados de ratos tratados com hexametônio sugerirem que noradrenalina injetada no NPBL não ativa mecanismos simpáticos, a resposta pressora produzida por noradrenalina injetada no NPBL foi abolida por injeções periféricas do antagonista de receptor adrenérgico α_1 , prazosin, sugerindo que noradrenalina injetada no NPBL pode espalhar para a periferia e ativar receptores adrenérgicos α_1 localizados nos vasos sanguíneos para produzir resposta pressora. Resultados mostrando que a mesma dose de noradrenalina injetada endovenosamente ou no NPBL produzem respostas pressoras similares reforçam a sugestão de que noradrenalina injetada no NPBL pode espalhar para a periferia para produzir respostas pressoras. Injeções de noradrenalina nas doses de 80 e 160 nmol no VL também produziram resposta pressora em animais depletados de sódio, porém, agonistas específicos de receptores adrenérgicos α_1 , α_2 e β_1/β_2 , fenilefrina (160 nmol), clonidina (30 nmol) e isoproterenol (160 nmol), respectivamente, injetados no VL não modificaram a pressão arterial ou alguns deles causaram redução da pressão arterial (YADA, DE PAULA, MENANI e DE LUCA JUNIOR, 1997), o que também sugere que noradrenalina injetada no VL, diferentemente dos demais agonistas adrenérgicos, poderia estar se espalhando para a periferia para produzir respostas pressoras.

Em resumo, os presentes resultados sugerem que os sinais inibitórios de receptores cardiovasculares ainda afetam a ingestão de água e de NaCl após as injeções de noradrenalina no NPBL, o que sugere que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 com noradrenalina injetada no NPBL, pelo menos na dose testada, pode não remover completamente os sinais inibitórios produzidos pela ativação de receptores cardiovasculares, particularmente os sinais resultantes de uma ativação extra desses receptores produzidos pelo aumento da pressão arterial. Além disso, as respostas pressoras resultantes da injeção de noradrenalina no NPBL

parecem ser dependentes da ativação direta de receptores adrenérgicos α_1 periféricos e não da ação central de noradrenalina.

Ação dos fatores orosensoriais e pós-ingestivos envolvidos no controle da ingestão de água e sódio em ratos tratados com noradrenalina ou moxonidina no NPBL

Além de confirmar que injeções de noradrenalina no NPBL aumenta a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP, o presente estudo mostrou que estas injeções aumentaram o número de lambidas dos 15 aos 30 min do teste e que a combinação de prazosin i.p. e noradrenalina em NPBL aumentou ainda mais a ingestão de sódio durante uma hora, uma vez que ocorreu um aumento no número de lambidas dos 30 aos 90 min do teste.

Além de aumentar o número de lambidas/intervalo, injeções bilaterais de noradrenalina no NPBL aumentaram o número de *bursts/intervalo* para NaCl 1,8% dos 15 aos 30 min do teste, sem alterar o número de lambidas/*burst* em animais tratados com FURO + CAP. As injeções de prazosin i.p. combinadas com noradrenalina aumentaram o número de *bursts/intervalo* para NaCl 1,8% de 15 a 60 minutos do teste e também aumentaram o número de lambidas/*burst* para NaCl 1,8% de 30 a 45 minutos do teste. O número de *bursts/intervalo* para NaCl 1,8% também aumentou entre 30 e 45 min com a mesma combinação de prazosin e noradrenalina quando se compara com o tratamento apenas com noradrenalina. Prazosin combinado com salina no NPBL aumentou o número de *bursts/intervalo* de 0 a 15 min, assim como aumentou o número de lambidas/*burst* para o NaCl 1,8% entre 45 e 60 minutos e entre 90 e 105 minutos de testes.

Semelhante aos resultados com noradrenalina no NPBL e resultados anteriores (ANDRADE *et al.*, 2004), injeções bilaterais de moxonidina no NPBL aumentaram a ingestão de NaCl 1,8% induzida por FURO + CAP. O presente estudo também demonstrou que moxonidina no NPBL aumentou o número de lambidas/intervalo para NaCl 1,8% até os 60 minutos do teste em animais tratados com FURO + CAP. Esse aumento do número de lambidas acarretou um aumento no número de *bursts/intervalo* do tempo 0 até os 75 min do teste e também modificaram o número de lambidas/*burst* para NaCl 1,8% dos 15 aos 60 min do teste em animais tratados com FURO + CAP.

Estudo anterior (DAVIS e SMITH, 1992) demonstrou que alteração no número de *bursts/intervalo* está relacionada com sinais pós-ingestivos, enquanto que a alteração no número de lambidas/*burst* está relacionada a sinais orosensoriais. Assim, os resultados observados com injeções de moxonidina no NPBL sugerem que a ativação de receptores

adrenérgicos α_2 do NPBL produz alterações nos sinais orosensoriais e pós-ingestivos. No entanto, os resultados produzidos por injeções de noradrenalina no NPBL não são conclusivos, uma vez que injeções de noradrenalina fora do NPBL, apesar de não produzirem um aumento na ingestão de sódio, quando combinadas com prazosin i.p. também causaram um aumento no número de *bursts*/intervalo de 15 a 45 min de teste, o que sugere uma inespecificidade da noradrenalina no NPBL em relação ao número de *bursts*. Por outro lado, Nos primeiros 15 minutos do teste (primeiro intervalo), esta mesma combinação reduziu o número de *bursts*, o que pode ser devido ao efeito hipotensor do prazosin, o qual pode causar dificuldade de locomoção do animal.

Além disso, injeções de noradrenalina fora do NPBL combinadas com prazosin i.p. aumentaram o número de lambidas/*burst* nos primeiros 15 minutos do teste, o que sugere mais uma vez uma efeitos inespecíficos da noradrenalina análise microestrutural. Portanto, em animais tratados com a combinação de prazosin sistemicamente com injeções de noradrenalina no NPBL não se pode afirmar com certeza que a alteração na ingestão de sódio ocorre devido a uma diminuição dos sinais inibitórios pós-ingestivos e alteração dos sinais orosensoriais. Por outro lado, apesar de não existirem animais com injeções fora do NPBL em número suficiente para análise ($n = 2$), os efeitos das injeções de moxonidina no NPBL na análise microestrutural de lambidas são mais consistentes, e sua ação no NPBL não produz alteração na pressão arterial em ratos tratados com FURO + CAP (ANDRADE *et al.*, 2004). Assim, de acordo com os efeitos da moxonidina injetada no NPBL, é possível que a alteração na ingestão de sódio produzida pelas injeções de moxonidina no NPBL esteja relacionada às modificações dos sinais orosensoriais e pós-ingestivos produzidos pela ativação dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL.

Quanto à ingestão de água, as injeções de noradrenalina no NPBL não alteraram o consumo total de água induzido por FURO + CAP, no entanto, prazosin sozinho ou combinado com noradrenalina no NPBL aumentou a ingestão de água em ratos tratados com FURO + CAP. Os resultados mostraram que injeções prévias de prazosin i.p. combinadas com noradrenalina injetada no NPBL aumentaram o número de lambidas/intervalo para água entre 30 e 60 minutos de teste e também entre 75 e 90 minutos de teste comparando-se com o controle (salina i.p. + salina NPBL). Entre 30 e 60 minutos, injeções de prazosin i.p. combinadas com noradrenalina injetada no NPBL também aumentaram o número de lambidas/intervalo para a água comparando-se com o tratamento com salina i.p. combinada com noradrenalina no NPBL. Prazosin i.p. combinado com salina no NPBL aumentou o número de lambidas para água nos primeiros 15 minutos do teste.

Em relação à análise do número e tamanho de *bursts*, injeções bilaterais de noradrenalina no NPBL aumentaram o número de *bursts*/intervalo para a ingestão de água de 30 aos 45 min do teste. Entretanto, injeções de noradrenalina no NPBL combinadas com prazosin i.p. aumentaram o número de *bursts*/intervalo para água dos 15 aos 60 minutos do teste, um efeito que também foi diferente do tratamento apenas com noradrenalina no NPBL no mesmo período. Nenhum tratamento modificou o número de lambidas/*burst* para água. Assim como o tratamento com noradrenalina, injeções de moxonidina no NPBL também não alteraram o volume de água ingerido. Porém diferentemente da noradrenalina, as injeções de moxonidina também não produziram nenhum efeito na análise microestrutural de lambidas, sugerindo que a ativação desses receptores no NPBL não produz alterações nos sinais orosensoriais e nem nos sinais pós-ingestivos. Assim, parece que, no que diz respeito à ingestão de água, os efeitos no número lambidas/intervalo ou de *bursts*/intervalo nos animais tratados prazosin e noradrenalina sozinhos ou combinados estejam mais relacionado com as alterações da pressão arterial do que propriamente com sinais orosensoriais ou pós-ingestivos. Isto é reforçado quando se observa que os efeitos da noradrenalina injetada fora do NPBL foram semelhantes aos efeitos da noradrenalina injetada no NPBL.

Informações dos receptores gustatórios representam importante sinal orosensorial que pode chegar ao NPBL. As sensações gustatórias chegam ao encéfalo por meio de três principais vias: inervação vagal (X) da faringe, inervação glossofaríngea (IX) da parte posterior da língua e inervação facial (VII) da parte anterior da língua. É por meio desta última que o sabor do NaCl chega ao SNC (FRANK, CONTRERAS e HETTINGER, 1983). Secção do ramo corda do tímpano do nervo facial, mas não a secção do nervo glossofaríngeo, interrompe drasticamente a discriminação do NaCl de outros cloretos, enquanto que a discriminação aos outros sabores permanece intacta, (BRESLIN *et al.*, 1993). Foi demonstrado que em animais depletados de sódio pelo tratamento com furosemida e uma dieta pobre em sódio por 24 horas com secção do corda do tímpano e com ausência de sinais pós-ingestivos devido à presença de uma fístula no estômago, não apresentam um robusto e sustentado apetite ao sódio como ocorre em animais com o corda do tímpano intacto. Também é possível observar nestes mesmos animais uma diminuição do número de lambidas/intervalo e do o número de *bursts*/intervalo. No entanto, os autores não observaram alteração no número de lambidas/*burst*. Os autores sugerem que mesmo com os sinais pós-ingestivos minimizados a transecção do corda do tímpano reduz os sinais excitatórios que levam uma robusta ingestão de sódio. Os autores sugerem que mesmo com os sinais pós-ingestivos minimizados, após transecção do corda do tímpano aferências gustatórias

remanescentes são capazes de produzir um modesto apetite ao sódio (FRANKMANN, SOLLARS e BERNSTEIN, 1996). No entanto, os autores não discutem a interferência da transecção do corda do tímpano na análise microestrutural de lambidas. Porém, é possível que a transecção do corda do tímpano influencie de alguma forma os sinais pós-ingestivos, uma vez que nestes animais o número de *burst*/intervalo está diminuído. Esta influência pode ser, por exemplo, em nível central. Informações provenientes deste nervo poderiam chegar ao SNC e enviar projeções para áreas centrais que recebem informações de sinais pós-ingestivos. No entanto, não há relatos na literatura de que essa hipótese seja verdadeira.

As fibras do nervo corda do tímpano terminam na porção rostral do núcleo do trato solitário (NTS) (HAMILTON e NORGREN, 1984). Como revisado previamente (NORGREN, 1995), há projeções ascendentes do NTS para o núcleo parabraquial (PBN), que por sua vez envia sinais para regiões talâmicas, como o núcleo talâmico posteromedial ventral parvocelular (VPMpc), a qual envia projeções passando pela zona incerta até relevantes regiões corticais. Estudos com lesões tentaram determinar a importância de estruturas da via gustatória central para o aparecimento do apetite ao sódio. Lesões realizadas tanto no NTS, PBN ou VPMpc impediram a mudança na reação ao sabor observada em animais intactos após a depleção de sódio (FLYNN *et al.*, 1991). Já as lesões do PBN e NTS, mas não do tálamo bloquearam a expressão comportamental do apetite ao sódio, observada em animais intactos após a depleção de sódio, (FLYNN *et al.*, 1991). Por estes estudos, nota-se que o núcleo parabraquial, a segunda estação sináptica das aferências gustatórias no rato, é importante para as modificações da reatividade ao sabor do NaCl que ocorre após a depleção de sódio. De acordo com os presentes resultados, é possível que injeção de prazosin i.p. esteja bloqueando a resposta pressora da noradrenalina e, portanto, permitindo que as alteração nos sinais orosensoriais produzidas por ativação de receptores adrenérgicos α_2 possam ser observadas, sugerindo que a ativação desses receptores no NPBL poderia alterar os sinais gustatórios que chegam ao SNC pelo corda do tímpano o que poderia facilitar a ingestão de água e de sódio.

A influência da pressão arterial e dos receptores cardiovasculares e possivelmente cardiopulmonares no controle da ingestão de água e sódio já está relativamente bem estabelecida (JOHNSON e THUNHORST, 1997). A infusão i.v. de ANG II produz uma grande ingestão de água, que pode ser ainda maior quando a resposta pressora da ANG II é minimizada com tratamento combinado de captopril e minoxidil, drogas que reduzem a pressão arterial (ROBINSON e EVERED, 1987). Além de inibir a ingestão de água, o aumento na pressão arterial também pode inibir a ingestão de sódio. Stricker e colaboradores

(1983) demonstraram que os ratos tratados com polietilenoglicol tiveram um rápido apetite ao sal quando tratados com uma dose baixa do inibidor da enzima conversora de angiotensina, o captopril. Um rápido desenvolvimento do apetite sal também é produzido pela administração de captopril em ratos hipovolêmicos tratados com furosemida (FITTS e MASSON, 1989; THUNHORST e JOHNSON, 1994). Portanto, é razoável a proposta de um mecanismo semelhante influenciar a sede e o apetite ao sódio no caso da resposta pressora da noradrenalina injetada no NPBL e também as modificações deste comportamento ingestivo quando a noradrenalina no NPBL é combinada com as injeções de prazosin i.p. No entanto, ainda não se sabe se a resposta pressora afetaria os sinais orosensoriais, influenciando diretamente os sinais de receptores gustatórios que chegam ao SNC, os sinais pós-ingestivos, alterando, por exemplo, sinais provenientes de distensão gástrica ou liberação de hormônios ou ambos. Uma intensificação destes sinais em qualquer nível da via neural poderia aumentar a inibição da ingestão. Outra possibilidade ainda é a descarga de pressoreceptores gerar sinais que poderiam inibir a ingestão de água e sódio independentemente de modificações na intensidade dos sinais orosensoriais ou pós-ingestivos. Neste caso, as alterações de pressão arterial estariam se somando aos sinais orosensoriais e/ou pós-ingestivos com conseqüências nos resultados da análise microestrutural das lambidas. Ou seja, o que estaria sendo reconhecido pela análise das lambidas como sinal orosensorial ou pós-ingestivos seria na verdade um terceiro sinal que é o das alterações da pressão arterial e que não seria uma conseqüência direta do comportamento ingestivo ativando sinais orosensoriais ou pós-ingestivos.

Sinais gustatórios e pós-ingestivos, como de osmorreceptores viscerais, distensão gástrica e preenchimento gastrintestinal são fatores importantes para a ingestão de sódio (LEVY e MCCUTCHEON, 1974; WOLF, SCHULKIN e SIMSON, 1984). Estudos demonstraram que a infusão intragástrica de NaCl é suficiente para saciar o apetite de sódio em ratos que receberam injeções de formalina (LEVY e MCCUTCHEON, 1974). Além disso, Tordoff e colegas (1986; 1987) sugeriram que o consumo de sal em ratos pode ser também controlado pelo fígado. É possível que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 remova alguns destes sinais inibitórios para a ingestão de sódio. Além de inibir sinais pós-ingestivos, a ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL com moxonidina modifica sinais orosensoriais. Como discutido acima, estudos anteriores demonstraram que a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 com as injeções de moxonidina no NPBL reduz as respostas aversivas e aumenta as respostas hedônicas produzidas por infusão intra-oral de NaCl hipertônico em ratos (ANDRADE *et al.*, 2011). Antes do acesso à água e NaCl, os ratos

tratados com FURO + CAP apresentam um número baixo de respostas aversivas e um alto número de respostas hedônicas induzidas por infusão intra-oral de NaCl hipertônico. À medida que os ratos ingerem água e NaCl 1,8%, as respostas hedônicas são fortemente reduzidas. No entanto, se os ratos são tratados com injeções bilaterais de moxonidina no NPBL o baixo número das respostas aversivas e o elevado número de respostas hedônicas não muda com a ingestão de água e NaCl durante pelo menos uma hora (ANDRADE *et al.*, 2011). Estudos anteriores também demonstraram que a noradrenalina injetada no NPBL facilita a ingestão de sódio induzida por FURO + CAP ativando α_2 adrenérgicos (GASPARINI *et al.*, 2009). Em conjunto, estes resultados permitem se concluir que a ativação de receptores α_2 adrenérgicos no NPBL modifica a ação dos sinais orosensoriais e também os sinais pós-ingestivos que são importantes para inibir e limitar a ingestão de sódio em ratos tratados por FURO + CAP.

Envolvimento dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL na ingestão de sódio induzida por ativação colinérgica

O apetite ao NaCl é fortemente inibido pela desidratação celular (FITZSIMONS e WIRTH, 1978) ao mesmo tempo em que sinais dos osmorreceptores ativam os circuitos cerebrais que desencadeiam a sede (FITZSIMONS, 1984). A sede induzida pela injeção i.c.v. de carbacol seria consequência da ativação de circuitos prosencefálicos relacionados à desidratação celular, (FITTS e SIMPSON, 1986) e, além de induzir a ingestão de água, o carbacol inibiria a ingestão de sódio (FITTS, THUNHORST e SIMPSON, 1985b; FITTS e SIMPSON, 1986). Porém, estudos demonstraram que a hiperosmolaridade plasmática ou a desidratação celular em animais normovolêmicos não é apenas um estímulo para a ingestão de água, mas também um estímulo para a ingestão de NaCl. Em um estudo anterior (DE LUCA, BARBOSA e MENANI, 2003), foi demonstrado que o bloqueio serotoninérgico com injeções de metisergida no NPBL também induzia ingestão de NaCl 1,8% em ratos tratados com sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M. A ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL também produz uma forte ingestão de NaCl 1,8% em animais com sobrecarga de NaCl 2 M (ANDRADE *et al.*, 2006). Menani e colaboradores (2002) também mostraram que ocorre ingestão de NaCl hipertônico em ratos tratados com metisergida no NPBL e doses dipsogênicas do agonista colinérgico carbacol i.c.v.

A estimulação colinérgica com injeção i.p. de pilocarpina também é um estímulo que produz significativa ingestão de água, mas nenhuma ingestão de NaCl hipertônico

(BORELLA *et al.*, 2008). A estimulação colinérgica com injeções de pilocarpina i.p. também produz potentes respostas pressoras que poderiam ativar mecanismos inibitórios responsáveis por bloquear a ingestão de sódio por estes estímulos. No presente trabalho, a injeção i.p. de pilocarpina produziu ingestão de água que foi reduzida pela injeção prévia de noradrenalina no NPBL, mas a injeção i.p. de pilocarpina sozinha ou combinada com noradrenalina no NPBL não produziu ingestão significativa de NaCl 1,8%. Porém, o tratamento prévio com injeção de prazosin i.p. resultou em uma ingestão significativa de NaCl 1,8% em ratos tratados com pilocarpina i.p. combinada com noradrenalina injetada no NPBL. Além disso, a inibição da ingestão de água que ocorreu quando se combinou pilocarpina i.p. com noradrenalina no NPBL foi revertida com o tratamento prévio com prazosin i.p. A análise das variações da pressão arterial confirmou que o prazosin i.p. foi capaz de reduzir as respostas pressoras produzidas por noradrenalina injetada no NPBL e também por pilocarpina i.p. Logo, os resultados sugerem que ao se bloquear as respostas pressoras, a pilocarpina i.p. combinada com noradrenalina no NPBL produz uma significativa ingestão de sódio, o que também sugere que o aumento da pressão arterial é um forte mecanismo inibitório da ingestão de sódio que está atuando mesmo após a ativação de receptores adrenérgicos α_2 com injeções de noradrenalina no NPBL.

Assim como a pilocarpina i.p., injeções de carbacol i.c.v. causam um aumento da pressão arterial decorrente da liberação de vasopressina e do aumento da atividade simpática (HOFFMAN *et al.*, 1977; IMAI *et al.*, 1989). Além de modificar a pressão arterial, injeções i.c.v. de carbacol produzem uma resposta dipsogênica, mas nenhuma ingestão significativa de NaCl 1,8%. Os presentes resultados mostraram que a injeção de carbacol i.c.v. combinada com injeções de noradrenalina no NPBL também não produziu modificação significativa da ingestão de NaCl 1,8%. No entanto, a injeção de carbacol i.c.v. combinada com injeções de noradrenalina no NPBL em ratos pré-tratados com prazosin i.p. produziu uma significativa ingestão de NaCl 1,8%. Neste caso, o tratamento com prazosin i.p. reduziu a resposta pressora da noradrenalina, mas não alterou significativamente a resposta pressora produzida pelas injeções de carbacol no VL. Estudos demonstraram que a resposta pressora produzida por carbacol i.c.v. é dependente de ativação simpática e de liberação de vasopressina (HOFFMAN *et al.*, 1977; IMAI *et al.*, 1989). Injeções de prazosin i.p. provavelmente estão diminuindo a ação simpática dessa resposta, mas não é possível saber o quanto de vasopressina está sendo liberada para impedir que a resposta pressora do carbacol i.c.v. seja reduzida. Por isso, mesmo que prazosin i.p. reduza a resposta pressora da noradrenalina injetada no NPBL, é possível observar tendência de inibição inicial na ingestão de água nos

animais tratados com prazosin i.p. combinado com noradrenalina no NPBL e carbacol no VL. Por outro lado, uma redução na resposta pressora da noradrenalina produziu um aumento na ingestão de sódio em animais tratados com carbacol i.c.v., sugerindo novamente um papel inibitório do aumento da pressão arterial na ingestão de sódio. No entanto, pode-se observar que houve uma tendência de aumento da ingestão de sódio quando se combinou apenas noradrenalina no NPBL com carbacol i.c.v. É possível que a ativação colinérgica com carbacol produza um potente estímulo para a ingestão de sódio. Apesar de noradrenalina ativar receptores adrenérgicos α_2 e inibir o mecanismo do NPBL, o que prevalece é o sinal inibitório decorrente do aumento da pressão arterial, que no caso parece ser principalmente aquele produzido pela noradrenalina.

Os resultados do presente trabalho também mostraram que injeções bilaterais de moxonidina, mesmo sem o tratamento prévio com prazosin, produziram um aumento na ingestão de NaCl 1,8% em animais tratados com pilocarpina i.p. Neste caso, é preciso considerar que as injeções bilaterais de moxonidina por si só não causaram alteração na pressão arterial, mas a resposta pressora da pilocarpina i.p. foi mantida, o que seria uma condição semelhante àquela dos ratos que receberam prazosin i.p. previamente à combinação de carbacol i.c.v. com noradrenalina no NPBL, nos quais a resposta pressora da noradrenalina foi abolida, enquanto a resposta pressora do carbacol foi mantida. Assim, apesar de pilocarpina i.p. e carbacol i.c.v. produzirem uma resposta pressora, quando estes são combinados com moxonidina no NPBL ou noradrenalina no NPBL + prazosin i.p., respectivamente, a resposta pressora restante não limita a ingestão de sódio. Isso, poderia ser contrário à sugestão que os sinais inibitórios produzidos pelo aumento de pressão arterial continuariam, pelo menos em parte, atuando após a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL. Porém, é preciso considerar que há uma diferença entre as intensidades das respostas pressoras que ocorrem em ratos tratados com moxonidina no NPBL combinada com pilocarpina i.p. ou quando noradrenalina no NPBL foi combinada com carbacol i.c.v. em ratos pré-tratados com prazosin i.p. comparando-se com a condição na qual apenas noradrenalina no NPBL foi combinada com carbacol i.c.v. ou pilocarpina i.p. A resposta pressora da noradrenalina injetada no NPBL chega a alcançar 60 mmHg, enquanto a resposta pressora da pilocarpina i.p. chegaria no máximo 30 a 40 mmHg. Portanto, no caso da noradrenalina, a intensidade dos sinais ou mesmo os mecanismos ativados, poderiam estar mesmo além daqueles que poderiam ser controlados ou influenciados pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL, o que confirmaria a sugestão que parte dos sinais gerados pelas modificações da pressão arterial continuariam inibindo a ingestão de água e

sódio mesmo após a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL. Por outro, os resultados obtidos com a combinação de moxonidina no NPBL e pilocarpina i.p. ou carbacol i.c.v. combinado com noradrenalina no NPBL em ratos pré-tratados com prazosin i.p. sugerem que a inibição da ingestão de sódio causada por aumentos menores da pressão arterial como aqueles produzidos pela injeção i.p. de pilocarpina ou carbacol i.c.v. poderia ser bloqueada pela ativação de receptores adrenérgicos α_2 no NPBL.

O presente trabalho também demonstrou que injeções de moxonidina ou noradrenalina fora do NPBL combinada com pilocarpina i.p. ou carbacol i.c.v. não produziram alteração na ingestão de NaCl 1,8%, mostrando assim a especificidade do NPBL no controle da ingestão de sódio. Por outro lado, injeções de noradrenalina fora do NPBL combinada com prazosin i.p. diminuíram a ingestão de água, devido provavelmente ao efeito pressor da noradrenalina e não de ação específica da noradrenalina agindo no mecanismo central da sede.

O NPBL está conectado reciprocamente as áreas prosencefálicas que controlam a ingestão de líquidos e o equilíbrio hidroeletrólítico, tais como o núcleo paraventricular do hipotálamo, o núcleo central da amígdala e o núcleo pré-óptico mediano, e também as regiões bulbares, tais como a AP/NTSm que recebem informações viscerais e informações de sabor, (CIRIELLO, LAWRENCE e PITTMAN, 1984; FULWILER e SAPER, 1984; LANCA e VAN DER KOOY, 1985; SHAPIRO e MISELIS, 1985; HERBERT, MOGA e SAPER, 1990; JHAMANDAS *et al.*, 1992; KRUKOFF, HARRIS e JHAMANDAS, 1993; SPECTOR, 1995; JHAMANDAS *et al.*, 1996). As células do NPBL são ativadas após a ingestão de soluções de sódio em ratos desidratados (YAMAMOTO *et al.*, 1993; FRANCHINI e VIVAS, 1999) e também em ratos que receberam sobrecarga intragástrica de NaCl hipertônico (KOBASHI *et al.*, 1993) sugerindo que as células do NPBL poderiam ser ativadas por sinais viscerais ou talvez sinais de sabor. Assim, as aferências osmóticas viscerais e as informações do sabor de sódio vindas da AP/NTS que chegam ao NPBL são processadas e integradas, de onde partem para possivelmente inibir os circuitos neurais que desencadeiam o apetite ao sódio.

As informações dos osmorreceptores poderiam ativar os circuitos que desencadeiam a ingestão de sódio paralelamente a sede, mas um mecanismo dependente do NPBL poderia simultaneamente inibir esses circuitos e, portanto restringir a ingestão de sódio, pelo menos a de sódio hipertônico, prevenindo assim o agravamento da desidratação celular. De acordo com os presentes resultados, a ativação colinérgica pode ser também um estímulo excitatório para a ingestão de sódio, sugerindo que os circuitos cerebrais que controlam o apetite ao

sódio, como aqueles que desencadeiam a sede, são ativados não apenas pela desidratação extracelular, mas também pela desidratação intracelular. Portanto, a ativação desse comportamento depende da modulação exercida pelos mecanismos envolvendo o NPBL que inibe fortemente o apetite ao sódio. A ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL desativa o mecanismo inibitório e leva a ingestão de sódio hipertônico em ratos tratados com agonistas colinérgicos. Porém, ainda não está muito claro qual o tipo de sinal inibitório que é retirado quando se ativa os receptores adrenérgicos α_2 do NPBL. A ingestão de sódio em animais tratados com noradrenalina no NPBL combinada com pilocarpina i.p. ou carbacol i.c.v. só aparece quando é feita injeção prévia de prazosin i.p., o qual é capaz de bloquear a resposta pressora da noradrenalina. Pode ser que a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL retire parcial, mas não totalmente, os sinais inibitórios provenientes de barorreceptores arteriais. A retirada de outros sinais inibitórios como aqueles de receptores gustatórios ou viscerais também poderia ocorrer com a ativação de receptores adrenérgicos α_2 do NPBL como sugerido por estudos anteriores (ANDRADE *et al.*, 2011).

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

Nos presentes resultados também foi possível verificar que a ativação dos receptores adrenérgicos α_2 do NPBL combinada com um estímulo dipsogênico e ou/ natriorexigêncio também facilita a ingestão de sódio. No entanto, ainda não é possível distinguir quais os sinais inibitórios que são removidos ou modificados após a ativação desses receptores. É possível que injeções de noradrenalina no NPBL possam ativar receptores adrenérgicos α_2 e remover ou modificar sinais provenientes de barorreceptores e/ou receptores cardiopulmonares, sinais orosensoriais ou sinais pós-ingestivos que influenciam na ingestão de água e de sódio, o que acarreta num aumento da ingestão de sódio. No entanto, mesmo após a ativação de receptores adrenérgicos α_2 , sinais provenientes de barorreceptores arteriais e cardiopulmonares podem interferir na ingestão de água e de sódio. Injeções de prazosin i.p. levam a uma queda da PAM, promovendo uma remoção destes sinais inibitórios e facilitando a ingestão de água e de sódio induzida por estímulos dipsogênico ou natriorexigêncio (Figura 26).

Portanto, os resultados do presente trabalho sugerem que estímulos dipsogênico e natriorexigêncio levam a um aumento na ingestão de água e de sódio (Figura 26). Na medida em que o animal ingere, sinais provenientes de barorreceptores e receptores cardiopulmonares, sinais orosensoriais e pós-ingestivos são enviados para AP e NTS, os

quais fazem conexões indiretas e diretas com o NPBL, que por sua vez faz conexões inibitórias com áreas prosencefálicas inibindo o comportamento ingestivo. Injeções de noradrenalina no NPBL ativam receptores adrenérgicos α_2 e removem ou modificam sinais provenientes de barorreceptores e/ou receptores cardiopulmonares, sinais orosensoriais ou sinais pós-ingestivos, como sinais provenientes de receptores provenientes no estômago, fígado e intestino, que influenciam na ingestão de água e de sódio, o que acarreta num aumento da ingestão de sódio. No entanto, mesmo após a ativação de receptores adrenérgicos α_2 , sinais provenientes de barorreceptores arteriais e cardiopulmonares podem interferir na ingestão de água e de sódio. Injeções de prazosin i.p. levam a uma queda da PAM, promovendo uma remoção destes sinais inibitórios e facilitando a ingestão de água e de sódio induzida por estímulos dipsogênico ou natriorexigênico.

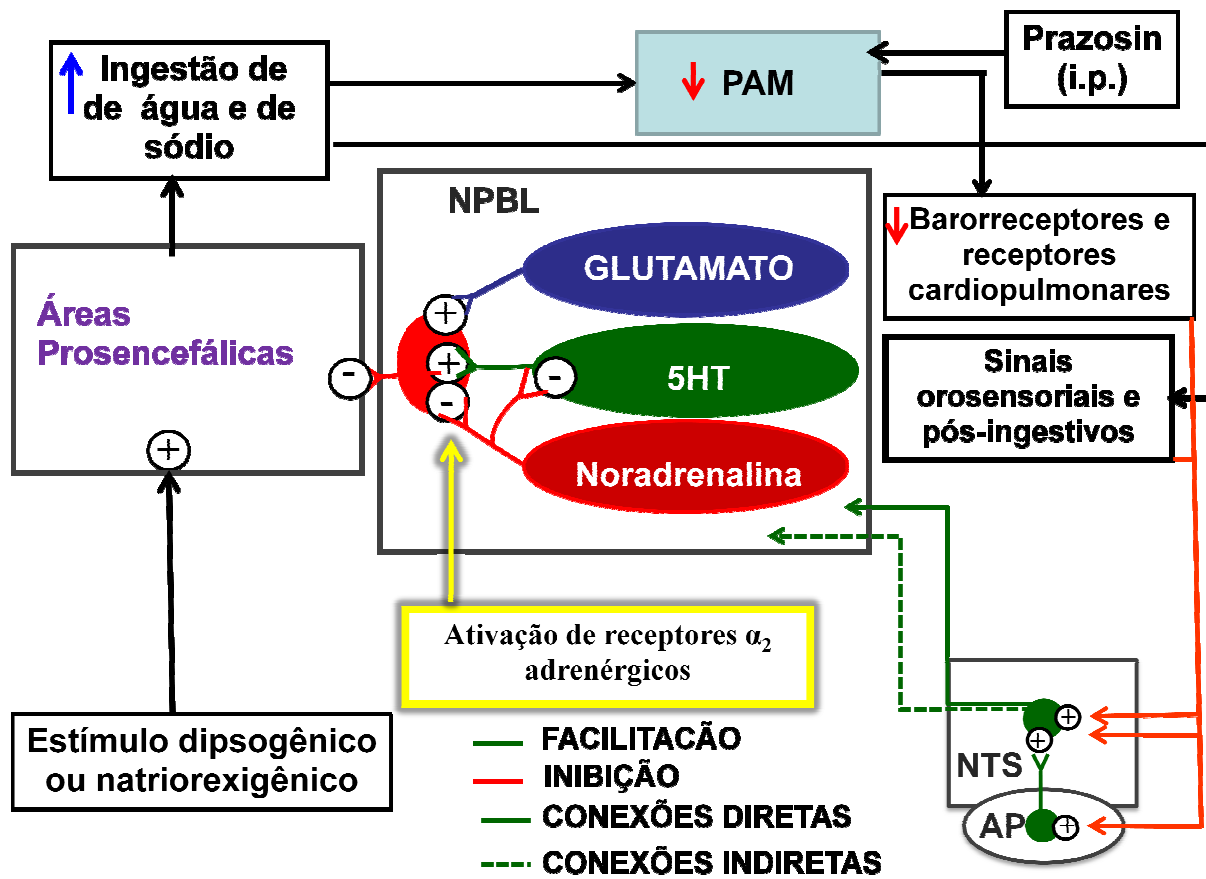


Figura 26: Diagrama representando o envolvimento do NPBL no controle da sede e apetite ao sódio durante estímulos dipsogênicos (ativação colinérgica) ou natriorexigênicos (tratamento com FURO + CAP).

7- Referências

ALLEN, A. M.; MCKINLEY, M. J.; MENDELSON, F. A. Comparative neuroanatomy of angiotensin II receptor localization in the mammalian hypothalamus. **Clin Exp Pharmacol Physiol**, v. 15, n. 2, p. 137-45, Feb 1988.

ALVES, F. H.; CRESTANI, C. C.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjected into the insular cortex of unanesthetized rats. **Auton Neurosci**, v. 160, n. 1-2, p. 90-8, Feb 24 2011.

ANDRADE, C. A.; ANDRADE-FRANZE, G. M.; DE LUCA, L. A., JR.; JOHNSON, A. K.; MENANI, J. V. Changes in taste reactivity to intra-oral hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an alpha2-adrenergic receptor agonist. **Physiol Behav**, v. 104, n. 5, p. 702-8, Oct 24 2011.

ANDRADE, C. A.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA, L. A., JR.; MENANI, J. V. Activation of alpha2-adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 25-34, 2004.

ANDRADE, C. A.; DE LUCA, L. A., JR.; COLOMBARI, D. S.; MENANI, J. V. Alpha2-adrenergic activation in the lateral parabrachial nucleus induces NaCl intake under conditions of systemic hyperosmolarity. **Neuroscience**, v. 142, n. 1, p. 21-8, Sep 29 2006.

ANTUNES-RODRIGUES, J.; MCCANN, S. M.; SAMSON, W. K. Central administration of atrial natriuretic factor inhibits saline preference in the rat. **Endocrinology**, v. 118, n. 4, p. 1726-8, Apr 1986.

BOOTH, R. E.; JOHNSON, J. P.; STOCKAND, J. D. Aldosterone. **Adv Physiol Educ**, v. 26, n. 1-4, p. 8-20, Dec 2002.

BORELLA, T. L.; DE LUCA, L. A., JR.; COLOMBARI, D. S.; MENANI, J. V. Central muscarinic receptor subtypes involved in pilocarpine-induced salivation, hypertension and water intake. **Br J Pharmacol**, v. 155, n. 8, p. 1256-63, Dec 2008.

BOUSQUET, P.; FELDMAN, J.; TIBIRICA, E.; BRICCA, G.; GRENEY, H.; DONTENWILL, M.; STUTZMANN, J.; BELCOURT, A. Imidazoline receptors. A new concept in central regulation of the arterial blood pressure. **Am J Hypertens**, v. 5, n. 4 Pt 2, p. 47S-50S, Apr 1992.

BOUSQUET, P.; GRENEY, H.; BRUBAN, V.; SCHANN, S.; EHRHARDT, J. D.; MONASSIER, L.; FELDMAN, J. I(1) imidazoline receptors involved in cardiovascular regulation: where are we and where are we going? **Ann N Y Acad Sci**, v. 1009, p. 228-33, Dec 2003.

BRAUN-MENENDEZ, E. [Increased appetite for sodium chloride provoked by desoxycorticosterone; substances which reinforce or inhibit this action]. **C R Seances Soc Biol Fil**, v. 146, n. 23-24, p. 1982-3, Dec 1952.

BRESLIN, P. A.; KAPLAN, J. M.; SPECTOR, A. C.; ZAMBITO, C. M.; GRILL, H. J. Lick rate analysis of sodium taste-state combinations. **Am J Physiol**, v. 264, n. 2 Pt 2, p. R312-8, Feb 1993.

BUSNARDO, C.; TAVARES, R. F.; CORREA, F. M. Mechanisms involved in the pressor response to noradrenaline microinjection into the supraoptic nucleus of unanesthetized rats. **Auton Neurosci**, v. 145, n. 1-2, p. 63-70, Jan 28 2009.

CALLERA, J. C.; CAMARGO, L. A.; DE LUCA JUNIOR, L. A.; MENANI, J. V.; RENZI, A.; SAAD, W. A. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral preoptic area reduce water intake in dehydrated rats. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 46, n. 1, p. 39-43, Sep 1993.

CALLERA, J. C.; OLIVEIRA, L. B.; BARBOSA, S. P.; COLOMBARI, D. S.; DE LUCA, L. A., JR.; MENANI, J. V. GABA(A) receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 725-35, 2005.

CALLERA, J. C.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A.; RENZI, A.; DE LUCA JUNIOR, L. A.; MENANI, J. V. Role of the adrenergic pathways of the lateral hypothalamus on water intake and pressor response induced by the cholinergic activation of the medial septal area in rats. **Neurosci Lett**, v. 167, n. 1-2, p. 153-5, Feb 14 1994.

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

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Cardiovascular effects of noradrenaline microinjection in the bed nucleus of the stria terminalis of the rat brain. **J Neurosci Res**, v. 85, n. 7, p. 1592-9, May 15 2007.

CRESTANI, C. C.; ALVES, F. H.; RESSTEL, L. B.; CORREA, F. M. Bed nucleus of the stria terminalis alpha(1)-adrenoceptor modulates baroreflex cardiac component in unanesthetized rats. **Brain Res**, v. 1245, p. 108-15, Dec 15 2008.

CURTIS, K. S.; KRAUSE, E. G.; CONTRERAS, R. J. Altered NaCl taste responses precede increased NaCl ingestion during Na(+) deprivation. **Physiol Behav**, v. 72, n. 5, p. 743-9, Apr 2001.

DAVIS, J. D. Some new developments in the understanding of oropharyngeal and postingestional controls of meal size. **Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 32-9, Jan 1999.

DAVIS, J. D.; LEVINE, M. W. A model for the control of ingestion. **Psychol Rev**, v. 84, n. 4, p. 379-412, Jul 1977.

DAVIS, J. D.; PEREZ, M. C. The acquired control of ingestive behavior in the rat by flavor-associated postingestional stimulation. **Physiol Behav**, v. 54, n. 6, p. 1221-6, Dec 1993

DAVIS, J. D.; SMITH, G. P. Learning to sham feed: behavioral adjustments to loss of physiological postingestional stimuli. **Am J Physiol**, v. 259, n. 6 Pt 2, p. R1228-35, Dec 1990.

DAVIS, J. D.; SMITH, G. P. Analysis of the microstructure of the rhythmic tongue movements of rats ingesting maltose and sucrose solutions. **Behav Neurosci**, v. 106, n. 1, p. 217-28, Feb 1992.

DAVIS, J. D.; SMITH, G. P.; MCCANN, D. P. The control of water and sodium chloride intake by postingestional and orosensory stimulation in water-deprived rats. **Physiol Behav**, v. 75, n. 1-2, p. 7-14, Feb 1-15 2002.

DAVIS, J. D.; SMITH, G. P.; SAYLER, J. L. Closing the pylorus decreases the size of large meals in the rat. **Physiol Behav**, v. 63, n. 2, p. 191-6, Jan 1998.

role of alpha 2-adrenoceptors. **Braz J Med Biol Res**, v. 30, n. 4, p. 497-502, Apr 1997.

DE CASTRO E SILVA, E.; FREGONEZE, J. B.; JOHNSON, A. K. Corticotropin-releasing hormone in the lateral parabrachial nucleus inhibits sodium appetite in rats. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 290, n. 4, p. R1136-41, Apr 2006.

DE CASTRO, M. T.; DE CASTRO, J. C.; MENANI, J. V. The effects of forebrain multiple lesions on the pressor response induced by bilateral carotid occlusion in conscious rats. **Brain Res**, v. 612, n. 1-2, p. 243-6, May 28 1993.

DE GOBBI, J. I.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, R. F.; MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Non-NMDA receptors in the lateral parabrachial nucleus modulate sodium appetite. **Brain Res**, v. 1301, p. 44-51, Dec 8 2009.

DE GOBBI, J. I.; DE LUCA, L. A., JR.; MENANI, J. V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Res**, v. 880, n. 1-2, p. 131-8, Oct 13 2000.

DE GOBBI, J. I.; MENANI, J. V.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, R. F.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Right atrial stretch alters fore- and hind-brain expression of c-fos and inhibits the rapid onset of salt appetite. **J Physiol**, v. 586, n. Pt 15, p. 3719-29, Aug 1 2008.

DE LUCA, L. A., JR.; BARBOSA, S. P.; MENANI, J. V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 1055-61, 2003.

DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA, L. A., JR.; MENANI, J. V. Moxonidine and central alpha2 adrenergic receptors in sodium intake. **Brain Res**, v. 993, n. 1-2, p. 177-82, Dec 12 2003.

DE PAULA, P. M.; SATO, M. A.; MENANI, J. V.; DE LUCA JUNIOR, L. A. Effects of central alpha-adrenergic agonists on hormone-induced 3% NaCl and water intake. **Neurosci Lett**, v. 214, n. 2-3, p. 155-8, Aug 23 1996.

EDWARDS, G. L.; JOHNSON, A. K. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **Am J Physiol**, v. 261, n. 4 Pt 2, p. R1039-44, Oct 1991.

EPSTEIN, A. N. Neurohormonal control of salt intake in the rat. **Brain Res Bull**, v. 27, n. 3-4, p. 315-20, Sep-Oct 1991.

ERNSBERGER, P.; GRAVES, M. E.; GRAFF, L. M.; ZAKIEH, N.; NGUYEN, P.; COLLINS, L. A.; WESTBROOKS, K. L.; JOHNSON, G. G. II-imidazoline receptors. Definition, characterization, distribution, and transmembrane signaling. **Ann N Y Acad Sci**, v. 763, p. 22-42, Jul 12 1995.

FERRARI, A. C.; CAMARGO, L. A.; SAAD, W. A.; RENZI, A.; DE LUCA JUNIOR, L. A.; MENANI, J. V. Clonidine and phenylephrine injected into the lateral hypothalamus inhibits water intake in rats. **Brain Res**, v. 522, n. 1, p. 125-30, Jul 2 1990.

FERRARI, A. C.; CAMARGO, L. A.; SAAD, W. A.; RENZI, A.; LUCA JUNIOR, L. A.; MENANI, J. V. Role of the alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors of the lateral hypothalamus in the dipsogenic response to central angiotensin II in rats. **Brain Res**, v. 560, n. 1-2, p. 291-6, Sep 27 1991.

FITTS, D. A.; MASSON, D. B. Forebrain sites of action for drinking and salt appetite to angiotensin or captopril. **Behav Neurosci**, v. 103, n. 4, p. 865-72, Aug 1989.

FITTS, D. A.; SIMPSON, J. B. Drinking and natriuresis during volume expansion and intracranial angiotensin or carbachol. **Am J Physiol**, v. 251, n. 2 Pt 2, p. R381-7, Aug 1986.

FITTS, D. A.; THUNHORST, R. L.; SIMPSON, J. B. Fluid intake, distribution, and excretion during lateral ventricular infusions of carbachol in rats. **Brain Res**, v. 332, n. 2, p. 237-45, Apr 22 1985a.

FITTS, D. A.; THUNHORST, R. L.; SIMPSON, J. B. Modulation of salt appetite by lateral ventricular infusions of angiotensin II and carbachol during sodium depletion. **Brain Res**, v. 346, n. 2, p. 273-80, Nov 4 1985b.

FITZSIMONS, J. T. The renin-angiotensin system and sodium appetite. **J Physiol (Paris)**, v. 79, n. 6, p. 461-5, 1984.

FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiol Rev**, v. 78, n. 3, p. 583-686, Jul 1998.

FITZSIMONS, J. T.; WIRTH, J. B. The renin-angiotensin system and sodium appetite. **J Physiol**, v. 274, p. 63-80, Jan 1978.

FLYNN, F. W.; CULVER, B.; NEWTON, S. V. Salt intake by normotensive and spontaneously hypertensive rats: two-bottle and lick rate analyses. **Physiol Behav**, v. 78, n. 4-5, p. 689-96, Apr 2003.

FLYNN, F. W.; GRILL, H. J.; SCHULKIN, J.; NORGREN, R. Central gustatory lesions: II. Effects on sodium appetite, taste aversion learning, and feeding behaviors. **Behav Neurosci**, v. 105, n. 6, p. 944-54, Dec 1991.

FLYNN, F. W.; SMITH, M. E.; BIEBER, S. L. Differential effects of intraventricular injections of tachykinin NK1 and NK3 receptor agonists on normal and sham drinking of NaCl by sodium-deficient rats. **Behav Neurosci**, v. 113, n. 4, p. 776-86, Aug 1999.

FORMENTI, S.; BASSI, M.; NAKAMURA, N. B.; SCHOORLEMMER, G. H.; MENANI, J. V.; COLOMBARI, E. Hindbrain mineralocorticoid mechanisms on sodium appetite. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 304, n. 3, p. R252-9, Feb 2013.

FRANCHINI, L. F.; VIVAS, L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. **Am J Physiol**, v. 276, n. 4 Pt 2, p. R1180-7, Apr 1999.

FRANCI, C. R. Possible dual effect of endogenous ANP on water and sodium intake and role of AII. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 21, n. 5, p. 525-9, Sep 1997.

FRANK, M. E.; CONTRERAS, R. J.; HETTINGER, T. P. Nerve fibers sensitive to ionic taste stimuli in chorda tympani of the rat. **J Neurophysiol**, v. 50, n. 4, p. 941-60, Oct 1983.

FRANKMANN, S. P.; SOLLARS, S. I.; BERNSTEIN, I. L. Sodium appetite in the sham-drinking rat after chorda tympani nerve transection. **Am J Physiol**, v. 271, n. 2 Pt 2, p. R339-45, Aug 1996.

FRATUCCI DE GOBBI, J. I.; DE LUCA, L. A., JR.; JOHNSON, A. K.; MENANI, J. V. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 280, n. 5, p. R1301-7, May 2001.

FREGLY, M. J.; KELLEHER, D. L.; GREENLEAF, J. E. Antidipsogenic effect of clonidine on angiotensin II-, hypertonic saline-, pilocarpine- and dehydration-induced water intakes. **Brain Res Bull**, v. 7, n. 6, p. 661-4, Dec 1981.

FREGLY, M. J.; ROWLAND, N. E.; GREENLEAF, J. E. Clonidine antagonism of angiotensin-related drinking: a central site of action. **Brain Res**, v. 298, n. 2, p. 321-7, Apr 30 1984a.

FREGLY, M. J.; ROWLAND, N. E.; GREENLEAF, J. E. A role for presynaptic alpha 2-adrenoceptors in angiotensin II-induced drinking in rats. **Brain Res Bull**, v. 12, n. 4, p. 393-8, Apr 1984b.

FRENCH, N. Alpha 2-adrenoceptors and I2 sites in the mammalian central nervous system. **Pharmacol Ther**, v. 68, n. 2, p. 175-208, 1995.

FULWILER, C. E.; SAPER, C. B. Subnuclear organization of the efferent connections of the parabrachial nucleus in the rat. **Brain Res**, v. 319, n. 3, p. 229-59, Aug 1984.

GALAVVERNA, O.; DE LUCA, L. A., JR.; SCHULKIN, J.; YAO, S. Z.; EPSTEIN, A. N. Deficits in NaCl ingestion after damage to the central nucleus of the amygdala in the rat. **Brain Res Bull**, v. 28, n. 1, p. 89-98, Jan 1992.

GASPARINI, S.; DE LUCA, L. A., JR.; COLOMBARI, D. S.; DE PAULA, P. M.; BARBOSA, S. P.; MENANI, J. V. Adrenergic mechanisms of the Kolliker-Fuse/A7 area on the control of water and sodium intake. **Neuroscience**, v. 164, n. 2, p. 370-9, Dec 1 2009.

GEERLING, J. C.; ENGELAND, W. C.; KAWATA, M.; LOEWY, A. D. Aldosterone target neurons in the nucleus tractus solitarius drive sodium appetite. **J Neurosci**, v. 26, n. 2, p. 411-7, Jan 11 2006.

GEERLING, J. C.; KAWATA, M.; LOEWY, A. D. Aldosterone-sensitive neurons in the rat central nervous system. **J Comp Neurol**, v. 494, n. 3, p. 515-27, Jan 20 2006.

GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Sodium depletion activates the aldosterone-sensitive neurons in the NTS independently of thirst. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 292, n. 3, p. R1338-48, Mar 2007.

HALLOCK, R. M.; TATANGELO, M.; BARROWS, J.; FINGER, T. E. Residual chemosensory capabilities in double P2X2/P2X3 purinergic receptor null mice: intraoral or postgestive detection? **Chem Senses**, v. 34, n. 9, p. 799-808, Nov 2009.

HAMILTON, R. B.; NORNGREN, R. Central projections of gustatory nerves in the rat. **J Comp Neurol**, v. 222, n. 4, p. 560-77, Feb 1 1984.

HERBERT, H.; MOGA, M. M.; SAPER, C. B. Connections of the parabrachial nucleus with the nucleus of the solitary tract and the medullary reticular formation in the rat. **J Comp Neurol**, v. 293, n. 4, p. 540-80, Mar 22 1990.

HIEBLE, J. P.; RUFFOLO, R. R., JR. Possible structural and functional relationships between imidazoline receptors and alpha 2-adrenoceptors. **Ann N Y Acad Sci**, v. 763, p. 8-21, Jul 12 1995.

HOFFMAN, W. E.; PHILIPS, M. I.; SCHMID, P. G.; FALCON, J.; WEET, J. F. Antidiuretic hormone release and the pressor response to central angiotensin II and cholinergic stimulation. **Neuropharmacology**, v. 16, n. 7-8, p. 463-72, Jul-Aug 1977.

IMAI, Y.; ABE, K.; SASAKI, S.; MINAMI, N.; MUNAKATA, M.; YUMITA, S.; NOBUNAGA, T.; SEKINO, H.; YOSHINAGA, K. Role of vasopressin in cardiovascular response to central cholinergic stimulation in rats. **Hypertension**, v. 13, n. 6 Pt 1, p. 549-57, Jun 1989.

JHAMANDAS, J. H.; HARRIS, K. H.; PETROV, T.; KRUKOFF, T. L. Characterization of the parabrachial nucleus input to the hypothalamic paraventricular nucleus in the rat. **J Neuroendocrinol**, v. 4, n. 4, p. 461-71, Aug 1992.

JHAMANDAS, J. H.; PETROV, T.; HARRIS, K. H.; VU, T.; KRUKOFF, T. L. Parabrachial nucleus projection to the amygdala in the rat: electrophysiological and anatomical observations. **Brain Res Bull**, v. 39, n. 2, p. 115-26, 1996.

JOHNSON, A. K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Med Sci Sports Exerc**, v. 39, n. 8, p. 1388-400, Aug 2007.

JOHNSON, A. K.; EDWARDS, G. L. The neuroendocrinology of thirst: afferent signaling and mechanisms of central integration. In: D. W. Pfaff, & D. Ganten (Eds.), *Current Topics in Neuroendocrinology*, Vol 10. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1990, pp. 149-190., 1990. cap. 149-190,

- JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Front Neuroendocrinol**, v. 18, n. 3, p. 292-353, Jul 1997.
- KOBASHI, M.; ICHIKAWA, H.; SUGIMOTO, T.; ADACHI, A. Response of neurons in the solitary tract nucleus, area postrema and lateral parabrachial nucleus to gastric load of hypertonic saline. **Neurosci Lett**, v. 158, n. 1, p. 47-50, Aug 6 1993.
- KRUKOFF, T. L.; HARRIS, K. H.; JHAMANDAS, J. H. Efferent projections from the parabrachial nucleus demonstrated with the anterograde tracer Phaseolus vulgaris leucoagglutinin. **Brain Res Bull**, v. 30, n. 1-2, p. 163-72, 1993.
- LANCA, A. J.; VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 1117-26, Apr 1985.
- LEVY, C. J.; MCCUTCHEON, B. Importance of postingestional factors in the satiation of sodium appetite in rats. **Physiol Behav**, v. 13, n. 5, p. 621-5, Nov 1974.
- LEWIS, S. J.; ALLEN, A. M.; VERBERNE, A. J.; FIGDOR, R.; JARROTT, B.; MENDELSON, F. A. Angiotensin II receptor binding in the rat nucleus tractus solitarius is reduced after unilateral nodose ganglionectomy or vagotomy. **Eur J Pharmacol**, v. 125, n. 2, p. 305-7, Jun 17 1986.
- MCCANN, S. M.; GUTKOWSKA, J.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Neuroendocrine control of body fluid homeostasis. **Braz J Med Biol Res**, v. 36, n. 2, p. 165-81, Feb 2003.
- MCKINLEY, M. J.; ALLEN, A. M.; CLEVERS, J.; PAXINOS, G.; MENDELSON, F. A. Angiotensin receptor binding in human hypothalamus: autoradiographic localization. **Brain Res**, v. 420, n. 2, p. 375-9, Sep 15 1987.
- MENANI, J. V.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA, L. A., JR.; DE GOBBI, J. I.; JOHNSON, A. K. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 282, n. 3, p. R837-41, Mar 2002.
- MENANI, J. V.; COLOMBARI, D. S.; BELTZ, T. G.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Salt appetite: interaction of forebrain angiotensinergic and hindbrain serotonergic mechanisms. **Brain Res**, v. 801, n. 1-2, p. 29-35, Aug 10 1998.
- MENANI, J. V.; COLOMBARI, E.; TALMAN, W. T.; JOHNSON, A. K. Commissural nucleus of the solitary tract lesions reduce food intake and body weight gain in rats. **Brain Res**, v. 740, n. 1-2, p. 102-8, Nov 18 1996.
- MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A., JR.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **Am J Physiol**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. R555-60, Feb 1998.

MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A., JR.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 279, n. 1, p. R126-31, Jul 2000.

MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **Am J Physiol**, v. 269, n. 5 Pt 2, p. R1044-9, Nov 1995.

MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **Am J Physiol**, v. 275, n. 5 Pt 2, p. R1431-7, Nov 1998.

MENANI, J. V.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A.; RENZI, A.; DE LUCA JUNIOR, L. A.; COLOMBARI, E. The anteroventral third ventricle (AV3V) region is essential for pressor, dipsogenic and natriuretic responses to central carbachol. **Neurosci Lett**, v. 113, n. 3, p. 339-44, Jun 8 1990.

MENANI, J. V.; SATO, M. A.; HAIKEL, L.; VIEIRA, A. A.; DE ANDRADE, C. A.; DA SILVA, D. C.; RENZI, A.; DE LUCA, L. A., JR. Central moxonidine on water and NaCl intake. **Brain Res Bull**, v. 49, n. 4, p. 273-9, Jul 1 1999.

MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 270, n. 1 Pt 2, p. R162-8, Jan 1996.

MENEZES, M. F.; BARBOSA, S. P.; DE ANDRADE, C. A.; MENANI, J. V.; DE PAULA, P. M. Purinergic mechanisms of lateral parabrachial nucleus facilitate sodium depletion-induced NaCl intake. **Brain Res**, v. 1372, p. 49-58, Feb 4 2011.

MOREIRA, T. S.; TAKAKURA, A. C.; COLOMBARI, E.; DE LUCA, L. A., JR.; RENZI, A.; MENANI, J. V. Central moxonidine on salivary gland blood flow and cardiovascular responses to pilocarpine. **Brain Res**, v. 987, n. 2, p. 155-63, Oct 17 2003.

NARAY-FEJES-TOTH, A.; FEJES-TOTH, G. Subcellular localization of the type 2 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase. A green fluorescent protein study. **J Biol Chem**, v. 271, n. 26, p. 15436-42, Jun 28 1996.

NORGREN, R. **The central organization of the gustatory and visceral systems in the nucleus of the solitary tract.** In **Brain mechanisms of sensation.** New York: Wiley Medical Publishers, 1981. pp. 143-160.

NORGREN, R. **Gustatory system.** In **The rat nervous system.** G, P. Australia: Academic Press 1995.

ODERMATT, A.; ARNOLD, P.; STAUFFER, A.; FREY, B. M.; FREY, F. J. The N-terminal anchor sequences of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenases determine their orientation in the endoplasmic reticulum membrane. **J Biol Chem**, v. 274, n. 40, p. 28762-70, Oct 1 1999.

ODERMATT, A.; DICK, B.; ARNOLD, P.; ZAEHNER, T.; PLUESCHKE, V.; DEREGIBUS, M. N.; REPETTO, H.; FREY, B. M.; FREY, F. J.; FERRARI, P. A mutation

in the cofactor-binding domain of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 associated with mineralocorticoid hypertension. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 3, p. 1247-52, Mar 2001.

OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. **Am J Physiol**, v. 256, n. 1 Pt 2, p. R264-9, Jan 1989.

OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Role of lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake produced by right atrial stretch. **Brain Res**, v. 695, n. 2, p. 275-8, Oct 16 1995.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The Rat Brain in Stereotax Coordinates**. . San Diego: Academic Press, Inc., 1997.

RAMSAY, D. J.; THRASHER, T. N.; BIE, P. Endocrine components of body fluid homeostasis. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol**, v. 90, n. 4, p. 777-80, 1988.

REIS, D. J.; PILETZ, J. E. The imidazoline receptor in control of blood pressure by clonidine and allied drugs. **Am J Physiol**, v. 273, n. 5 Pt 2, p. R1569-71, Nov 1997.

ROBINSON, M. M.; EVERED, M. D. Pressor action of intravenous angiotensin II reduces drinking response in rats. **Am J Physiol**, v. 252, n. 4 Pt 2, p. R754-9, Apr 1987.

RUGGIERO, D. A.; REGUNATHAN, S.; WANG, H.; MILNER, T. A.; REIS, D. J. Immunocytochemical localization of an imidazoline receptor protein in the central nervous system. **Brain Res**, v. 780, n. 2, p. 270-93, Jan 12 1998.

SAKAI, R. R.; MA, L. Y.; ZHANG, D. M.; MCEWEN, B. S.; FLUHARTY, S. J. Intracerebral administration of mineralocorticoid receptor antisense oligonucleotides attenuate adrenal steroid-induced salt appetite in rats. **Neuroendocrinology**, v. 64, n. 6, p. 425-9, Dec 1996.

SATO, M. A.; SUGAWARA, A. M.; MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A., JR. Idazoxan and the effect of intracerebroventricular oxytocin or vasopressin on sodium intake of sodium-depleted rats. **Regul Pept**, v. 69, n. 3, p. 137-42, Apr 30 1997.

SATO, M. A.; YADA, M. M.; RENZI, A.; CAMARGO, L. A.; SAAD, W. A.; MENANI, J. V.; DE LUCA JUNIOR, L. A. Antagonism of clonidine injected intracerebroventricularly in different models of salt intake. **Braz J Med Biol Res**, v. 29, n. 12, p. 1663-6, Dec 1996.

SHAPIRO, R. E.; MISELIS, R. R. The central neural connections of the area postrema of the rat. **J Comp Neurol**, v. 234, n. 3, p. 344-64, Apr 15 1985.

SPECTOR, A. C. Gustatory function in the parabrachial nuclei: implications from lesion studies in rats. **Rev Neurosci**, v. 6, n. 2, p. 143-75, Apr-Jun 1995.

STELLAR, E.; HILL, J. H. The rats rate of drinking as a function of water deprivation. **J Comp Physiol Psychol**, v. 45, n. 1, p. 96-102, Feb 1952.

STRICKER, E. M. Thirst and sodium appetite after colloid treatment in rats: role of the renin-angiotensin-aldosterone system. **Behav Neurosci**, v. 97, n. 5, p. 725-37, Oct 1983.

SUGAWARA, A. M.; MIGUEL, T. T.; DE OLIVEIRA, L. B.; MENANI, J. V.; DE LUCA JUNIOR, L. A. Noradrenaline and mixed alpha 2-adrenoceptor/imidazoline-receptor ligands: effects on sodium intake. **Brain Res**, v. 839, n. 2, p. 227-34, Aug 28 1999.

SUGAWARA, A. M.; MIGUEL, T. T.; PEREIRA, D. T.; MENANI, J. V.; DE LUCA, L. A., JR. Effects of central imidazolinerigic and alpha2-adrenergic activation on water intake. **Braz J Med Biol Res**, v. 34, n. 9, p. 1185-90, Sep 2001.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; BORELLA, T. L.; PAULIN, R. F.; COLOMBARI, D. S.; DE LUCA, L. A., JR.; COLOMBARI, E.; MENANI, J. V. Central mechanisms involved in pilocarpine-induced pressor response. **Auton Neurosci**, v. 164, n. 1-2, p. 34-42, Oct 28 2011.

TAKAKURA, A. C.; MOREIRA, T. S.; DE LUCA, L. A., JR.; RENZI, A.; MENANI, J. V.; COLOMBARI, E. Effects of AV3V lesion on pilocarpine-induced pressor response and salivary gland vasodilation. **Brain Res**, v. 1055, n. 1-2, p. 111-21, Sep 7 2005.

THUNHORST, R. L.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Glucocorticoids increase salt appetite by promoting water and sodium excretion. **Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol**, v. 293, n. 3, p. R1444-51, Sep 2007.

THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Renin-angiotensin, arterial blood pressure, and salt appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 266, n. 2 Pt 2, p. R458-65, Feb 1994.

THUNHORST, R. L.; MORRIS, M.; JOHNSON, A. K. Endocrine changes associated with a rapidly developing sodium appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 267, n. 5 Pt 2, p. R1168-73, Nov 1994.

TORDOFF, M. G.; SCHULKIN, J.; FRIEDMAN, M. I. Hepatic contribution to satiation of salt appetite in rats. **Am J Physiol**, v. 251, n. 6 Pt 2, p. R1095-102, Dec 1986.

TORDOFF, M. G.; SCHULKIN, J.; FRIEDMAN, M. I. Further evidence for hepatic control of salt intake in rats. **Am J Physiol**, v. 253, n. 3 Pt 2, p. R444-9, Sep 1987.

TRENDELENBURG, U. The pressor response of the cat to histamine and pilocarpine. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 131, p. 65-72, Jan 1961.

VERBALIS, J. G.; BLACKBURN, R. E.; HOFFMAN, G. E.; STRICKER, E. M. Establishing behavioral and physiological functions of central oxytocin: insights from studies of oxytocin and ingestive behaviors. **Adv Exp Med Biol**, v. 395, p. 209-25, 1995.

WIRTSHAFTER, D.; COVELO, I. R.; SALIJA, I.; STRATFORD, T. R. Effects of muscimol in the nucleus accumbens shell on salt appetite and sucrose intake: a microstructural study with a comment on the sensitization of salt intake. **Behav Neurosci**, v. 126, n. 5, p. 699-709, Oct 2012.

WOLF, G.; SCHULKIN, J.; SIMSON, P. E. Multiple factors in the satiation of salt appetite. **Behav Neurosci**, v. 98, n. 4, p. 661-73, Aug 1984.

YADA, M. M.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V.; DE LUCA JUNIOR, L. A. Central alpha-adrenergic agonists and need-induced 3% NaCl and water intake. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 57, n. 1-2, p. 137-43, May-Jun 1997.

YADA, M. M.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V.; RENZI, A.; CAMARGO, L. A.; SAAD, W. A.; DE LUCA, L. A., JR. Receptor-mediated effects of clonidine on need-induced 3% NaCl and water intake. **Brain Res Bull**, v. 42, n. 3, p. 205-9, 1997.

YAMAMOTO, T.; SHIMURA, T.; SAKO, N.; SAKAI, N.; TANIMIZU, T.; WAKISAKA, S. c-Fos expression in the parabrachial nucleus after ingestion of sodium chloride in the rat. **Neuroreport**, v. 4, n. 11, p. 1223-6, Sep 10 1993.

ZHANG, D. M.; EPSTEIN, A. N.; SCHULKIN, J. Medial region of the amygdala: involvement in adrenal-steroid-induced salt appetite. **Brain Res**, v. 600, n. 1, p. 20-6, Jan 8 1993.

ZHANG, H. Y.; YOUSEF, G. E.; CUNNINGHAM, L.; BLAKE, N. W.; OUYANG, X.; BAYSTON, T. A.; KANDOLF, R.; ARCHARD, L. C. Attenuation of a reactivated cardiovirulent coxsackievirus B3: The 5'-nontranslated region does not contain major attenuation determinants. **J Med Virol**, v. 41, n. 2, p. 129-37, Oct 1993.