
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
(PIPGCF UFSCar/UNESP)

RICHARD BOARATO DAVID

NATRIOREXIGÊNESE PARADOXAL: NÚCLEO PARABRAQUIAL
LATERAL E MECANISMOS CENTRAIS, SISTÊMICOS E
COMPORTAMENTAIS

ARARAQUARA

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “Júlio de Mesquita Filho”
PROGRAMA INTERINSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS
(PIPGCF UFSCar/UNESP)

RICHARD BOARATO DAVID

NATRIOREXIGÊNESE PARADOXAL: NÚCLEO PARABRAQUIAL
LATERAL E MECANISMOS CENTRAIS, SISTÊMICOS E
COMPORTAMENTAIS

Tese apresentada ao Programa Interinstitucional de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal de São Carlos/Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Doutor em Ciências, área de concentração: Fisiologia.
Orientador: Prof. Dr. Laurival A. De Luca Jr.

ARARAQUARA

2013

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

D249np

David, Richard Boarato.

Natriorexigênese paradoxal : núcleo parabraquial lateral e mecanismos centrais, sistêmicos e comportamentais / Richard Boarato David. -- São Carlos : UFSCar, 2013. 128 f.

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

1. Fisiologia humana. 2. Núcleo parabraquial lateral. 3. Desidratação celular. 4. Ocitocina. 5. Esvaziamento gástrico. 6. Hipotálamo. I. Título.

CDD: 612 (20^a)

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

Folha de Aprovação

Tese de Doutorado de Richard Boarato David

Dia 22/02/2013

Prof. Dr. Laurival Antonio De Luca Jr.....

Prof. Dr. José Marino Neto.....

Prof^a. Dr^a. Juliana Irani Fratucci De Gobbi.....

Prof. Dr. João Carlos Callera.....

Prof. Dr. Ricardo Luiz Nunes de Souza.....

Dedico este trabalho aos meus pais, Manoel e Rosa, e à minha irmã Érica, os quais estão sempre comigo, ainda que em pensamento, além da Camila, que com seu amor, paciência e companheirismo tornou-se uma pessoa fundamental em minha vida.

Agradecimentos

Agradeço especialmente ao Prof. Dr. Laurival A. De Luca Jr., por todos esses anos de orientação iniciados na iniciação científica.

UNESP-FOAR/ARARAQUARA

Prof. Dr. José Vanderlei Menani

Profa. Dra. Patrícia Maria de Paula

Profa. Dra. Débora S. A. Colombari

Adriano Palomino de Oliveira

Ana Vitor de Oliveira

Reginaldo da Conceição Queiróz

Silas Pereira Barbosa

Silvana Aparecida Deróbio Malavolta

Silvia Fógia

Pós-graduandos e estudantes do

Laboratório de Fisiologia

UNESP-FCFAR/ARARAQUARA

Profa. Dra. Regina Célia Vendramini

Profa. Dra. Cleópatra da Silva Planeta

Dr. Fábio Cardoso Cruz

Elisabete Zocal Paro Lepera

USP-FMRP/RIBEIRÃO PRETO

Prof. Dr. José Antunes Rodrigues

Maria Valci Aparecida dos Santos

Milene Mantovani Lopes

THE UNIVERSITY OF IOWA - IOWA
CITY

Prof. Dr. Alan Kim Johnson

Terry Beltz

Marilyn J. Dennis

Seth Hurley

FAPESP (2007/54523-3)

FAPESP-PRONEX

(coordenador JV Menani)

CAPES PDEE (6612/10-5)

CNPq

PIPGCF-UFSCar/UNESP

RESUMO

A ingestão de sódio é induzida por sinais facilitadores, como a angiotensina II e a aldosterona. Apesar de classicamente considerada antinatriorexigênica, a desidratação celular também se mostra facilitadora da ingestão paradoxal de sódio quando a inibição da ingestão de sódio pelo mecanismo ocitocinérgico do hipotálamo ou pelo núcleo parabraquial lateral (NPBL) está desativada. A desativação do NPBL poderia, então, atuar sobre o mecanismo ocitocinérgico ou de controle do esvaziamento gástrico, ambos inibidores, ou ainda modificar a atividade de áreas facilitadoras ou envolvidas na recompensa. O objetivo deste estudo foi investigar o efeito da injeção de metisergida (4 µg/0,2 µl, antagonista serotoninérgico) no NPBL em animais com desidratação celular sobre a: atividade de áreas encefálicas envolvidas no comportamento ingestivo, medindo-se imunorreatividade para proteína c-Fos e dosagem tecidual de dopamina, serotonina e metabólitos em áreas de interesse ou dosagem hormonal; saciedade pré-sistêmica envolvendo esvaziamento gástrico; seletividade da ingestão paradoxal de sódio. Também foi avaliado o possível efeito da desinibição da natriorexigênese sobre o sistema de recompensa através da sensibilização por desativações repetidas do NPBL pelo muscimol (2 nmol/0,2 µl; agonista GABA_A) e na privação hídrica com reidratação parcial e posterior acesso ao sódio (modelo PH-RP) sobre a autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL). Ratos (280-320 g) Holtzman ou Sprague-Dawley, intactos ou operados (canulação da veia femoral e/ou cânulas-guia direcionadas ao NPBL ou eletrodo bipolar no hipotálamo), foram utilizados nos experimentos. Animais tratados com metisergida e hiperosmóticos por gavagem de NaCl 2 M (2 ml) apresentaram, em relação ao tratamento controle (veículo): (a) aumento da ir-Fos na área postrema e núcleo do trato solitário intermediário, no órgão subfornical e em neurônios não ocitocinérgicos da porção ventral do núcleo paraventricular do hipotálamo; (b) aumento da concentração tecidual de dopamina na amígdala, mas não no accumbens; (c) atividade do sistema ocitocinérgico inalterada (ir-Fos em neurônios ocitocinérgicos e ocitocina plasmática semelhantes ao controle). Ratos tratados com metisergida e hiperosmóticos por infusão iv de NaCl 2 M (1,5 ml), que receberam uma gavagem de NaCl 0,3 M (3 ml) apresentaram conteúdo gástrico e intestinal hipertônico semelhantes ao controle (veículo) após a gavagem. Em animais hidratados com histórico de dois tratamentos prévios de muscimol no NPBL, a ingestão de NaCl hipertônico induzida por muscimol foi superior aos animais controle tratados previamente com veículo. A AEHL não foi alterada em nenhuma fase do protocolo

PH-RP, assim como em animais com desidratação celular, em relação aos controles hidratados. Os resultados demonstram que a desativação do NPBL potencializa especificamente a ingestão de solução contendo sódio e sugerem a participação do tronco encefálico e da amígdala na fase apetitiva da ingestão paradoxal de sódio, enquanto a desativação de outros mecanismos inibidores (ocitocina e retenção gástrica) parece não ser essencial. Ainda, a repetição da desativação do NPBL sensibiliza a ingestão de sódio em animais hidratados. A remoção da inibição ao apetite ao sódio pela reidratação parcial na PH-RP não altera a recompensa na AEHL.

Palavras-chave: Núcleo parabraquial lateral. Desidratação celular. Natriorexigênese. Ocitocina. Esvaziamento gástrico. Saciedade. Recompensa. Autoestimulação do hipotálamo lateral.

ABSTRACT

Sodium intake is induced by facilitatory signals, like angiotensin II and aldosterone. Cell dehydration, a classical inhibitory signal for sodium intake, may also induce paradoxical sodium intake if the sodium intake inhibition by the oxytocinergic hypothalamic mechanism or by the lateral parabrachial nucleus (LPBN) is absent. Thus, the LPBN deactivation could modify the activity of hypothalamic oxytocinergic pathways or the gastric emptying control system, another inhibitory system, as well as facilitatory areas and the reward system. The aim of this study was to investigate the effect of LPBN injections of methysergide (4 µg/0.2 µl, serotonergic antagonist) in cell dehydrated animals on: activity of brain areas involved in ingestive behavior by measuring c-Fos protein immunoreactivity and tissue levels of dopamine, serotonin and metabolites or plasma hormone levels; pre-systemic satiety involving gastric emptying; selectivity of paradoxical sodium intake. The effect of disinhibition of the natriorexigenesis on the reward system was tested by repeated deactivations of the LPBN with muscimol (2 nmol/0.2 µl; GABA_A agonist) and its effect on ingestive behavior sensitization and water deprivation with partial rehydration followed by sodium access (WD-PR protocol) on the lateral hypothalamus self-stimulation (LHSS). Holtzman or Sprague-Dawley rats (280-320 g), intact or operated (femoral vein cannulation and/or guide cannulas implanted in direction to the LPBN or bipolar electrode implanted in the hypothalamus), were used in the experiments. Animals treated with methysergide and hyperosmotic by gavage of 2 M NaCl (2 ml) compared to the control treatment (vehicle) showed: (a) increase in ir-Fos in the area postrema and intermediate nucleus of the solitary tract, subfornical organ and non-oxytocinergic neurons of the ventral portion of the paraventricular nucleus of the hypothalamus; (b) increase in tissue levels of dopamine in the amygdala, but not in the accumbens; (c) unchanged activity of oxytocinergic system (ir-Fos in oxytocinergic neurons and oxytocin plasma levels similar to control group). Hyperosmotic rats (iv infusion of 2 ml of 2 M NaCl) treated with methysergide and a gavage of 0.3 M NaCl (3 ml) showed a hypertonic gastric and intestinal content similar to the control group (vehicle) after gavage. In hydrated animals with a history of two previous treatments of muscimol into the LPBN, the hypertonic NaCl intake induced by muscimol was higher than the control animals pretreated with vehicle. The LHSS was not altered at any stage of WD-PR protocol, as well as in cell dehydrated animals in comparison with hydrated control group. The results demonstrate that the deactivation of the LPBN enhances specifically the intake of solutions

containing sodium and suggest the involvement of the brain stem and the amygdala during the appetitive phase of the paradoxical sodium intake, while the deactivation of other inhibitory mechanisms (oxytocin and gastric retention) seems not to be essential. Furthermore, the repetition of LPBN deactivation sensitizes hydrated animals for sodium intake. Removing the inhibition of sodium appetite by partial rehydration in WD-PR does not change the LHSS reward.

Keywords: Lateral parabrachial nucleus. Cell dehydration. Natriorexigenesis. Oxytocin. Gastric emptying. Satiety. Reward. Lateral hypothalamus self-stimulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fotomicrografia (20x) de uma seção coronal do encéfalo de um rato representativo do grupo de animais com implante bilateral de cânulas-guia direcionadas ao NPBL. As setas indicam os sítios de injeção no NPBL. Barra de escala = 2 mm; scp: pedúnculo cerebelar superior (brachium conjunctivum).57
- Figura 2.** Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) na porção intermediária do núcleo do trato solitário (NTS int.) e área postrema (AP) de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005), mostrando a localização do NTS int. (área hachurada), AP (área cinza), trato solitário (TS) e núcleo motor dorsal do vago (NMDV) em seção coronal do tronco encefálico (bulbo) (B). Fotomicrografias de corte coronal do bulbo ilustrando ir-Fos no NTS int. e AP em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.60
- Figura 3.** Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) no núcleo motor dorsal do vago (NMDV) de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barra preta) ou veículo (barra cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização do NMDV (área hachurada), trato solitário (TS) e área postrema (AP) em seção coronal do tronco encefálico (bulbo) (B). Fotomicrografias de corte coronal do bulbo mostrando ir-Fos no NMDV em aumento de 200x (tracejado branco) de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.61
- Figura 4.** Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) na porção caudal do NTS de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barra preta) ou veículo (barra cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização do NTS caudal (área hachurada) em seção coronal do tronco encefálico (bulbo) (B). Fotomicrografias de corte coronal do bulbo mostrando ir-Fos no NTS caudal em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.62
-
-

Figura 5. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) no SFO de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barra preta) ou veículo (barra cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) mostrando a localização do SFO (área hachurada) em seção coronal, dorsalmente ao terceiro ventrículo (3V) (B). Fotomicrografias de corte coronal ilustrando ir-Fos no SFO em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses..... 63

Figura 6. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) no OVLT de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barra preta) ou veículo (barra cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização do OVLT (área hachurada) em seção coronal, dorso-lateralmente ao terceiro ventrículo (3V) (B). Fotomicrografias de corte coronal mostrando ir-Fos no OVLT em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses..... 64

Figura 7. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) nas regiões *core* e *shell* do NAC de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização das regiões *core* e *shell* do NAC (área hachurada) em seção coronal, dorso-lateralmente ao terceiro ventrículo (3V) (B). Fotomicrografias de corte coronal de uma das três regiões analisadas e delimitadas em B por retângulos, mostrando ir-Fos no NAC em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses..... 65

Figura 8. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (F), ocitocina (O) ou ambas (FO) nas regiões parvocelular, magnocelular e ventral do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVNp, PVNm e PVNv, respectivamente) de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização das regiões do PVN descritas acima em seção coronal, lateralmente ao terceiro ventrículo (3V) (B). Fotomicrografia (800x) de exemplo contendo célula F (seta preta), FO (seta cinza) e O (seta branca) (C). Fotomicrografias de corte coronal, mostrando ir-Fos no PVN em aumento de 100x de um rato que recebeu metisergida (D) e outro veículo (E) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses..... 66

Figura 9. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (F), ocitocina (O) ou ambas (FO) no SON de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização do SON em seção coronal, dorso-lateralmente ao quiasma óptico (OP) (B). Fotomicrografias de corte coronal, em aumento de 200x, de um rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.....67

Figura 10. Concentração plasmática de ocitocina (direita) e vasopressina (esquerda) de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses. 70

Figura 11. Concentração de dopamina (DA), ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), no núcleo accumbens (A) e na amígdala (B) de animais com desidratação celular e que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.....72

Figura 12. Ingestão não cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B), no teste da ingestão hidromineral de dois bebedouros, em animais com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (círculos pretos) ou veículo (triângulos cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.75

Figura 13. Conteúdo líquido estomacal (A) e intestinal (B), e porção do intestino delgado corada (C) após gavagem de NaCl 0,3 M de ratos com desidratação celular, que receberam injeção de metisergida (círculos pretos) ou veículo (triângulos cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.....77

Figura 14. Ingestão de NaCl 0,3 M (esquerda) ou água (direita) durante testes de bebedouro único em animais com desidratação celular, que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.....79

Figura 15. Ingestão não cumulativa de NaCl 0,15 M (A) ou água (B), ingestão total de NaCl 0,15 M ou água aos 120 min. do teste de ingestão hidromineral com dois bebedouros (C) e ingestão não cumulativa e total de NaCl 0,15 M (D e E, respectivamente) em teste com

bebedouro único em animais com desidratação celular, que receberam injeção de metisergida (círculos ou barras pretas) ou veículo (triângulos ou barras cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses..... 82

Figura 16. Ingestão de NaCl 0,3 M (A) e água (B) durante três testes de ingestão com dois bebedouros. Os animais, hidratados, receberam injeção de veículo (V) ou muscimol (M) no NPBL (NPBL⁺) ou fora dele (NPBL⁻) em cada teste de ingestão hidromineral. O número de animais em cada tratamento está descrito entre parênteses. 84

Figura 17. Ingestão diária média de NaCl 0,3 M (A) e água (B) correspondente ao período precedente ao primeiro teste de ingestão hidromineral (dias 1 a 6) e aos períodos subsequentes (dias 8 a 13, 15 a 20 e 22 a 27) a cada teste. Os animais hidratados receberam injeção de veículo (V) ou muscimol (M) no NPBL (NPBL⁺) ou fora dele (NPBL⁻) em cada teste de ingestão hidromineral (ver Figura 16). O número de animais em cada tratamento está descrito entre parênteses..... 85

Figura 18. Teste da sede correspondente a um ciclo de PH-RP. Ingestão de água não cumulativa (A) e total ao final do teste da sede (B) de animais privados de água por 18 h (PH; círculos/barras pretas) ou hidratados (triângulos/barras brancas). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses. 87

Figura 19. Teste do apetite ao sódio correspondente a um ciclo de PH-RP. Ingestão não cumulativa de NaCl 0,15 M (A) e água (C) e total ao final do teste do apetite ao sódio (B e D) de animais privados de água por 18 h e parcialmente reidratados no teste da sede da Figura 11 (PH-RP; círculos/barras pretas) ou hidratados (triângulos/barras brancas). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses..... 88

Figura 20. Autoestimulação elétrica no hipotálamo lateral ao final de um período de privação hídrica por animais privados (PH) ou hidratados (Hidr): curva corrente-resposta (A), intensidade de corrente padronizada equivalente a 50% da resposta máxima por min., ICP50 (B), resposta máxima padronizada por min., RPMPmax (C). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses. 90

Figura 21. Autoestimulação elétrica no hipotálamo lateral ao final de um período de privação hídrica seguida de reidratação parcial no teste da sede por animais privados e parcialmente reidratados (PH-RP) ou hidratados (Hidr): curva corrente-resposta (A), intensidade de

corrente padronizada equivalente a 50% da resposta máxima por min., ICP50 (B), resposta máxima padronizada por min., RPMPmax (C). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses. Mesmos animais da Figura 20..... 91

Figura 22. Autoestimulação elétrica no hipotálamo lateral ao final do teste do apetite ao sódio por animais PH-RP que desenvolvem apetite ao sódio (RPS) ou hidratados (Hidr): curva corrente-resposta (A), intensidade de corrente padronizada equivalente a 50% da resposta máxima por min., ICP50 (B), resposta máxima padronizada por min., RPMPmax (C). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses. Mesmos animais das Figs. 20 e 21. 92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingestão de água e sódio no teste de ingestão hidromineral.	58
Tabela 2. Ingestão de água e sódio de ratos com desidratação celular: validação da injeção no NPBL.	68
Tabela 3. Efeito da osmolaridade da solução de NaCl infundida por gavagem (3 ml) sobre o conteúdo líquido estomacal e intestinal de ratos com desidratação celular.	73
Tabela 4. Ingestão de água e sódio no teste de ingestão hidromineral.	78
Tabela 5. Ingestão de água e sódio no teste de ingestão hidromineral.	80
Tabela 6. Ingestão (ml/30 min) de água e sódio nos testes da sede e do apetite ao sódio (protocolo PH-RP) intercalados a sessões de AEHL.....	89
Tabela 7. Intensidade de corrente padronizada equivalente a 50% da resposta máxima por min. (ICP50) e resposta por min. máxima padronizada (RPMPmax) de ratos com desidratação celular operando AEHL na condição basal ou em resposta a gavagem de água (Hidratado) ou de NaCl 2 M (Desidratado)	93

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μ A – microampère(s)

μ g – micrograma(s)

μ l – microlitro(s)

μ m – micrometro(s)

2V1M – 2 tratamentos com veículo e 1 tratamento com muscimol

3M – 3 tratamentos com muscimol

3V – terceiro ventrículo

5-HIAA – ácido 5-hidroxi-indol-acético

5-HT – serotonina

8-OH-DPAT – 8-hydroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina

AEHL – autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral

ANOVA – análise de variância

ANP – peptídeo natriurético atrial

AP – área postrema

AVP – arginina-vasopressina

BNST – núcleo leito (ou intersticial) da estria terminal

CEA – núcleo central da amígdala

cm – centímetro(s)

cpm – contagem por minuto

DA – dopamina

DOI – hidrobrometo de 2,5-dimetoxi-4-iodo-anfetamina

DOPAC – ácido 3,4-diidroxifenilacético

DRN – núcleo dorsal da rafe

F – célula imunorreativa para a proteína c-Fos

FO – célula imunorreativa para a proteína c-Fos e ocitocina

h – hora(s)

HL – hipotálamo lateral

HVA – ácido homovanílico

IC50 – intensidade de corrente correspondente a 50% da RPM máxima

ICP50 – IC50 padronizada em função da série

icv – intracerebroventricular

ip – intraperitoneal
ir-Fos – imunorreatividade para a proteína c-Fos
iv – intravenoso
kg – quilograma(s)
M – molar
mg – miligrama(s)
min. – minuto(s)
ml – mililitro(s)
mm – milímetro(s)
MnPO – núcleo pré-óptico mediano
ms – milissegundo(s)
NAC – núcleo accumbens (ou acumbente)
NMDV – núcleo motor dorsal do vago
nmol – nanomol(es)
NPBL – núcleo parabraquial lateral
NPBL⁻ – histologia negativa para núcleo parabraquial lateral
NPBL⁺ – histologia positiva para núcleo parabraquial lateral
NTS – núcleo do trato solitário
NTS int. – porção intermediária do núcleo do trato solitário
O – célula imunorreativa para ocitocina
OP – quiasma óptico
OT – ocitocina
OVLT – órgão vascularizado da lâmina terminal
p.c. – peso corporal
PBS – tampão fosfato salino
PFA – paraformaldeído
pg – picograma(s)
PH – privação hídrica
PH-RP – privação hídrica seguida de reidratação parcial
PH-RPS – privação hídrica seguida de reidratação parcial e acesso ao sódio
PVN – núcleo paraventricular do hipotálamo
PVNm – região magnocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo
PVNp – região parvocelular do núcleo paraventricular do hipotálamo

PVNV – região ventral do núcleo paraventricular do hipotálamo

RP – reidratação parcial

RPM – resposta por minuto

RPMmax – resposta por minuto máxima

RPMPmax – resposta por minuto máxima padronizada pela série

scp – pedúnculo cerebelar superior

seg. – segundo(s)

SFO – órgão subfornical (ou subfornicial)

SON – núcleo supraóptico

TS – trato solitário

VTA – área tegmental ventral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	22
1.1 Considerações gerais sobre desidratação.....	22
1.2 Desidratação e comportamento	23
1.3 Facilitação dos comportamentos ingestivos associados à desidratação	25
1.4 Inibição dos comportamentos ingestivos associados à desidratação.....	25
1.4.1 O NPBL como inibidor da ingestão de sódio.....	26
1.4.1.1 Mecanismo inibidor serotoninérgico no NPBL.....	27
1.4.1.2 Ingestão paradoxal de sódio induzida pela injeção de metisergida no NPBL..	28
1.4.1.3 Serotonina no NPBL e preferência ao NaCl hipertônico	29
1.4.2 Mecanismos inibidores não serotoninérgicos no NPBL	30
1.4.3 Mecanismo inibidor ocitocinérgico.....	30
1.4.4 Inibição pré-sistêmica da ingestão de sódio.....	31
1.5 Integração dos mecanismos facilitadores e inibidores da ingestão de água e sódio ...	32
1.6 Possível interação entre mecanismo inibidor do NPBL e o sistema de recompensa ..	33
1.7 Influência dos mecanismos facilitadores e inibidores ativados pela desidratação sobre a autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral.....	34
2 OBJETIVO	36
3 MATERIAL E MÉTODO	37
3.1 Animais	37
3.2 Anestesia	37
3.3 Cirurgia estereotáxica.....	38
3.4 Canulação da veia femoral	38
3.5 Cuidados pós-cirúrgicos	39
3.6 Injeções de drogas no NPBL	39
3.7 Teste de ingestão hidromineral.....	40
3.8 Desidratação celular induzida por gavagem de NaCl hipertônico	40

3.9 Desidratação celular induzida por infusão intravenosa de NaCl hipertônico.....	40
3.10 Desidratação dupla induzida por Privação Hídrica seguida de Reidratação Parcial (PH-RP).....	40
3.11 Perfusão e remoção dos encéfalos.....	41
3.12 Protocolos de imuno-histoquímica.....	42
3.13 Quantificação das concentrações plasmáticas de hormônios.....	43
3.14 Quantificação de neurotransmissores em áreas encefálicas.....	44
3.15 Determinação da taxa de esvaziamento gástrico.....	45
3.16 Autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL).....	45
3.16.1 Treinamento e aprendizado da AEHL.....	46
3.16.2 Escolha do “pacote” de AEHL.....	47
3.16.3 Confirmação do aprendizado da AEHL.....	48
3.17 Análise histológica.....	49
3.18 Experimentos.....	49
3.18.1 Experimento 1a. Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre sinalizadores centrais e periféricos durante a fase pré-ingestiva da ingestão de sódio: expressão do gene c-Fos no encéfalo, neurotransmissores em áreas límbicas e concentrações plasmáticas de hormônios neuro-hipofisários.....	50
3.18.2 Experimento 1b. Esvaziamento gástrico em ratos com desidratação celular após injeção de metisergida no NPBL.....	51
3.18.3 Experimento 1c. Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre ingestão de NaCl em teste de bebedouro único.....	52
3.18.4 Experimento 1d. Efeito da administração repetida de muscimol no NPBL sobre a sensibilização da ingestão de NaCl hipertônico.....	53
3.18.5 Experimento 2. Ingestão hidromineral induzida por PH-RP e intercalada à autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL).....	54
3.19 Análise estatística.....	56
4 RESULTADOS.....	57

4.1 Análise histológica do sítio de injeção no NPBL.....	57
4.2 Experimento 1a. Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre sinalizadores centrais e periféricos durante a fase pré-ingestiva da ingestão de sódio: expressão do gene c-Fos no encéfalo, neurotransmissores em áreas límbicas, concentrações plasmáticas de hormônios neuro-hipofisários.....	58
4.2.1 Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre imunorreatividade para a proteína c-Fos.....	58
4.2.2 Concentração de hormônios neurohipofisários no plasma e de neurotransmissores em áreas límbicas, após injeção de metisergida no NPBL, em ratos com desidratação celular.....	68
4.3 Experimento 1b. Esvaziamento gástrico em ratos com desidratação celular após injeção de metisergida no NPBL.....	73
4.3.1 Esvaziamento gástrico de sobrecarga de NaCl isotônico ou hipertônico em ratos com desidratação celular.....	73
4.3.2 Desidratação celular induzida por infusão intravenosa de NaCl 2 M: efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M.....	73
4.3.3 Esvazimento gástrico após injeção de metisergida no NPBL de ratos com desidratação celular.....	76
4.4 Experimento 1c. Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre ingestão de NaCl em teste de bebedouro único.....	78
4.4.1 Efeito da metisergida no NPBL sobre ingestão de água e NaCl 0,3 M em teste de bebedouro único.....	78
4.4.1.1 Desidratação celular induzida por gavagem de NaCl 2 M: efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em teste de dois bebedouros (triagem).....	78
4.4.1.2 Ingestão de água e de NaCl 0,3 M em testes de bebedouro único após a injeção de metisergida no NPBL durante desidratação celular.....	78
4.4.2 Efeito da metisergida no NPBL sobre ingestão de água e de NaCl 0,15 M em testes de dupla escolha ou bebedouro único.....	80

4.4.2.1 Desidratação celular induzida por gavagem de NaCl 2 M: efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em teste de dois bebedouros (triagem).....	80
4.4.2.2 Ingestão de água e de NaCl 0,15 M em testes de dois bebedouros após a injeção de metisergida no NPBL durante desidratação celular	80
4.4.2.3 Ingestão NaCl 0,15 M em testes de bebedouro único após a injeção de metisergida no NPBL durante desidratação celular	81
4.5 Experimento 1d. Efeito da administração repetida de muscimol no NPBL sobre a sensibilização da ingestão de NaCl hipertônico	83
4.6 Experimento 2. Ingestão hidromineral induzida por PH-RP e intercalada à autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL)	86
4.6.1 Testes piloto da sede e do apetite ao sódio em resposta a um ciclo de privação hídrica (PH) e reidratação parcial (RP), PH-RP.....	86
4.6.2 Ingestão de água e NaCl 0,15 M nos testes de sede e apetite ao sódio intercalados com AEHL	89
4.6.3 Autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL) intercalada pelos testes de sede e apetite ao sódio do protocolo PH-RP.	89
4.6.4 Autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral após desidratação celular.....	93
5 DISCUSSÃO	94
5.1 Inibição serotoninérgica do NPBL nas fases apetitiva e consumatória da ingestão de sódio paradoxal.....	94
5.2 Seletividade do NPBL à ingestão de NaCl.....	99
5.3 Injeções repetidas de muscimol no NPBL e sensibilização da ingestão de NaCl hipertônico.....	102
5.4 Testes da sede e do apetite ao sódio intercalados com AEHL	103
6 CONCLUSÃO.....	104
7 REFERÊNCIAS	106

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais sobre desidratação

A água é um nutriente envolvido no funcionamento adequado dos órgãos e tecidos, indispensável para a vida animal. A restrição hídrica decorrente da escassez de água em regiões áridas, da palatabilidade reduzida em crianças e idosos, assim como do consumo regular de substâncias diuréticas (por exemplo, álcool e cafeína), pode levar ao quadro de desidratação crônica moderada¹⁻³. A desidratação mantida por longos períodos pode causar desde prejuízo da capacidade termorregulatória, do desempenho em atividades físicas, até choque hipovolêmico e morte^{3,4}.

O conteúdo hídrico de um homem adulto corresponde a aproximadamente 3/5 do peso corporal, distribuído nos compartimentos extracelular, composto pelo plasma e interstício (30%), compartimento intracelular (65%) e compartimento transcelular (5%)⁴. A manutenção do volume dos compartimentos, por sua vez, depende da composição do meio interno ou “*milieu interieur*”, denominação dada no final do século XIX por Claude Bernard à matriz líquida que banha as células, ou seja, o líquido extracelular⁵. Vários de mecanismos autonômicos, neuroendócrinos e comportamentais são responsáveis pela manutenção da constância do meio interno, chamada de homeostase por Walter Cannon⁵. Variações em parâmetros hemodinâmicos e na osmolaridade do líquido extracelular resultam na ativação de mecanismos homeostáticos, talvez herdados de ancestrais de vida marinha onde a osmolaridade do ambiente é três vezes maior em relação à plasmática. Tais mecanismos contribuíram para a conquista do habitat terrestre pela vida animal⁶.

Por ser o íon sódio o principal soluto osmoticamente ativo presente no líquido extracelular, a manutenção da concentração plasmática de sódio dentro de níveis considerados normais (132 a 148 mOsm/L H₂O)⁴ é fundamental para a manutenção do volume dos compartimentos. A hipernatremia retira água do citoplasma por osmose, levando à desidratação celular. A perda de água e sódio do líquido extracelular resulta em redução de volume circulante (hipovolemia), caracterizando a desidratação extracelular. A privação hídrica por longos períodos pode levar à desidratação de ambos os compartimentos simultaneamente, resultando em desidratação dupla, também chamada de absoluta.

1.2 Desidratação e comportamento

Situações de desequilíbrio do meio interno promovem o surgimento de “impulsos interiores”, chamados de “estados motivacionais” ou simplesmente “motivação”, dirigindo o animal à execução de comportamentos motivados, paralelamente a ajustes autonômicos e endócrinos, responsáveis pela restauração da homeostase⁷. Tais comportamentos possuem uma fase apetitiva inicial, durante a qual ocorre a busca do estímulo desejado, além de uma fase consumatória iniciada na presença do estímulo em questão^{8,9}. Em situações de deficiência de água ou de sódio surgem motivações para a ingestão destas substâncias, a sede e o apetite ao sódio, respectivamente.

Sede é a denominação dada à motivação decorrente da deficiência hídrica, à qual está associado o desejo de ingerir água, levando o animal a buscar, obter e ingerir água^{10,11}. A deficiência hídrica pode ocorrer em resposta à desidratação celular, extracelular ou dupla, situações nas quais a sede é observada. Há relatos de estudos sistemáticos sobre a sede desde meados do século XIX, sendo que atualmente há um grande interesse na determinação anatômica, morfológica e funcional do receptor para hiperosmolaridade, o “osmorreceptor”, bem como nos mecanismos de controle da sede^{12,13}.

O apetite ao sódio é a motivação para a procura, aquisição e consumo de sódio em ratos deficientes deste íon, sendo operacionalmente definido como o aumento da ingestão de NaCl hipertônico, normalmente rejeitado, não preferido, pelo animal hidratado¹⁴. Este comportamento foi inicialmente descrito por Curt Richter, baseado em suas observações sobre a natriorexigênese em ratos adrenalectomizados e a um caso clínico de avidez por sal de cozinha apresentada por uma criança com deficiência na produção de aldosterona, hormônio importante para a preservação do sódio corporal¹⁵⁻¹⁷. Evidências experimentais permitem afirmar que o apetite ao sódio ocorre em diferentes espécies de mamíferos (como ratos, coelhos e ovelhas), sendo inato e específico ao sódio¹⁸⁻²¹. Ao contrário da sede, o apetite ao sódio surge apenas após várias horas do início da hipovolemia, na sua fase tardia ou “madura”²².

Apesar dos conceitos de sede e apetite ao sódio serem amplamente aceitos e utilizados há décadas, o estudo do comportamento ingestivo às vezes demonstra fenômenos que não se enquadram perfeitamente em definições pré-existentes. Por exemplo, em teste de preferência mineral, animais com desidratação celular nitidamente ingerem água e evitam o NaCl hipertônico, indicando a expressão da sede^{23,24}, enquanto estudos realizados em nosso

laboratório demonstraram que soluções minerais em concentração palatável contendo sódio ou potássio, normalmente isotônicas ou hipotônicas, são ingeridas além da água²⁵⁻²⁷. Também verificamos que a ingestão de água associada à aversão ao NaCl hipertônico induzida após protocolo de injeção intracerebroventricular (icv) de angiotensina II, tratamento classicamente reconhecido como dipsogênico, também induz preferência ao sódio na forma de NaHCO₃ isotônico frente a outras soluções minerais igualmente palatáveis, incluindo o NaCl isotônico^{21,28}. Ainda, esta preferência ao bicarbonato de sódio não é modificada pelo sinergismo entre angiotensina II e mineralocorticoide, uma interação entre hormônios proposta como causa da expressão do apetite ao sódio^{18,21,28}.

Além de modificar a palatabilidade de soluções sódicas, a fase apetitiva e a consumatória da ingestão mineral ativam sistemas de recompensa, à semelhança de outros comportamentos motivados. Recompensa pode ser subjetivamente definida como qualquer estímulo que induza “bem estar”, ou operacionalmente definida como um estímulo que aumente a probabilidade de repetição do comportamento precedente ao surgimento de tal estímulo²⁹. Ratos depletados de sódio pressionam alavanca para obter solução de NaCl, ou seja, executam comportamento operante para a obtenção de sal³⁰. A deficiência de sódio reduz o valor hedônico da estimulação hipotalâmica³¹, assim como o padrão de atividade de neurônios do núcleo accumbens (NAC) é modificado durante a ingestão de sódio³². É importante frisar que ativação da via dopaminérgica mesolímbica presente no feixe prosencefálico medial, que conecta o mesencéfalo ao corpo estriado onde NAC está contido, participa da recompensa de estímulos de alto valor hedônico, como a própria estimulação hipotalâmica, assim como o sabor doce da sacarose^{29,33}.

A sensibilização da ingestão de sódio é outro fenômeno que relaciona o mecanismo de controle do apetite ao sódio aos mecanismos de recompensa. Estudos da década de 60 demonstraram que o apetite ao sódio é mais intenso, ou seja, está sensibilizado no segundo episódio de hipovolemia induzida por diálise peritoneal em comparação à primeira desidratação³⁴. A sensibilização da ingestão de sódio envolvendo episódios repetidos de desidratação hipovolêmica tem sido demonstrada por diversos grupos de pesquisa em diferentes linhagens de animais³⁵⁻⁴¹. Animais sensibilizados para a ingestão de sódio apresentam alterações morfológicas em neurônios do NAC, assim como sensibilização cruzada para drogas de abuso, demonstrada pelo aumento da preferência condicionada ao local de administração de anfetamina, indicativo do aumento do valor hedônico desta

substância^{42,43}. Ainda, tanto ratos com histórico de administração de anfetamina como a prole de ratas tratadas cronicamente com nicotina apresentam apetite ao sódio sensibilizado^{43,44}.

1.3 Facilitação dos comportamentos ingestivos associados à desidratação

A ingestão de água decorrente da sede é iniciada tanto pelo aumento de 1 a 2% na osmolaridade plasmática, que ativa estruturas sensoriais chamadas de “osmorreceptores” e promove o aumento dos níveis plasmáticos de vasopressina (AVP) e ocitocina (OT), como pela ação central da angiotensina II durante a fase inicial da desidratação extracelular^{12,13,45}. Os osmorreceptores estão localizados tanto periféricamente na parede da cavidade orofaríngea e do trato gastrintestinal, nos vasos sanguíneos que irrigam o intestino, na veia porta hepática, como centralmente, no órgão vasculoso da lâmina terminal (OVLT) e no órgão subfornical (SFO), ambos localizados na lâmina terminal^{13,46}. Estudos mais recentes sugerem a existência de osmorreceptores centrais, ativados por um processo mecânico de redução de volume celular pelo aumento da osmolaridade do líquido extracelular, promovendo a abertura de canais catiônicos na membrana e ativação celular¹³.

A ingestão de água também pode ser induzida pela ativação central de receptores angiotensinérgicos AT₁, sendo o efeito dipsogênico da angiotensina mais pronunciado quando injetado diretamente no SFO e no OVLT⁴⁷. Além da sede, a angiotensina II e os mineralocorticoides, hormônios envolvidos nas respostas fisiológicas frente à hipovolemia, sinergicamente produzem apetite ao sódio em ratos hidratados^{18,21,47}. A associação entre a angiotensina II e a redução da ativação de receptores cardiopulmonares de baixa pressão também é considerada indutora de apetite ao sódio¹⁴.

1.4 Inibição dos comportamentos ingestivos associados à desidratação

O equilíbrio entre mecanismos facilitadores e inibidores determinam o início e o término (saciedade) do comportamento ingestivo alimentar e hidromineral⁴⁸. Enquanto a sede e o apetite ao sódio parecem compartilhar mecanismos facilitadores angiotensinérgicos, a hiperosmolaridade plasmática atua de forma oposta nos dois comportamentos, facilitando a sede e inibindo o apetite ao sódio. Animais hiperosmóticos ingerem água ao mesmo tempo em que a ingestão de sódio hipertônico está inibida^{20,49,50}, sendo que esta inibição parece depender de mecanismos antinatriorexigênicos do núcleo parabraquial lateral (NPBL)⁵¹⁻⁵³ e

ocitocinérgicos hipotalâmicos^{54,55}. Ainda, a hiperosmolaridade e a distensão da parede do trato gastrointestinal são sinais que ativam mecanismos de inibição rápida da ingestão hidromineral durante a desidratação, reduzindo o esvaziamento gástrico⁵⁶. Não se sabe se estes mecanismos inibidores são interdependentes durante a desidratação celular. Os três mecanismos inibidores citados (NPBL, ocitocina e esvaziamento gástrico) são objetos de estudo desta tese e estão detalhados abaixo, porém não são os únicos a modular a ingestão hidromineral. O peptídeo natriurético atrial (ANP), produzido e liberado pelos átrios cardíacos inibe a ingestão de sódio durante a hiperosmolemia e a hipervolemia, provavelmente por uma ação inibidora direta sobre o SFO⁴⁵. É possível que a hipervolemia também ative o mecanismo de inibição rápida da ingestão hidromineral, pois retarda o esvaziamento gástrico⁵⁷.

Apesar dos mecanismos facilitadores e inibidores atuarem antagonicamente sobre a ingestão hidromineral, os sinais que os ativam podem não ser necessariamente específicos para apenas um mecanismo. Por exemplo, a angiotensina II é facilitadora da sede e do apetite ao sódio, mas também ativadora do mecanismo ocitocinérgico hipotalâmico antinatriorexigênico^{48,58}. Esta dupla ativação de mecanismos antagônicos pode estar relacionada com o fato da angiotensina produzir sede imediata e intensa e, quando a atividade do PVN é suprimida por diluição do líquido extracelular decorrente da ingestão de água, a ingestão de sódio é desinibida, promovendo o consumo de água e sódio em uma mistura praticamente isotônica⁴⁸. A latência de algumas horas entre a expressão inicial da sede e posterior do apetite ao sódio, comumente observada em ratos hipovolêmicos, poderia também ser explicada por esta sequência diluição extracelular e ingestão isotônica, supostamente protetora para o animal, pois evitaria uma desidratação celular que poderia se somar à extracelular já induzida pela hipovolemia⁴⁸. A rápida e intensa ingestão de sódio hipertônico observada após a desativação do NPBL em animais tratados com angiotensina II icv⁵⁹ está de acordo com a teoria de Stricker sobre a dualidade facilitadora e inibidora da angiotensina II, influenciando os estudos do papel inibidor do NPBL sobre a ingestão de sódio, conforme discutido abaixo.

1.4.1 O NPBL como inibidor da ingestão de sódio

O NPBL é uma estrutura localizada bilateralmente na ponte, posicionado dorsalmente ao pedúnculo cerebelar superior, constituindo um importante centro inibidor da

ingestão hidromineral⁵⁹⁻⁶². Estudos pioneiros revelaram que a lesão eletrolítica ou citotóxica deste núcleo potencializa o consumo de água induzido por angiotensina II, sugerindo uma ação inibidora do NPBL sobre a sede^{60,63,64}. Também foi demonstrado que a infusão intragástrica de NaCl hipertônico, protocolo que induz desidratação celular, promove o aumento de células imunorreativas para proteína c-Fos, ou seja, promove ativação celular no NPBL⁶⁵.

1.4.1.1 Mecanismo inibidor serotoninérgico no NPBL

A presença de terminais serotoninérgicos provenientes do núcleo dorsal da rafe (DRN) e da área postrema (AP), os quais se projetam para a ponte⁶⁶⁻⁶⁸, pode constituir o substrato neuroanatômico do controle serotoninérgico no NPBL sobre a ingestão hidromineral. A ablação da AP ou a lesão do DRN potencializam a ingestão de NaCl hipertônico, sugerindo papel inibidor destas áreas sobre o apetite ao sódio^{69,70}. Posteriormente, um estudo funcional de microdiálise demonstrou que os níveis de serotonina e seu metabólito estão aumentados no NPBL de animais hipovolêmicos, após a ingestão de água e NaCl 0,3 M, e diminuídos quando tais líquidos não são oferecidos⁷¹. Estudos imuno-histoquímicos, cuja a expressão de da proteína Fos é utilizada como parâmetro de atividade celular, mostram que ingestão de NaCl hipertônico por ratos hipovolêmicos ativa células do NPBL, mas o mesmo não ocorre quando esses animais ingerem NaCl isotônico, em contraste com o DRN, onde ativação celular é observada após a ingestão de ambas as soluções, o que sugere um papel seletivo do NPBL sobre a ingestão de solução hipertônica de sódio^{72,73}.

Paralelamente a estas evidências do papel da serotonina e do NPBL no controle hidroeletrolítico, soma-se a contribuição de estudos comportamentais na avaliação do antagonismo e do agonismo de receptores serotoninérgicos no NPBL sobre a ingestão hidromineral. Estudos pioneiros mostraram que injeções de metisergida no NPBL, considerada um antagonista inespecífico de receptores serotoninérgicos^{74,75}, mas também agonista de receptores 5-HT_{1A}⁷⁶, aumenta a sede induzida por angiotensina II injetada centralmente, quando somente água está disponível⁶². Metesergida também induz ingestão de sódio simultânea à de água em testes com dois bebedouros, um contendo água e outro NaCl 0,3 M^{59,77}. Note que esta natriorexigêncese rápida está de acordo à ideia de a angiotensina II ativar sinais facilitadores e inibidores da ingestão de sódio. A metisergida no NPBL também potencializa a ingestão de NaCl hipertônico dependente de angiotensina II em animais

hipovolêmicos⁷⁸⁻⁸⁰. Da mesma forma, o 8-hydroxi-2-(di-n-propilamino) tetralina (8-OH-DPAT), um agonista de receptores 5-HT_{1A} (que podem estar presentes tanto pré como pós-sinápticamente no NPBL e que promovem hiperpolarização da membrana celular quando ativados), também potencializa a ingestão de sódio em ratos hipovolêmicos quando injetado no NPBL⁸¹. A injeção de serotonina no NPBL reduz a ingestão de sódio em animais submetidos à privação hídrica, sugerindo que a ativação serotoninérgica no NPBL é predominantemente antinatriorexigênci⁸¹. Injeções no NPBL de hidrobrometo de 2,5-dimetoxi-4-iodo-anfetamina (DOI), um agonista de receptores 5-HT_{2A/2C}, reduz a ingestão de sódio induzida pela hipovolemia sugerindo a participação destes receptores no mecanismo serotoninérgico antinatriorexigênico presente no NPBL^{59,82}. O apetite ao sódio induzido por tratamento crônico com desoxicorticosterona (mineralocorticoide de ação análoga à aldosterona) também é potencializado pela metisergida no NPBL⁸³. Assim como ocorre após a injeção central de angiotensina II, tanto a fase dipsogênica inicial da hipovolemia como a ativação central de vias colinérgicas, dipsogênicas e classicamente antinatriorexigênicas, podem induzir ingestão de NaCl hipertônico após o tratamento com metisergida no NPBL^{84,85}. A inibição da ingestão hidromineral pela serotonina no NPBL contrasta com o efeito dipsogênico deste neurotransmissor, seja injetado periféricamente em ratos ou injetado intracerebroventricularmente em pombos^{47,86}.

1.4.1.2 Ingestão paradoxal de sódio induzida pela injeção de metisergida no NPBL

A inibição promovida pela serotonina sobre o apetite ao sódio, supostamente um mecanismo protetor do parabraquial contra o consumo excessivo de água e sódio¹⁴, é evidenciada pela ingestão paradoxal de sódio por ratos hiperosmóticos após injeção de metisergida no NPBL⁵¹. Conforme descrito no item anterior, a desativação do NPBL potencializa a ingestão de sódio em protocolos classicamente dipsogênicos e às vezes antinatriorexigênicos, como é o caso da ingestão paradoxal de NaCl. Soma-se ainda o fato da serotonina no NPBL facilitar a natriurese em animais com expansão hipertônica de volume, o que poderia atenuar a desidratação celular⁸⁷. Ao contrário do ponto de vista clássico, a hiperosmolaridade plasmática apresenta-se como um sinal inibidor e paralelamente facilitador, ativando tanto mecanismos natriorexigênicos como mecanismos antinatriorexigênicos; o balanço entre facilitação e inibição determina a quantidade de sódio ingerida⁵¹. Note a semelhança da hiperosmolaridade plasmática à angiotensina II central no

que tange a ativação dual de mecanismos antagônicos descrita acima. Apesar da ingestão paradoxal de sódio guardar semelhanças com o apetite ao sódio clássico durante hipovolemia, inclusive em relação à ingestão de NaCl hipertônico, a ingestão de sódio por animais hipovolêmicos ou mesmo hidratados não será considerada como a expressão do apetite ao sódio nesta tese por não estar relacionado a deficiência de sódio, além de não sabermos ainda se esta motivação produz ingestão específica para o íon sódio, critérios levados em consideração na definição clássica.

1.4.1.3 Serotonina no NPBL e preferência ao NaCl hipertônico

Pode-se afirmar que desativação do mecanismos antinatriorexigênicos do NPBL claramente potencializa a ingestão de NaCl hipertônico, seja após desidratação celular, extracelular ou dupla, porém o efeito desta desativação sobre a ingestão de água não é consistente. Por exemplo, em testes de ingestão realizados com o oferecimento de apenas um bebedouro contendo água, a sede induzida por angiotensina II central foi potencializada por metisergida e inibida pela serotonina ou DOI no NPBL^{62,77}. Já em testes de preferência com dois bebedouros, um contendo água e o outro NaCl hipertônico, metisergida em animais hipovolêmicos ora potencializa a ingestão de água e de NaCl hipertônico, ora potencializa somente a ingestão de sódio⁷⁸⁻⁸⁰; na desidratação celular, metisergida potencializou somente ingestão de NaCl hipertônico em testes de dois bebedouros⁵¹.

A relação entre concentração da solução de NaCl e preferência por ratos segue o padrão “U invertido”, com o pico de preferência coincidindo com a isotonicidade^{88,89}. Em ratos hipovolêmicos, o bloqueio serotoninérgico no NPBL não altera a ingestão de NaCl isotônico e de água em teste de dupla escolha, assim como a ir-Fos deste núcleo após a ingestão de NaCl isotônico é menor em comparação à ingestão de NaCl hipertônico^{79,90}, reforçando a sugestão de que o NPBL exerce seu efeito inibidor preponderantemente no lado hipertônico da curva de preferência ao NaCl, protegendo o animal contra a ingestão excessiva de sódio. Como parte desta tese, foram realizados experimentos para verificar se a inibição seletiva ao NaCl hipertônico também é observada em animais com desidratação celular, situação na qual a ingestão excessiva de sódio agravaria ainda mais o desequilíbrio hidroeletrólítico. Para tanto, foram realizados testes de preferência com dois bebedouros (água e NaCl isotônico). Também foram realizados testes de ingestão com bebedouro único,

evitando uma possível interferência do número de bebedouros e das opções sobre a ingestão^{91,92}.

1.4.2 Mecanismos inibidores não serotoninérgicos no NPBL

Estudos mais recentes têm demonstrado o papel de outros neurotransmissores na modulação do mecanismo antinatriorexigênico do NPBL. Por exemplo, ingestão paradoxal de sódio também foi observada em ratos com desidratação celular após o agonismo de receptores noradrenérgico α_2 /imidazólico promovido pela moxonidina e o agonismo de receptores GABA_A pelo muscimol, ambos injetados no NPBL^{52,53,93}. Em animais hipovolêmicos, a ativação adrenérgica, purinérgica e GABAérgica, assim como a desativação colecistocininérgica potencializam o apetite ao sódio em animais hipovolêmicos⁹⁴⁻⁹⁸. O agonista opioidérgico β -endorfina, o agonista de receptores GABA_B baclofeno e o muscimol injetados no NPBL promovem ingestão de água e sódio em animais hidratados^{97,99,100}, sendo sugerido que este efeito do muscimol depende da ativação de receptores angiotensinérgicos centrais, talvez pelo tônus angiotensinérgico basal¹⁰¹. É importante frisar que a metisergida no NPBL desinibe a ingestão de sódio somente na presença de um sinal relacionado à desidratação, diferentemente da ativação GABAérgica ou opioidérgica, que promove natriorexigênese também em ratos hidratados.

1.4.3 Mecanismo inibidor ocitocinérgico

Circuitos neurais inibidores da ingestão de sódio envolvem o NPBL, DRN e o núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN), sendo possível que estas áreas atuem conjuntamente na desidratação, seja intra ou extracelular. É interessante notar que um sinal inibidor da ingestão de sódio, como o NaCl hipertônico, atuando por estimulação oral ou via pós-ingestiva, ativa esses três núcleos conforme mostrado pela expressão do gene c-Fos^{72,73}. O PVN e o núcleo supraóptico (SON) sintetizam ocitocina, um hormônio/neurotransmissor que centralmente inibe a ingestão de sódio⁵⁰ e cuja concentração plasmática parece ser índice da atividade ocitocinérgica central⁴⁸. Além disso, o PVN pode receber informações indiretas do NPBL através de um relé feito no núcleo central da amígdala (CEA) e daí via amígdala estendida¹⁰²⁻¹⁰⁵.

O antagonismo ocitocinérgico central produz efeitos semelhantes ao antagonismo serotoninérgico do NPBL, potencializando a ingestão de sódio em animais com desidratação extracelular e induzindo ingestão paradoxal de NaCl hipertônico em situações de hipertonidade^{51,54,55}. Recentemente foi demonstrada a redução da concentração plasmática dos hormônios hipotalâmicos ocitocina e vasopressina, em ratos com desidratação celular, após tratamento com moxonidina no NPBL⁹³. A possibilidade de existência de uma interação entre PVN e o mecanismo inibidor serotoninérgico do NPBL foi objeto de investigação desta tese.

1.4.4 Inibição pré-sistêmica da ingestão de sódio

Fatores pós-ingestivos e pré-absortivos (também chamados de pré-sistêmicos⁵⁶) estão relacionados ao mecanismo inibidor que determina o término da ingestão alimentar¹⁰⁶. Estes fatores dependem da composição dos líquidos ingeridos e exercem influência sobre a taxa de esvaziamento gástrico: os conteúdos protéicos e lipídicos, a viscosidade e a osmolaridade, por exemplo, promovem redução da velocidade de esvaziamento gástrico.

Assim como na ingestão alimentar, os fatores pré-sistêmicos modulam a ingestão hidromineral. Estudos têm sugerido a participação de osmorreceptores e mecanorreceptores gastrintestinais na antinatriorexigênese^{50,56,107,108}. A inibição pré-sistêmica, caracterizada pela redução da taxa de esvaziamento gástrico, ocorre nos primeiros quinze min. da ingestão de NaCl hipertônico, fenômeno considerado uma inibição rápida em relação à inibição tardia iniciada após quantidade significativa de água e sódio ter sido absorvida e o processo de correção da hipovolemia iniciado^{56,107,108}. Grande parte do volume de NaCl hipertônico consumido durante a ingestão paradoxal de sódio, após injeção de metisergida no NPBL, coincide com a fase da inibição pré-sistêmica⁵¹.

Apesar de o trato gastrointestinal possuir controle autônomo local, este coexiste com a influência central sobre as respostas motoras e comportamentais aos estímulos digestivos¹⁰⁹. O NPBL poderia participar dessas influências, pois recebe projeções do trato digestivo via núcleo do trato solitário (NTS), as quais poderiam também ser moduladas por projeções gustativas¹¹⁰, o que tornaria o NPBL um relé integrador de diferentes informações sensoriais relacionadas ao apetite ao sódio. O complexo motor dorsal vagal, que inclui o NTS, a AP e o núcleo motor dorsal do vago (NMDV), responsável pelo processamento das

aferências e eferências do trato gastrointestinal¹¹¹, poderia participar de um circuito envolvendo o NPBL e o CEA, modulando o esvaziamento gástrico em ratos hiperosmóticos. Neste estudo, a taxa de esvaziamento gástrico foi avaliada em animais com desidratação celular e bloqueio serotoninérgico no NPBL durante a fase pré-sistêmica da ingestão paradoxal de sódio. A atividade neuronal do NTS e NMDV também foi avaliada através da técnica de imunorreatividade para a proteína c-Fos.

1.5 Integração dos mecanismos facilitadores e inibidores da ingestão de água e sódio

O sistema nervoso central é responsável pelo processamento dos sinais facilitadores e inibidores da ingestão hidromineral¹⁴. Um importante centro receptor e integrador para estes sinais é a região da lâmina terminal, composta pelo núcleo pré-óptico mediano (MnPO), SFO e OVLT, estes dois últimos fazendo parte dos órgãos circumventriculares⁴⁷. O SFO e o OVLT estão localizados próximos na lâmina terminal e são livres de barreira hematoencefálica, características anatômicas que lhes permitem a função de monitoramento da composição do plasma e do líquido^{47,112,113}. Estudos *in vitro* e *in vivo* tem demonstrado a existência de osmorreceptores e células sensíveis a angiotensina II e aldosterona na lâmina terminal, envolvidas no controle da ingestão hidromineral e da excreção de água e sódio^{47,77,101,114-118}. Os neurônios do SFO e o OVLT projetam-se para o MnPO, regiões hipotalâmicas e núcleo leito da estria terminal (BNST), consideradas áreas prosencefálicas envolvidas no controle hidroeletrólítico^{112,119}. O OVLT recebe projeções do NPBL, inibidor da ingestão de sódio, além do NTS, que recebe informações de enchimento cardiovascular, detectadas por barorreceptores, aferências gustatórias via nervo corda do tímpano, e de distensão/hiperosmolaridade do conteúdo gastrointestinal, via nervo vago^{109,111,112,120,121}. Além do SFO e do OVLT no prosencéfalo, a AP é outro órgão circumventricular responsável por monitorar a composição do sangue e participar do controle do equilíbrio hidroeletrólítico¹¹³. A AP possui conexões recíprocas com o NPBL, NTS e núcleo paraventricular do hipotálamo (PVN)^{66,113,122,123}, e responde à concentração plasmática de sódio, talvez via ativação de osmorreceptores hepatoportais, modulando a liberação de ocitocina e vasopressina¹¹³. É possível que o NPBL module a atividade dos órgãos circumventriculares durante a desidratação.

Outro importante centro integrador dos sinais envolvidos no controle da ingestão de água e sódio é a amígdala¹²⁴. O CEA possui conexões recíprocas com o NTS e o

NPBL¹²⁵, e sua integridade é necessária para a ingestão espontânea de NaCl hipertônico e a expressão da ingestão de sódio induzida por mineralocorticoide ou hipovolemia¹²⁶⁻¹²⁸. Estudos realizados em nosso laboratório envolvendo a lesão eletrolítica do CEA demonstraram um aumento da ativação neuronal no núcleo parabraquial medial, assim como abolição da ingestão de sódio em resposta a injeção de muscimol no NPBL^{128,129}. O BNST, considerado parte da amígdala estendida e conectado ao CEA, interliga o tronco encefálico ao sistema dopaminérgico de recompensa^{29,130}, cuja atividade está relacionada às fases apetitiva e consumatória do comportamento ingestivo¹³¹. Ainda, o NPBL poderia participar da integração entre o sistema serotoninérgico e o sistema dopaminérgico de recompensa via conexões com a área tegmental ventral (VTA), fonte de dopamina para o NAC e amígdala^{132,133}.

1.6 Possível interação entre mecanismo inibidor do NPBL e o sistema de recompensa

O sistema límbico cruza as informações sensoriais provenientes do meio interno e do ambiente com os mecanismos de motivação e memória para desencadear respostas apropriadas à sobrevivência do animal. No núcleo parabraquial, tanto a porção medial como a lateral são interligadas indiretamente ao NAC via VTA, núcleo paraventricular do tálamo (via tálamo-cortical gustativa) ou via CEA/BNST (via visceral), as quais fazem parte do circuito que interliga o tronco encefálico ao sistema dopaminérgico de recompensa^{29,130,132}. As conexões do NPBL com o sistema de recompensa parecem ser importantes para a ingestão de sódio produzida a partir de ativação hormonal do NTS/AP^{132,134}. Ainda, o sistema serotoninérgico encefálico, o qual é ativado pela ingestão de sódio e modula a atividade do NPBL, interage com o sistema dopaminérgico de recompensa^{68,135}.

Nesta tese foi avaliada a atividade da amígdala e do NAC, assim como os níveis teciduais de dopamina (DA), serotonina (5-HT) e seus metabólitos (ácido 3,4-diidroxifenilacético ou DOPAC, ácido homovanílico ou HVA, 5-hidroxi-indolacético ou 5-HIAA), após injeções de metisergida no NPBL de ratos com desidratação celular, durante a fase pré-ingestiva.

Talvez a sensibilização da ingestão de sódio, considerada um mecanismo de preparação do animal para desidratações futuras¹³⁶, seja modulada pelo NPBL. Como a hipovolemia ativa mecanismos natriorexigênicos e desativa mecanismos antinatriorexigênicos, é possível que não só a repetição do estímulo facilitador induza

sensibilização à ingestão de sódio, mas também a desativação repetida dos mecanismos antinatriorexigênicos do NPBL promovam sensibilização. Para testar esta hipótese, experimento envolvendo tratamento repetido com muscimol no NPBL foi realizado, lembrando que a ativação GABAérgica do NPBL é natriorexigênica em animais hidratados, dispensando a necessidade da ativação de sinais facilitadores decorrentes de desidratação para induzir ingestão.

1.7 Influência dos mecanismos facilitadores e inibidores ativados pela desidratação sobre a autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral

O estudo do papel do NPBL sobre o comportamento ingestivo tem sugerido que a ingestão de sódio resulta do balanço entre mecanismos facilitadores e inibidores, os quais são acionados por qualquer tipo de desidratação.

A privação hídrica seguida de reidratação parcial (PH-RP) ilustra como facilitação e inibição podem interagir resultando na ingestão de NaCl. Neste modelo, é oferecida água ao animal privado de água até que a sede seja saciada e, posteriormente, um segundo bebedouro contendo solução de sódio, cuja ingestão deve-se a expressão do apetite ao sódio¹³⁷. Ratos privados de água apresentam hiperosmolaridade plasmática e aumento da angiotensina II circulante, sendo que a concentração plasmática de angiotensina II é ainda maior após a saciedade da sede, assim como a ativação da lâmina terminal e CEA, áreas encefálicas envolvidas na facilitação do apetite ao sódio, sugerindo a desativação de alguma inibição¹³⁸⁻¹⁴⁰. Assume-se que a saciedade da sede no protocolo PH-RP remove mecanismos inibidores da natriorexigênese, acionados provavelmente pela hiperosmolaridade plasmática¹³⁷. Como o estado motivacional durante a desidratação pode modificar o valor hedônico de estímulos recompensadores³¹ e a privação hídrica tem sido utilizada como modelo de estudo da recompensa¹⁴¹, o protocolo PH-RP pode ser útil para avaliar o papel dos mecanismos facilitadores e inibidores da ingestão de sódio sobre o sistema de recompensa.

A autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL) pode simular a recompensa gerada por estímulos naturais, como alimentos, contato sexual ou mesmo drogas de abuso, e é considerado um marcador da atividade do sistema de recompensa¹⁴²⁻¹⁴⁴. Estudos realizados nos anos 70-80 demonstraram que a privação hídrica, seja aguda ou crônica, não altera a AEHL em ratos^{145,146} ou promove redução da taxa máxima de resposta (p. ex., pressão de uma barra em caixa de comportamento operante), assim como ocorre durante a

desidratação celular¹⁴⁵. Além dos resultados divergentes, há duas ressalvas quanto à metodologia empregada nos estudos pioneiros de AEHL envolvendo desidratação. Primeiro, estudos clássicos utilizaram a privação hídrica como modelo dipsogênico, porém o protocolo PH-RP nos mostra a existência de mecanismos facilitadores e inibidores para a ingestão de sódio ativados simultaneamente e, possivelmente, influenciando a AEHL. Segundo, a análise da taxa máxima de resposta realizada naqueles primeiros estudos não permite diferenciar o déficit de desempenho da redução do valor hedônico, sendo que trabalhos posteriores sugeriram que a análise do deslocamento horizontal de curvas sigmóides corrente-resposta (ver Material e Método) seriam mais fiéis ao valor hedônico do estímulo elétrico^{147,148}.

Estudos de ingestão e de reatividade gustatória demonstraram que durante a hipovolemia ocorre uma mudança do valor hedônico da solução hipertônica de NaCl, a qual deixa de ser aversiva e passa a ser palatável^{89,149}, enquanto o apetite ao sódio persistente e não saciado reduz a ingestão de solução de sacarose ou da AEHL, ou seja, reduz o valor hedônico de estímulos relacionados à recompensa, situação interpretada como anedônica^{144,150}. Como parte desta tese, foi avaliada a AEHL nas três fases do protocolo PH-RP, assim como em animais com desidratação celular somente, utilizando-se o paradigma do deslocamento horizontal da curva corrente-resposta^{144,148} em testes de curta duração. Este modelo foi utilizado para verificar o efeito da desidratação aguda e da remoção do mecanismo antinatriorexigênico sobre a hedonia, medida pelo protocolo de AEHL. Seria possível que a PH de 18 h desse início a um estado anedônico no rato, revertido pela ingestão de NaCl.

2 OBJETIVO

Os estudos realizados nesta tese tiveram o objetivo de relacionar a:

- 1) Ingestão de sódio produzida em situações de saciedade ao sódio (animal hidratado ou hiperosmótico) pela desativação do mecanismo antinatriorexigênico do NPBL com a:
 - a) Atividade de áreas encefálicas relacionadas ao controle hidroeletrolítico e recompensa.
 - b) Inibição pré-sistêmica da ingestão de NaCl hipertônico.
 - c) Tonicidade do NaCl ingerido.
 - d) Sensibilização da ingestão de NaCl hipertônico.

 - 2) Recompensa produzida pela AEHL com a sede e o apetite ao sódio induzidos no protocolo de PH-RP.
-

3 MATERIAL E MÉTODO

3.1 Animais

Foram utilizados 161 animais pesando 280 a 300 g, sendo 102 ratos Holtzman (colônia do campus de Araraquara da UNESP) utilizados no Laboratório de Fisiologia do Departamento de Fisiologia e Patologia, Faculdade Odontologia de Araraquara da UNESP e 59 ratos Sprague Dawley (Harlan Laboratories, Indianapolis, IA, EUA) utilizados nos experimentos realizados no Departamento de Psicologia da Universidade de Iowa (EUA). Todos os animais foram individualmente ambientados em biotério com temperatura e umidade controladas, em ciclo claro/escuro de 12/12 h. Ração e água estiveram disponíveis *ad libitum* exceto durante períodos específicos dos protocolos experimentais. Solução de NaCl 0,15 ou 0,3 M foi oferecida de acordo com o protocolo experimental de cada grupo de animais. Todos os protocolos experimentais foram aprovados de acordo com as normas do comitê de ética para experimentação animal (CEUA-FOAr 16/2007) ou comitê institucional equivalente.

3.2 Anestesia

As drogas anestésicas e as doses utilizadas nos laboratórios onde os experimentos foram realizados (UNESP ou Universidade de Iowa) estão de acordo com os protocolos de uso corrente em cada instituição, descritas a seguir:

Os animais foram anestesiados para os procedimentos cirúrgicos com cloridrato de cetamina (UNESP: 80 mg/kg p.c. ip, Cristália, Brasil; Universidade de Iowa: 91 mg/kg p.c. ip, Bioniche Teoranta, Inverin, Co. Galway, Irlanda) e cloridrato de xilazina, (UNESP: 7 mg/kg p.c. ip, Agener União, Embu-Guaçu, Brasil; Universidade de Iowa: 9,1 mg/kg p.c. ip, Akorn, Decatur, IL, EUA).

Para remoção do encéfalo e/ou do estômago e intestino delgado, os animais foram profundamente anestesiados com pentobarbital sódico (Universidade de Iowa: 150 mg/kg p.c. ip, Lundbeck Inc. Deerfield, IL, EUA) ou tiopental sódico (UNESP: 80 mg/kg p.c. ip, Cristália, Brasil).

3.3 Cirurgia estereotáxica

Os animais foram anestesiados, posicionados em um aparelho estereotáxico (Kopf, Tujunga, CA, EUA) e receberam implante intraencefálico de cânulas-guia de aço inoxidável com as extremidades dirigidas bilateralmente até 2 mm acima do NPBL, ou de eletrodo bipolar (MS303/2-B/SPC, Plastics One, Roanoke, VA, EUA) com a ponta dirigida unilateralmente até o hipotálamo lateral (HL). Um mandril de aço inoxidável, removível, foi utilizado nos períodos entre injeções para proteger o interior da cânula-guia contra detritos. Os implantes foram fixados com resina acrílica aderida a parafusos, de aço inoxidável, atarraxados à superfície externa do crânio. As seguintes coordenadas estereotáxicas foram utilizadas: a) cânulas-guia dirigidas ao NPBL: anteroposterior = 9,4 mm caudal ao bregma; vertical = 4,1 mm abaixo da superfície dural; lateral = \pm 2,1 mm da sutura sagital; b) eletrodo dirigido ao HL: anteroposterior = 3,0 mm caudal ao bregma; vertical = 8,5 mm abaixo da superfície craniana; lateral = 1,7 mm da sutura sagital.

3.4 Canulação da veia femoral

Cânulas foram construídas inserindo aproximadamente 5 mm de um segmento de 6 cm de tubo de polietileno PE-50 em um segmento de 3 cm de PE-10. Os segmentos foram unidos pelo calor proveniente de um ferro de solda. Depois de unidos, a região do PE-50 próxima a junção com o PE-10 foi aquecida e dobrada em forma de cotovelo, formando um ângulo de aproximadamente 70°. Conectores de aço inoxidável foram construídos a partir de agulhas de 0,6 mm de diâmetro, dobradas em 90° e fixadas em uma tela de polipropileno de 1 cm² com acrílico de uso odontológico. No dia da cirurgia, o lúmen das cânulas foi preenchido completamente, através de uma seringa, com solução de heparina (50 U/ml) e tampado em uma de suas extremidades com mandril de aço inoxidável; as cânulas e os conectores de aço inoxidável foram em seguida mergulhados em etanol 70% por aproximadamente 30 min¹⁵¹. Imediatamente após o procedimento de implante de cânulas-guia no NPBL, com o animal ainda anestesiado, foi realizada dissecação para a localização da veia femoral. Em seguida, foi feita uma pequena incisão na parede desta veia para a inserção da extremidade de PE-10 da cânula de polietileno. A outra extremidade da cânula, exteriorizada através de uma incisão no dorso do animal, foi ligada ao conector de aço inoxidável, o qual foi preso à pele do rato com fio cirúrgico, tendo como apoio a tela de polipropileno, mantida

na região subcutânea e também presa à pele do animal. Todas as incisões externas foram suturadas.

3.5 Cuidados pós-cirúrgicos

Experimentos realizados na UNESP: imediatamente após a cirurgia, os animais receberam uma injeção de ibuprofeno 1% (0,03 ml/rato, Mundo Animal, Brasil) e de complexo antibiótico contendo 80.000 UI de benzilpenicilina e 33 mg de estreptomicina (Fort Dodge Saúde Animal Ltda., Brasil).

Experimentos realizados na Universidade de Iowa: imediatamente após a cirurgia, os animais foram mantidos aquecidos até estarem completamente responsivos e então receberam uma injeção de ibuprofeno (10 mg/kg p.c. ip, Fort Dodge Animal Health, Fort Dodge, IA, EUA), repetida durante dois dias após a cirurgia, duas vezes ao dia.

Os experimentos foram iniciados pelo menos cinco dias após a cirurgia para a recuperação dos animais.

3.6 Injeções de drogas no NPBL

As injeções foram feitas utilizando seringas de 5 µl (Hamilton Co., Reno, NV, EUA), ligadas por um tubo de polietileno (PE-10) a uma agulha injetora 2 mm mais longa do que a cânula-guia. No momento que antecedeu a injeção, os animais foram gentilmente removidos de suas gaiolas e os mandris removidos. Então, a agulha injetora foi introduzida no encéfalo através da cânula-guia. O volume injetado no NPBL foi de 0,2 µl em cada lado durante aproximadamente 15 seg. Após as injeções, o mandril foi repostado e os ratos retornados para suas gaiolas.

As drogas injetadas foram maleato de metisergida (4 µg por sítio de injeção; RBI, Natick, MA, EUA)⁵⁹, antagonista não seletivo do receptor serotoninérgico/agonista de receptor 5-HT_{1A}, dissolvido em solução composta por 2 partes de propilenoglicol e 1 parte de água deionizada (veículo) e o hidrobrometo de muscimol (2 nmol, equivalente a 0,39 µg por sítio de injeção; Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, EUA), agonista de receptores GABAérgicos tipo A, dissolvido em salina isotônica estéril (veículo).

3.7 Teste de ingestão hidromineral

Antes do início do teste, ração e bebedouros de polietileno contendo água e/ou soluções foram removidos. Um ou dois bebedouros de vidro, graduados com escalas de 0,1 ml, contendo água ou solução de NaCl (0,15 M ou 0,3 M) foram colocados nas gaiolas onde os animais residiam, sendo a medida de ingestão dos líquidos iniciada imediatamente após o oferecimento (ver detalhes sobre número de bebedouros, concentração da solução e duração do teste de ingestão nos protocolos experimentais). Após o término do período de registro do volume ingerido, ração foi oferecida novamente e os bebedouros de polietileno retornados às gaiolas.

3.8 Desidratação celular induzida por gavagem de NaCl hipertônico

Água, soluções e ração foram removidas e os animais receberam, através de uma sonda de polietileno, uma infusão intragástrica (gavagem) de 2 ml de NaCl 2 M. Este procedimento induz hipernatremia (aproximadamente 5,8%), hiperosmolemia (aproximadamente 4,4%) e redução da atividade de renina plasmática (aproximadamente 84%)²⁶. Todos os animais foram previamente treinados uma vez por dia, por cinco dias, recebendo gavagem de 0,5 ml de água.

3.9 Desidratação celular induzida por infusão intravenosa de NaCl hipertônico

Água, soluções e ração foram removidas e a cânula de polietileno inserida na veia femoral do rato foi conectada a uma seringa de 5 ml acoplada a uma bomba de infusão (Harvard Apparatus, Holliston, MA, EUA). Logo em seguida, os animais receberam uma infusão iv de 1,5 ml de NaCl 2 M, a 1,5 ml/min. Este procedimento induz hipernatremia (aproximadamente 8,0%) e hiperosmolemia (aproximadamente 2,5%)²⁷.

3.10 Desidratação dupla induzida por Privação Hídrica seguida de Reidratação Parcial (PH-RP)

Os animais foram mantidos por 18 h com acesso livre a ração, porém sem nenhum bebedouro contendo líquido, conforme procedimento baseado em trabalhos

prévios^{139,140}. Após este período, foi oferecido bebedouro contendo água por 75 min. para reidratação parcial (teste da sede). Então, foi oferecido um bebedouro adicional contendo NaCl 0,15 M por 75 min. para reidratação plena (teste do apetite ao sódio), totalizando 150 min. de experimento. Ração e bebedouros foram retornados às gaiolas ao término do último teste de ingestão.

Em animais submetidos ao protocolo de autoestimulação elétrica (ver adiante), os testes da sede e do apetite ao sódio foram iniciados 30 min. após a primeira e a segunda sessão de autoestimulação, respectivamente. Os testes de ingestão hidromineral (ver item 3.7) tiveram duração de 30 min. cada um, com intervalo de 45 min. entre eles.

3.11 Perfusão e remoção dos encéfalos

Os encéfalos foram perfundidos sob anestesia profunda (ver item 3.2) com o rato preso a uma prancha de madeira, com exceção dos animais destinados à determinação da concentração de hormônios plasmáticos e de neurotransmissores/metabólitos encefálicos. As soluções foram infundidas através de uma agulha inserida na artéria carótida via ventrículo cardíaco direito e acoplada a uma bomba de perfusão. Os encéfalos removidos foram seccionados coronalmente em fatias de 40 µm em micrótomo de congelamento.

a) Imuno-histoquímica: tampão fosfato salino (PBS) 0,1 M (aproximadamente 300 ml) refrigerado foi infundido durante 10 min. Em seguida, paraformaldeído (PFA) 0,1 M (aproximadamente 300 ml) refrigerado foi infundido durante 10 min. Os encéfalos removidos foram mantidos em PFA 0,1 M para pós-fixação durante 4 h e depois conservados em sacarose 30% dissolvida em PBS 0,1 M até a realização dos cortes histológicos.

b) Confirmação histológica dos sítios de injeções intraencefálicas: formaldeído tamponado 4% foi infundido com auxílio de uma seringa plástica (20 ml). A conservação dos encéfalos foi feita em formaldeído tamponado 4% até a realização dos cortes histológicos.

c) Determinação de neurotransmissores e seus metabólitos encefálicos: os animais foram decapitados e os encéfalos rapidamente extraídos e congelados em isopentano (-50 °C). O tecido de interesse foi extraído do encéfalo congelado através da técnica de “punch”, seguindo atlas estereotáxico¹⁵² e conforme descrito na literatura¹⁵³. As coordenadas estereotáxicas utilizadas como referência para o núcleo accumbens e amígdala foram 2,1 a 1,1 mm rostral ao bregma e 2,2 a 3,2 mm caudal ao bregma, respectivamente. A porção caudal do

encéfalo (contendo o NPBL) foi mantida em solução de formaldeído tamponado (4%) durante uma semana até a realização dos cortes histológicos em micrótomo de congelamento.

3.12 Protocolos de imuno-histoquímica

Os protocolos imuno-histoquímicos utilizados foram baseados tanto na experiência do nosso laboratório em relação à marcação para proteína c-Fos^{128,140}, como em experimentos da literatura quanto à marcação para ocitocina^{72,128,154-156}.

1) Sequência para detecção de proteína c-Fos em cortes coronais de encéfalo: (a) lavagem com PBS 0,1 M por 2 vezes (10 min. cada); (b) transferência para solução aquosa de metanol/H₂O₂, mantida sob agitação constante, até a interrupção da formação de bolhas (aproximadamente 30 min.); (c) lavagem com PBS 0,1 M por 2 vezes (10 min. cada); (d) bloqueio de ligações inespecíficas, com soro caprino (S1000 Vector Laboratories, Burlingame, CA, EUA) diluído (1/10) em PBS, por 60 min., sob agitação constante; (e) lavagem com PBS 0,1 M por 2 vezes (10 min. cada); (f) incubação em anticorpo primário anti-Fos [Fos (4) SC-52, Rabbit polyclonal IgG, Santa Cruz], 1:4000, diluído em solução de PBS, soro caprino 4% e Triton X100 3% (Aldrich Chemical Company Inc., EUA), sob agitação constante, durante 22 h; (g) lavagem com PBS 0,1 M por 3 vezes (10 min. cada); (h) incubação em anticorpo secundário do kit VECTASTAIN® EliteABC (Rabbit IgG) PK-6101, diluído 1/400 em solução de PBS, soro caprino 4% e Triton X100 3% sob agitação constante, por 60 min.; (i) lavagem com PBS 0,1 M por 3 vezes (10 min. cada); (j) incubação em solução AB (avidina-biotina-peroxidase) do kit VECTASTAIN® EliteABC (Rabbit IgG) PK-6101 sob agitação constante, diluído 1/200 em solução contendo PBS e Triton X100, durante 60 min.; (k) lavagem com PBS 0,1 M por 3 vezes (10 min. cada); (l) incubação em solução contendo diaminobenzidina (200 mg/l; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA), intensificada com soluções de NiSO₄.6H₂O 0,5% (50 ml/l) e CoCl₂.6H₂O 0,5% (50 ml/l), durante 8 min. sob agitação constante.

2) Detecção de ocitocina em cortes submetidos ao protocolo de detecção de proteína c-Fos (dupla marcação): (a) lavagem com PBS 0,1 M por 2 vezes (10 min. cada); (b) bloqueio das ligações inespecíficas com solução de soro caprino diluído em PBS, por 60 min., sob agitação constante; (c) lavagem com PBS 0,1 M por 2 vezes (10 min. cada); (d) incubação em anticorpo primário anti-OT (T-4084, Rabbit polyclonal IgG, Peninsula/Bachem; 1:32.000), diluído em solução de PBS/soro caprino/Triton X100, sob agitação constante (46

h); (e) lavagem com PBS 0,1 M por 3 vezes (10 min. cada); (f) incubação em anticorpo secundário do kit VECTASTAIN® EliteABC (Rabbit IgG) PK-6101, sob agitação constante, diluído 1/400 em solução de PBS/soro caprino/Triton X100, durante 60 min.; (g); lavagem com PBS 0,1 M por 3 vezes (10 min. cada); (h) incubação em solução AB do kit VECTASTAIN® EliteABC (Rabbit IgG) PK-6101, diluído 1/200 em solução de PBS/Triton X100, sob agitação constante, durante 60 min.; (i) lavagem com PBS 0,1 M por 3 vezes (10 min. cada); (j) incubação em solução de diaminobenzidina (200 mg/l), por 3 min., sob agitação constante.

3.13 Quantificação das concentrações plasmáticas de hormônios

Para as dosagens de arginina-vasopressina (AVP) e ocitocina (OT), o sangue troncular foi coletado em tubos de polipropileno, mantidos em gelo, contendo anticoagulante (10 µl de heparina/ml de sangue). O plasma foi separado por centrifugação a 3000 rotações/min., durante 20 min., em centrífuga refrigerada a 4 °C, e em seguida estocado a -70 °C até o momento da extração dos hormônios das amostras.

O processamento das amostras para a determinação da concentração plasmática de AVP e OT foi realizado no Laboratório de Neuroendocrinologia da Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto através de técnicas padronizadas e de rotina^{93,157,158}. A extração de cada hormônio foi realizada utilizando-se 1 ml de plasma adicionado a 2 ml de acetona refrigerada. A mistura foi agitada por 20 seg. e em seguida centrifugada a 3000 rotações/min. por 25 min em 4 °C. O sobrenadante foi decantado em um tubo contendo 2 ml de éter de petróleo, agitado por 10 seg. e mantido em repouso por 5 min. para separação em camadas. A camada superior foi aspirada com o auxílio de uma bomba de vácuo e a inferior liofilizada num Speed Vac. As amostras obtidas de cada camada foram armazenadas a -20 °C, para posterior determinação da concentração plasmática hormonal por radioimunoensaio (RIE).

No RIE, foram utilizados peptídeos marcados com ¹²⁵I, sendo utilizadas 4000 cpm/100 µl para a OT (H-2510 Oxytocin, Bachem) e 2000 cpm/100 µl para a AVP [H-1780: (Arg8)-Vasopressin, Bachem]. Os antissoros utilizados [primeiro anticorpo de coelho anti-AVP: T-4563 (Arg8)-Vasopressin, Bachem; anti-OT: T-4084: Oxytocin, Bachem] eram específicos para os hormônios analisados sem reação cruzada com outros peptídeos. No dia da realização do RIE, as amostras de AVP e OT foram ressuspensas em 250 µl de tampão (tampão TRIS 0,05 M com albumina humana 0,25%), sendo 100 µl do ressuspensão utilizado

para o ensaio, em duplicata. Foram adicionados 100 µl do primeiro anticorpo (anti-AVP ou anti-OT) nas amostras desconhecidas em tubos de ensaio que foram agitados para incubação a 4 °C durante 24 h. O hormônio marcado (100 µl) foi adicionado aos tubos e estes foram agitados para nova incubação por 24 h a 4 °C. O hormônio marcado foi separado do não marcado (proveniente da amostra desconhecida) com o auxílio de anticorpo secundário (anticorpo antigamaglobulina de coelho produzido em cabra) específico para cada hormônio analisado. Após a adição de 100 µl do segundo anticorpo estes foram incubados por 24 h a 4 °C, e no dia seguinte, após incubação de 4 a 6 h pela adição de 1 ml de polietilenoglicol (PEG 6,25%), as amostras foram centrifugadas a 3000 rotações/min. por 25 min. a 4 °C e o sobrenadante foi aspirado e descartado. A radioatividade no precipitado foi determinada com o auxílio de um contador gama (Packard) e a concentração hormonal expressa em pg/ml de plasma.

3.14 Quantificação de neurotransmissores em áreas encefálicas

Amostras de encéfalo foram obtidas por “punch” bilateral das áreas de interesse localizadas segundo atlas estereotáxico¹⁵², com o auxílio de uma agulha de 1 mm de comprimento e diâmetro de 18 gauge, conforme descrito na literatura¹⁵³. As amostras foram processadas para determinação da concentração tecidual (dosagem) de dopamina e seus metabólitos DOPAC e HVA, e serotonina e seu metabólito 5-HIAA. A dosagem foi realizada no Laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara através de técnicas padronizadas e de rotina¹⁵³ utilizando aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC; Waters Alliance, Waters, Milford, MA, EUA) equipado com uma coluna de fase reversa (Symmetry C18, 150 mm x 4,6 mm, 5 µm e poro de 100 Å de diâmetro; Waters, Milford, MA, EUA) para separação dos neurotransmissores e metabólitos, acoplado a um detector eletroquímico (Waters 2465, Waters, Milford, MA, EUA) com eletrodo de carbono vítreo, para detecção e quantificação dos componentes na amostra. O potencial de referência foi ajustado em 800 mV (vs. eletrodo de referência Ag/AgCl). A fase móvel contendo ácido cítrico 50 mM, KCl 2 mM, EDTA 0,1 mM, metanol 9,7% e acetonitrila 2,1%, com pH = 3,2, foi filtrada e infundida no HPLC a 1 ml/min. As amostras foram homogeneizadas em ácido perclórico 0,1 M, centrifugadas a 13.148 g durante 10 min. (4 °C), e 30 µl de cada amostra foi injetado no HPLC. Todas as substâncias foram quantificadas pela comparação entre pico obtido na análise e a curva-padrão previamente

obtida. Apenas os valores superiores ao limite de quantificação (DA: 1,66 ng/ml, DOPAC: 2,40 ng/ml; HVA: 6,40 ng/ml; 5-HT: 3,50 ng/ml; 5-HIAA: 4,26 ng/ml) foram considerados para composição dos grupos experimentais.

3.15 Determinação da taxa de esvaziamento gástrico

A taxa de esvaziamento gástrico foi determinada indiretamente pela quantidade de líquido retido no estômago em resposta a uma sobrecarga de NaCl. Estabelecido na literatura para investigar mecanismos de saciedade pré-sistêmica da sede e apetite ao sódio^{107,108}, este método foi adaptado para esta tese e já se mostrou eficiente para detectar alteração na quantidade de líquido presente no estômago segundo alteração no esvaziamento gástrico¹⁵⁹. Os animais mantidos em jejum por aproximadamente 24 h receberam uma gavagem de 3 ml de líquido (água, NaCl 0,15 M ou NaCl 0,3 M, dependendo do protocolo experimental), ao qual foi adicionado algumas gotas de corante alimentício verde. Após 5 ou 10 min., dependendo do protocolo experimental, os animais foram profundamente anestesiados (ver item 3.2) para laparotomia mediana. O estômago foi identificado e as regiões cárdia e pilórica foram pinçadas com pinças hemostáticas e seccionadas de modo a se retirar o estômago com seu conteúdo preservado. O intestino delgado também foi removido com seu conteúdo preservado após pinçamento das porções rostral do duodeno (próximo ao piloro), caudal do íleo (próximo ao esfíncter ileocecal) e caudal em relação ao duodeno onde o corante pode ser localizado. O comprimento total do intestino delgado removido e do segmento de intestino no qual o corante pode ser visualizado em sua extensão foram medidos com o auxílio de uma régua milimetrada. Cada tecido removido foi imediatamente colocado em béquer de vidro para pesagem individual inicial seguida de secagem completa em estufa a 60 °C por aproximadamente 48 h para determinação do peso seco. A quantidade total de líquido remanescente (conteúdo líquido) no estômago ou no intestino delgado, correspondente à gavagem mais o líquido tecidual, foi obtida através da diferença entre o peso seco e o peso inicial. A extensão de intestino onde foi identificada a presença do corante está expressa nos resultados em relação ao comprimento total do intestino delgado removido.

3.16 Autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL)

3.16.1 Treinamento e aprendizado da AEHL

Os animais foram treinados para a AEHL após o período de recuperação da cirurgia para implante de eletrodo no HL e antes do início dos experimentos. Foram imediatamente excluídos, em qualquer etapa do estudo, animais que apresentassem efeitos motores adversos (ex.: sacudir a cabeça logo após a liberação do estímulo).

O treinamento foi realizado individualmente em uma gaiola de comportamento operante (Universidade de Iowa, Iowa City, IA, EUA), acoplada a um sistema computadorizado (Med Associates Inc., St. Albans, VT, EUA) através de uma alavanca localizada na parte frontal da gaiola a aproximadamente 2 cm do assoalho. Cada pressão da alavanca liberava uma salva de pulsos elétricos retangulares (estímulo) na frequência de 60 Hz, com duração total de 300 ms e de 1 ms cada pulso.

O treinamento teve duração total de seis dias, com uma sessão de AEHL de 15-30 min. por dia. Os seis dias de treinamento foram divididos em três fases. A primeira fase foi do 1º ao 3º dia para aquisição da AEHL. A segunda envolveu o 4º e 5º dias para gerar a associação entre a AEHL e uma pista. Foi utilizada como pista uma lâmpada situada no interior da caixa de comportamento operante, sendo que enquanto apagada o estímulo poderia ser liberado pela pressão na alavanca e, enquanto acesa, não havia a liberação do estímulo. A terceira e última fase ocorreu no 6º dia para determinação da função corrente-resposta para cada animal.

A primeira fase durou três dias para adaptação à gaiola operante e associação entre pressão na alavanca e liberação da salva de pulsos elétricos durante a sessão de AEHL. Os dois primeiros dias foram utilizados para se pré-determinar a intensidade de corrente mínima para produzir AEHL. A corrente mínima foi obtida partindo de 250 μ A, com incrementos de 25 μ A feitos pelo experimentador até o máximo de 350 μ A, até surgir a resposta desejada de pressão voluntária da alavanca pelo próprio animal. A resposta desejada, uma vez produzida, sempre envolveu várias pressões da alavanca não computadas nestes dois dias. O 3º e último dia da primeira fase foi utilizado para determinar tanto a posição correta do eletrodo (evidência funcional) como a AEHL, e conseqüentemente a permanência do animal no estudo. Neste dia a sessão foi realizada sem que o estímulo elétrico tivesse sido liberado pelo experimentador, ou seja, cada animal se autoestimulou pressionando a alavanca com a corrente mínima pré-determinada. Apenas animais que executaram pelo menos 30

pressões de alavanca (resposta) por min., ou 30 RPM, foram selecionados para as próximas fases.

A segunda fase de treinamento, iniciada no 4º dia, consistiu em dois dias para o animal associar liberação da corrente pela pressão da alavanca à ausência de luz (pista) na caixa. O período de luz ou pista apagada, ou série, durava 1 min. Entre uma série e outra havia um período de 0,5 min. de luz ou pista acesa, durante o qual não era liberada corrente em resposta à pressão da alavanca. Cada sessão nesta fase do treinamento foi composta por 20 séries, sendo as 10 primeiras com corrente de 250 μ A e as 10 últimas com corrente de 175 μ A, para todos os animais.

A terceira e última fase de treinamento ocorreu no 6º dia quando foi determinada a função corrente-resposta (μ A/RPM) individualizada. A sessão foi realizada com 13 séries, sendo a primeira com intensidade de corrente de 350 μ A, e as subsequentes com decréscimo de 25 μ A em relação à série anterior. Nesta terceira fase de treinamento, e a partir de então, o critério para a manutenção do animal no estudo foi obtenção de uma função μ A/RPM compatível com uma curva sigmoide de correlação $r^2 > 0,80$ (curva corrente-resposta ótima). A função μ A/RPM sigmoide foi ajustada a três parâmetros - RPM máxima; intensidade de corrente correspondente a 50% da RPM máxima (IC50); RPM mínima - sendo gerada ao final de cada sessão de AEHL (programa Sigma Plot, Jandel Scientific, Chicago, IL, EUA) e utilizada nas sessões subsequentes conforme padrões de séries estabelecidos na literatura^{144,148}.

3.16.2 Escolha do “pacote” de AEHL

A IC50 obtida no 6º dia de treinamento foi utilizada como referência para escolha do pacote de séries de AEHL a ser utilizado para cada rato no teste de confirmação do aprendizado da AEHL e nos experimentos. Ao valor da IC50 foram acrescidos 125 μ A para a determinação da corrente máxima do pacote, conforme descrito no quadro seguinte:

Quadro 1. Pacotes de AEHL utilizados na confirmação do aprendizado da AEHL e nos experimentos que se seguiram ao treinamento. A cada animal foi atribuído um pacote fixo. A corrente máxima de cada pacote corresponde à série número 1 ou primeira série a ser empregada em cada nova sessão para cada animal.

Série	Pacote 1	Pacote 2	Pacote 3	Pacote 4	Pacote 5	Pacote 6	Pacote 7
1	250 μ A	275 μ A	300 μ A	325 μ A	350 μ A	375 μ A	400 μ A
2	225 μ A	250 μ A	275 μ A	300 μ A	325 μ A	350 μ A	375 μ A
3	200 μ A	225 μ A	250 μ A	275 μ A	300 μ A	325 μ A	350 μ A
4	175 μ A	200 μ A	225 μ A	250 μ A	275 μ A	300 μ A	325 μ A
5	150 μ A	175 μ A	200 μ A	225 μ A	250 μ A	275 μ A	300 μ A
6	125 μ A	150 μ A	175 μ A	200 μ A	225 μ A	250 μ A	275 μ A
7	100 μ A	125 μ A	150 μ A	175 μ A	200 μ A	225 μ A	250 μ A
8	75 μ A	100 μ A	125 μ A	150 μ A	175 μ A	200 μ A	225 μ A
9	50 μ A	75 μ A	100 μ A	125 μ A	150 μ A	175 μ A	200 μ A
10	25 μ A	50 μ A	75 μ A	100 μ A	125 μ A	150 μ A	175 μ A

3.16.3 Confirmação do aprendizado da AEHL

O teste para confirmação do aprendizado da AEHL foi realizado no dia seguinte ao 6º dia de treino utilizando a série determinada pelo pacote de AEHL respectivo a cada animal. Neste dia a sessão durou 15 min.: 10 séries de 1 min.; com pista acesa por 30 seg.

Os animais cuja curva corrente-resposta atenderam aos requisitos para a curva ótima foram considerados adequadamente treinados e então utilizados nos experimentos. O pacote utilizado para cada animal foi o mesmo na confirmação do aprendizado de AEHL e nos testes experimentais.

De modo a tornar comparáveis os parâmetros de AEHL, RPMmax e IC50, a intensidade de corrente de cada curva corrente-resposta foi padronizada por série, considerando que as séries, diferentemente das correntes dos pacotes, são comuns aos vários pacotes de AEHL. Desta forma, os resultados foram expressos pela resposta por min. máxima padronizada pela série (RPMPmax) e intensidade de corrente que determina 50% da resposta máxima padronizada pela série (ICP50).

As sessões experimentais iniciaram-se no dia seguinte à confirmação do aprendizado da AEHL.

3.17 Análise histológica

Ao final dos experimentos nos quais foram realizadas injeções centrais, exceto para dosagem de hormônios e neurotransmissores, os ratos receberam injeções do corante (azul de Evans a 2%) em cada sítio de injeção no mesmo volume utilizado para a injeção de drogas. Em seguida, os animais foram profundamente anestesiados (ver item 3.2) e sofreram perfusão com formalina (10%) injetada através do ventrículo cardíaco esquerdo. Após a fixação em formalina por 24 h, os encéfalos foram cortados em um micrótomo de congelamento. Seções transversais (50 μm) foram analisadas em microscópio óptico para confirmar o posicionamento da cânula-guia e da microinjeção no NPBL, conforme descrito em trabalhos da literatura^{59,78,79}. Os animais que não sofreram perfusão (dosagem hormonal e de neurotransmissores) tiveram a porção posterior do encéfalo separada e conservada em formalina durante aproximadamente 10 dias antes de serem cortados em micrótomo de congelamento.

3.18 Experimentos

Os Experimentos I a III foram realizados em Araraquara e os Experimentos IV e V em Iowa City. Os procedimentos cirúrgicos e pós-cirúrgicos foram realizados de acordo com os protocolos específicos adotados em cada laboratório, conforme descrito anteriormente.

Todos os animais utilizados nos Experimentos I a III descritos abaixo envolvendo bloqueio serotoninérgico no NPBL e desidratação celular, passaram por um teste de ingestão hidromineral com o oferecimento de água e NaCl 0,3 M para avaliação funcional preliminar dos sítios de microinjeção no NPBL. Esta avaliação preliminar foi utilizada para determinar a responsividade para a metisergida, utilizando para isso o seguinte critério: ingestão de NaCl hipertônico após a metisergida (a) superior ao tratamento com veículo e (b) igual ou superior a 4 ml, aproximadamente a média ingerida no experimento pioneiro envolvendo ingestão paradoxal de NaCl hipertônico pelo bloqueio serotoninérgico no NPBL⁵¹. Animais que não atenderam ao menos a um dos critérios citados foram eliminados do grupo experimental ao qual pertenciam antes da execução do experimento, logo este teste teve função classificatória (triagem). Os animais selecionados na triagem tiveram os sítios de

injeção centrais verificadas por análise histológica e foram considerados com histologia “positiva” somente quando ambas as injeções atingiram o NPBL. Exceção foi feita no experimento envolvendo dosagem hormonal e de neurotransmissores, no qual a avaliação funcional foi aplicada quando o sítio de injeção não pôde ser histologicamente confirmado.

3.18.1 Experimento 1a. Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre sinalizadores centrais e periféricos durante a fase pré-ingestiva da ingestão de sódio: expressão do gene c-Fos no encéfalo, neurotransmissores em áreas límbicas e concentrações plasmáticas de hormônios neuro-hipofisários

Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre imunorreatividade para a proteína c-Fos

Neste experimento foi verificado o efeito da metisergida injetada no NPBL sobre atividade celular encefálica identificada através de imunorreatividade para a proteína c-Fos (ir-Fos).

Os animais passaram por triagem e três a cinco dias depois submetidos à desidratação celular. Quarenta e cinco min. após a gavagem de NaCl 2 M, metisergida ou veículo foi injetado bilateralmente no NPBL. Setenta e cinco min. mais tarde, os animais foram profundamente anestesiados (ver item 3.2) e os encéfalos perfundidos conforme descrito no item 3.11. Os encéfalos foram então removidos e os procedimentos de imunohistoquímica realizados (ver item 3.12), além da análise histológica dos sítios de injeção no NPBL (ver item 3.17).

Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre a concentração plasmática de hormônios neuro-hipofisários e de neurotransmissores em áreas límbicas durante a desidratação celular

Entre três e cinco dias após o teste funcional de ingestão hidromineral, os animais foram submetidos ao protocolo de desidratação celular. Quarenta e cinco min. após a gavagem de NaCl 2 M, metisergida ou veículo foi injetado bilateralmente no NPBL. Quinze min. mais tarde, os animais foram decapitados para coleta de sangue troncular para quantificação hormonal (ocitocina e vasopressina) e remoção dos encéfalos para quantificação de neurotransmissores (DA e 5-HT) e metabólitos (DOPAC, HVA e 5-HIAA). As amostras foram imediatamente processadas conforme descrição nos itens 3.13 e 3.14. Devido à

dificuldade na determinação dos pontos exatos de injeção em encéfalos removidos a fresco sem perfusão, foram considerados para análise os níveis de hormônios/neurotransmissores de animais que atenderam ao critério funcional de ingestão descrito acima, além dos animais com histologia bilateralmente positiva para o NPBL.

3.18.2 Experimento 1b. Esvaziamento gástrico em ratos com desidratação celular após injeção de metisergida no NPBL

O objetivo principal deste experimento foi verificar se o mecanismo serotoninérgico antinatriorexigênico presente no NPBL está associado à taxa de esvaziamento gástrico quando o conteúdo gástrico é hipertônico. Apesar do modelo de desidratação celular de uso corrente em nosso laboratório para os estudos envolvendo o NPBL ser a sobrecarga intragástrica de NaCl 2 M^{51,53,93}, este protocolo não se mostrou adequado para os estudos de esvaziamento gástrico, já que um volume considerável de líquido remanescente no estômago foi encontrado 1 h após a sobrecarga em alguns animais testados inicialmente. Desta maneira, o protocolo de infusão iv de NaCl 2 M, também indutor de desidratação celular²⁷, foi escolhido para uso neste experimento. Um experimento piloto foi realizado para verificar se havia diferença na taxa de esvaziamento gástrico entre conteúdo isotônico e hipertônico (controle metodológico) e assim caracterizar a solução hipertônica como inibidora do esvaziamento gástrico na condição de desidratação celular.

Esvaziamento gástrico de sobrecarga de NaCl isotônico ou hipertônico em ratos com desidratação celular

Quinze ratos foram desidratados por infusão iv de NaCl 2 M (conforme descrito no item 3.9). Sessenta min. após o início da infusão, os animais foram submetidos a uma sobrecarga de 3 ml de NaCl 0,3 M ou NaCl 0,15 M por gavagem (conteúdo gástrico hipertônico ou isotônico). Dez min. após a gavagem, foram removidos o estômago e intestino para determinação do esvaziamento gástrico (ver item 3.15). Um terceiro grupo de ratos foi submetido aos mesmos procedimentos exceto gavagem de NaCl.

Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre o esvaziamento gástrico em ratos com desidratação celular

Os 21 animais selecionados na triagem dentre os 29 testados inicialmente foram desidratados por infusão iv de NaCl 2 M. Quarenta e cinco min. após o início da infusão, metisergida ou veículo foi injetado bilateralmente no NPBL. Quinze min. mais tarde, os ratos receberam gavagem de 3 ml de NaCl 0,3 M. Dez ou quinze min. após a gavagem foram removidos o estômago e intestino para determinação do esvaziamento gástrico (ver item 3.15).

3.18.3 Experimento 1c. Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre ingestão de NaCl em teste de bebedouro único.

Ingestão de água e de NaCl 0,3 M em testes de bebedouro único após a injeção de metisergida no NPBL durante desidratação celular.

Uma vez que estudos prévios demonstraram que a ingestão de NaCl hipertônico potencializada pela metisergida injetada no NPBL é acompanhada da ingestão de água^{51,59,78,79,83}, o objetivo deste experimento foi testar se a ausência de opção de bebedouro com água permitira que a metisergida potencializasse a ingestão de NaCl 0,3 M.

Dez animais selecionados pela triagem foram desidratados por gavagem de NaCl 2 M (conforme descrito no item 3.8). Quarenta e cinco min. após a gavagem, metisergida ou veículo foi injetado bilateralmente no NPBL. Quinze min. mais tarde, foi iniciado o teste da ingestão hidromineral com o oferecimento de um bebedouro contendo água ou NaCl 0,3 M. Os testes de ingestão hidromineral foram repetidos mais três vezes, com alteração do tratamento e do líquido disponível para ingestão, até que todos os animais tivessem sido testados nas quatro condições experimentais possíveis: a) veículo no NPBL e ingestão de água, b) veículo no NPBL e ingestão de NaCl 0,3 M, c) metisergida no NPBL e ingestão de água e d) metisergida no NPBL e ingestão de NaCl 0,3 M. Os animais foram aleatoriamente incluídos nos diferentes testes realizados a intervalos de 2 a 3 dias. Após o último teste, os animais foram profundamente anestesiados (ver item 3.2) e os encéfalos perfundidos com formalina para remoção e posterior análise histológica do sítio de injeção no NPBL.

Ingestão de água e de NaCl 0,15 M em testes de dupla escolha ou bebedouro único após a injeção de metisergida no NPBL durante desidratação celular.

Em estudos prévios do nosso laboratório, a metisergida injetada no NPBL não alterou a ingestão de NaCl 0,15 M durante hipovolemia, nos mesmos ratos cuja ingestão de NaCl 0,3 M foi potencializada por tal tratamento, sugerindo um efeito seletivo do NPBL no controle da ingestão de NaCl hipertônico⁷⁹. O objetivo deste experimento foi verificar se a ação inibidora seletiva à ingestão de NaCl 0,3 M exercida pelo NPBL também se aplicaria a animais com desidratação celular.

Nove animais selecionados pela triagem foram desidratados por gavagem de NaCl 2 M (conforme descrito no item 3.8). Quarenta e cinco min. após a gavagem, metisergida ou veículo foi injetado bilateralmente no NPBL. Quinze min. mais tarde, foi iniciado o teste da ingestão hidromineral com o oferecimento de um bebedouro contendo NaCl 0,15 M ou dois bebedouros, um contendo água e o outro NaCl 0,15 M. Os testes de ingestão hidromineral foram repetidos mais três vezes, com alteração do tratamento e do líquido disponível para ingestão, até que todos os animais tivessem sido testados nas quatro condições experimentais possíveis: a) veículo no NPBL e ingestão de NaCl 0,15 M (1 bebedouro), b) metisergida no NPBL e ingestão de NaCl 0,15 M (1 bebedouro), c) veículo no NPBL e ingestão de água ou NaCl 0,15 M (2 bebedouros) e d) metisergida no NPBL e ingestão de água ou NaCl 0,15 M (2 bebedouros). Os animais foram aleatoriamente incluídos nos diferentes testes realizados a intervalos de 2 a 3 dias. Após o último teste, os animais foram profundamente anestesiados (ver item 3.2) e os encéfalos perfundidos com formalina para remoção e posterior análise histológica do sítio de injeção no NPBL.

3.18.4 Experimento 1d. Efeito da administração repetida de muscimol no NPBL sobre a sensibilização da ingestão de NaCl hipertônico

O objetivo deste experimento foi verificar se a desativação repetida do NPBL promovida pela injeção de muscimol, considerado um estímulo natriorexigênico, promove sensibilização da ingestão de sódio.

Vinte e três ratos com implante bilateral de cânulas-guia direcionadas ao NPBL foram ambientados com água e NaCl 0,3 M durante 2 dias e, após este período, a ingestão destes líquidos foi medida diariamente durante 28 dias. Testes de ingestão hidromineral foram

realizados no 7º e no 14º dia (1º e 2º experimentos), sendo iniciados 15 min. após a injeção bilateral de muscimol ou veículo no NPBL, e dois bebedouros (água ou NaCl 0,3 M) foram oferecidos para o registro da ingestão hidromineral durante 240 min. No 21º dia (3º experimento) todos os animais foram tratados com muscimol e o teste de ingestão realizado como nos experimentos anteriores. Após o término do período de registro de ingestão diária, os animais foram profundamente anestesiados e os encéfalos perfundidos com formalina para remoção e posterior análise histológica do sítio de injeção no NPBL. Considerando a análise histológica, os resultados obtidos nos testes de ingestão hidromineral foram alocados em um dos seguintes grupos experimentais: a) 3 tratamentos com muscimol (3M) e histologia bilateralmente positiva para o NPBL (NPBL⁺); b) 3M e histologia negativa para NPBL (NPBL⁻); c) 2 tratamentos com veículo e 1 tratamento com muscimol (2V1M) e NPBL⁺; d) 2V1M e NPBL⁻.

3.18.5 Experimento 2. Ingestão hidromineral induzida por PH-RP e intercalada à autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL)

O objetivo deste experimento foi verificar se ocorre interação entre os testes de sede e apetite ao sódio e a AEHL associados às diferentes fases de um ciclo de PH-RP.

Testes piloto da sede e do apetite ao sódio em resposta a um ciclo de privação hídrica (PH) e reidratação parcial (RP), PH-RP

Um estudo piloto foi conduzido com 6 animais não treinados para a AEHL (sem implante de eletrodo no hipotálamo lateral) a fim de quantificar temporalmente a ingestão de água e sódio em animais submetidos ao protocolo PH-RP. Uma parte do grupo experimental foi privada de líquidos por 18 h. Logo após, foi realizado o teste da sede, no qual todos os animais tinham disponível um bebedouro contendo água, durante 75 min. Imediatamente após o término do teste da sede, foi iniciado o teste do apetite ao sódio, com o oferecimento de água e NaCl 0,15 M por 75 min. Ao final do teste, os animais tiveram acesso livre a líquidos e ração por uma semana. Em seguida, os animais foram privados de líquidos por 18 h de maneira contrabalanceada (ver item 3.10) e foi realizado um novo teste da sede e do apetite ao sódio.

Ingestão hidromineral e AEHL: testes da sede e do apetite ao sódio intercalados a AEHL

As sessões experimentais iniciaram no dia seguinte à confirmação do aprendizado da AEHL, se estendendo diariamente por um total de 8 dias.

Quatorze ratos com implante de eletrodo no hipotálamo lateral (ver item 3.3) treinados para AEHL foram submetidos a 3 sessões diárias de 15 min., com intervalo de 60 min. entre as sessões, totalizando 165 min. de período experimental diário durante os 8 dias. Nos dias 1, 2 e 3 foram obtidas as curvas corrente-resposta basais, utilizando pacotes de AEHL determinados no treinamento (ver item 3.16). Os animais não tiveram acesso à ração durante todo o período experimental diário. Os animais permaneceram na gaiola de comportamento operante apenas para a realização das sessões de AEHL, no restante do período os animais foram colocados em gaiolas individuais.

Na noite do dia 3, água e NaCl 0,15 M foram removidos de parte do grupo experimental durante 18 h (PH). No final do período de PH, os animais privados e os animais controle hidratados passaram pela primeira sessão de AEHL por 15 min. Em seguida, todos os animais foram retornados às suas gaiolas e, após 30 min. de restrição a líquidos, foi realizado o teste da sede com acesso apenas a água durante 30 min. Após o teste da sede, os animais passaram pela segunda sessão de AEHL por 15 min. Então, todos os animais foram novamente retornados às suas gaiolas e, após mais 30 min. de restrição a líquidos, foi realizado o teste de apetite ao sódio com acesso a NaCl 0,15 M e água por 30 min. Após o teste de apetite ao sódio, os animais passaram pela terceira e última sessão de AEHL com duração de 15 min. Em seguida, todos os animais foram retornados às suas gaiolas e tiveram livre acesso a NaCl 0,15 M, água e ração.

A função corrente-resposta basal foi novamente obtida por três dias (dias 5 a 7) em todos os ratos. Na noite do dia 7, água e NaCl 0,15 M foram removidos de maneira contrabalanceada por 18 h para novo teste de AEHL intercalado com teste da sede e do apetite ao sódio.

Autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral após desidratação celular

Dezesseis animais treinados para AEHL foram submetidos a uma sessão de 15 min. realizada diariamente durante 8 dias. Nos dias 1, 2 e 3 foram obtidas as curvas corrente-resposta basais, utilizando um dos pacotes de AEHL determinados no treinamento (ver item

3.16). Os animais não tiveram acesso à ração durante toda a sessão diária. Os animais permaneciam na gaiola de comportamento operante, na ausência de ração ou líquidos, apenas para a realização das sessões de AEHL, no restante do período os animais eram colocados em gaiolas individuais.

No dia 4, os animais receberam uma gavagem de NaCl 2 M ou de água e após 1 h passaram pela sessão de AEHL com duração de 15 min. Em seguida, todos os animais foram retornados às suas gaiolas-morada e tiveram livre acesso à água e ração. A função corrente-resposta basal foi novamente obtida por três dias (dias 5 a 7) em todos os ratos. Então, a desidratação celular foi realizada de maneira contrabalanceada para novo teste de AEHL no dia 8.

3.19 Análise estatística

Teste-t pareado foi utilizado para a análise da ingestão total ao término dos testes de ingestão hidromineral. Teste-t foi utilizado para a análise da contagem celular imuno-histoquímica, da concentração plasmática de hormônios, da concentração tecidual de neurotransmissores e metabólitos e da porção intestinal corada (dois grupos experimentais, ver Tabela 3). ANOVA de 1 fator com medidas repetidas foi utilizada para análise da ICP50 e RPMPmax (tratamento). ANOVA de 1 fator (tratamento) foi utilizada para a análise da porção corada intestinal (quatro grupos experimentais, ver Figura 13C), do conteúdo líquido estomacal e intestinal. ANOVA de 2 fatores com medidas repetidas foi utilizada para a análise da ingestão hidromineral não cumulativa (tratamento vs. tempo), da ingestão de água e de NaCl 0,3 M em testes de bebedouro único (tratamento vs. líquido). ANOVA de 2 fatores (tratamento vs. teste/semana) foi utilizada para análise da ingestão em teste de sensibilização comportamental. Student Newman-Keuls foi o pós-teste utilizado. Diferenças foram consideradas significantes quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Análise histológica do sítio de injeção no NPBL

Animais foram considerados histologicamente positivos (NPBL⁺) quando ambos os sítios de injeção foram bilateralmente localizados na região dorsal ao pedúnculo cerebelar superior (scp), a qual corresponde à localização do NPBL segundo Paxinos e Watson, 2005¹⁶⁰, critério adotado em estudos prévios^{59,78} e exemplificado na Figura 1.



Figura 1. Fotomicrografia (20x) de uma seção coronal do encéfalo de um rato representativo do grupo de animais com implante bilateral de cânulas-guia direcionadas ao NPBL. As setas indicam os sítios de injeção no NPBL. Barra de escala = 2 mm; scp: pedúnculo cerebelar superior (brachium conjunctivum).

4.2 Experimento 1a. Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre sinalizadores centrais e periféricos durante a fase pré-ingestiva da ingestão de sódio: expressão do gene c-Fos no encéfalo, neurotransmissores em áreas límbicas, concentrações plasmáticas de hormônios neuro-hipofisários

4.2.1 Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre imunorreatividade para a proteína c-Fos

a) Validação funcional da injeção de metisergida no NPBL

A injeção de metisergida aumentou a ingestão de NaCl 0,3 M comparada à injeção de veículo [t(15) = 6,8; p < 0,05] e quase dobrou a ingestão de água [t(15) = 2,6; p < 0,05] (Tabela 1).

Tabela 1. Ingestão de água e sódio no teste de ingestão hidromineral.

Grupo	Ingestão (ml/120 min)	
	NaCl 0,3 M	Água
Veículo	0,9 ± 0,3	6,8 ± 0,2
Metisergida	13,6 ± 1,9 †	11,7 ± 1,7 †

Valores representados pela média ± erro padrão da média. †vs. veículo. N = 16/grupo.

b) Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre a imunorreatividade para a proteína c-Fos no encéfalo

No tronco encefálico, a injeção de metisergida no NPBL aumentou o número de células ir-Fos comparado à injeção de veículo na porção intermediária do NTS [t(14) = 2,4; p < 0,05] e na área postrema [t(14) = 2,4; p < 0,05; Figura 2], sem modificar a ir-Fos no núcleo motor dorsal do vago [t(14) = 0,6; p > 0,05; Figura 3] e na porção caudal do NTS [t(14) = 2,1; p > 0,05; Figura 4].

O tratamento com metisergida no NPBL aumentou o número de células ir-Fos comparado à injeção de veículo no SFO [t(13) = 2,4; p < 0,05, Figura 5], sem modificar a ir-Fos no OVLT [t(13) = 0,2; p > 0,05; Figura 6]. Também não foi observada diferença na ir-Fos

nas regiões *core* e *shell* do NAC [$t(13) = 0,0$ e $t(13) = 0,2$, respectivamente; $p > 0,05$, Figura 7].

No hipotálamo, o grupo de animais tratados com metisergida no NPBL apresentou ir-Fos aumentada em células não ocitocinérgicas, na região ventral do PVN, em relação ao grupo tratado com veículo [$t(13) = 2,6$; $p < 0,05$], porém não houve diferença no número de células ocitocinérgicas ir-Fos positivas (ativadas) ou ir-Fos negativas (desativadas) entre os grupos [$t(13) = 1,9$ e $t(13) = 0,8$, respectivamente; $p > 0,05$, Figura 8]. Na região magnocelular do PVN, não foi observada diferença entre os tratamentos no número de células ir-Fos [$t(13) = 0,3$; $p > 0,05$], ocitocinérgicas ativadas [$t(13) = 0,7$; $p > 0,05$] e ocitocinérgicas desativadas [$t(13) = 0,9$; $p > 0,05$; Figura 8]. Na região parvocelular do PVN, não foi observada diferença entre os tratamentos no número de células ir-Fos [$t(13) = 1,6$; $p > 0,05$], ocitocinérgicas ativadas [$t(13) = 1,0$; $p > 0,05$] e ocitocinérgicas desativadas [$t(13) = 1,1$; $p > 0,05$; Figura 8]. No SON, não foi observada diferença entre os tratamentos no número de células ir-Fos [$t(12) = 1,7$; $p > 0,05$], ocitocinérgicas ativadas [$t(12) = 0,2$; $p > 0,05$] e ocitocinérgicas desativadas [$t(12) = 1,1$; $p > 0,05$; Figura 9].

NTS Intermediário e Área Postrema

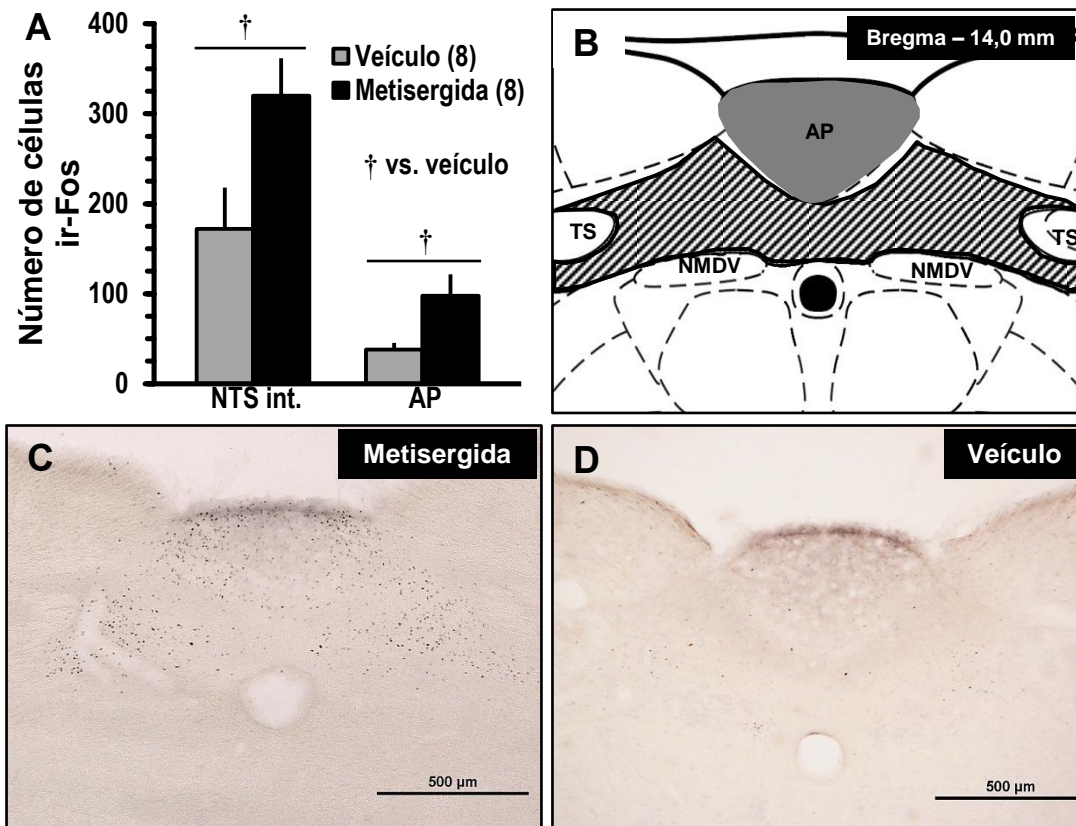


Figura 2. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) na porção intermediária do núcleo do trato solitário (NTS int.) e área postrema (AP) de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005), mostrando a localização do NTS int. (área hachurada), AP (área cinza), trato solitário (TS) e núcleo motor dorsal do vago (NMDV) em seção coronal do tronco encefálico (bulbo) (B). Fotomicrografias de corte coronal do bulbo ilustrando ir-Fos no NTS int. e AP em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.

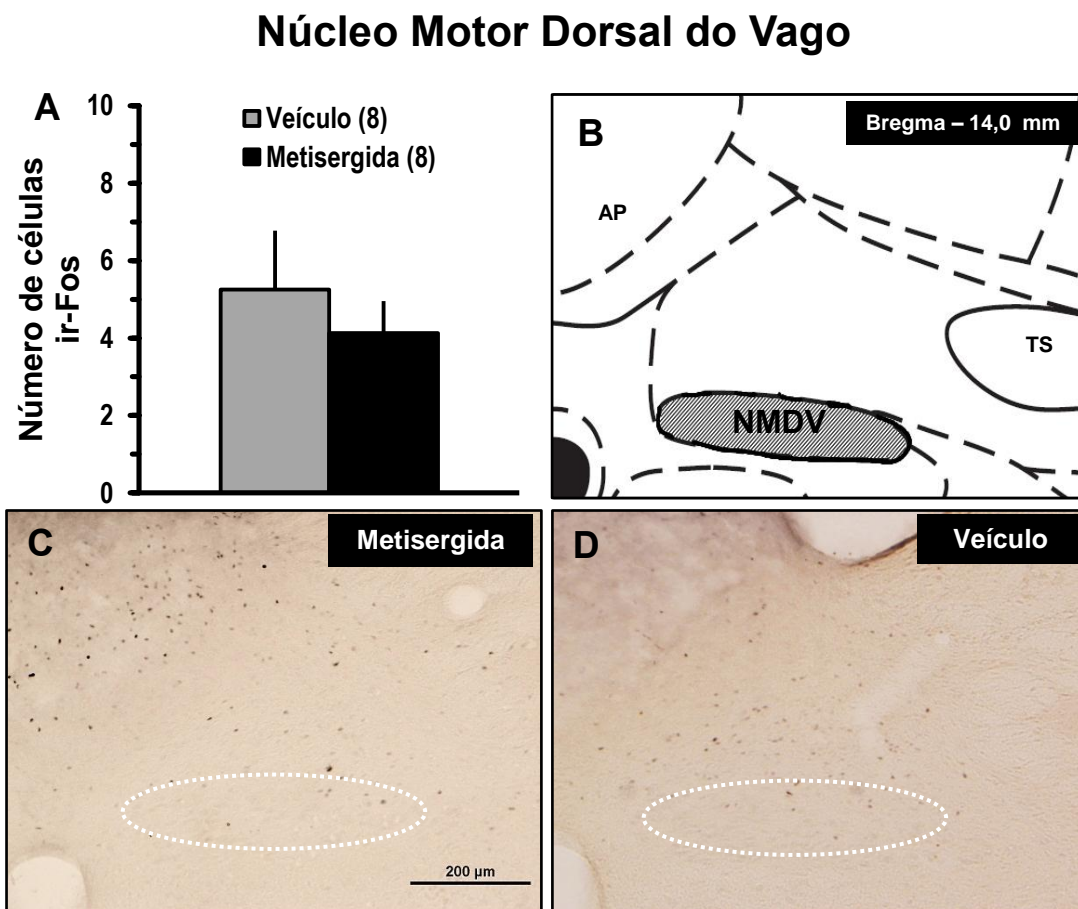


Figura 3. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) no núcleo motor dorsal do vago (NMDV) de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barra preta) ou veículo (barra cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização do NMDV (área hachurada), trato solitário (TS) e área postrema (AP) em seção coronal do tronco encefálico (bulbo) (B). Fotomicrografias de corte coronal do bulbo mostrando ir-Fos no NMDV em aumento de 200x (tracejado branco) de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.

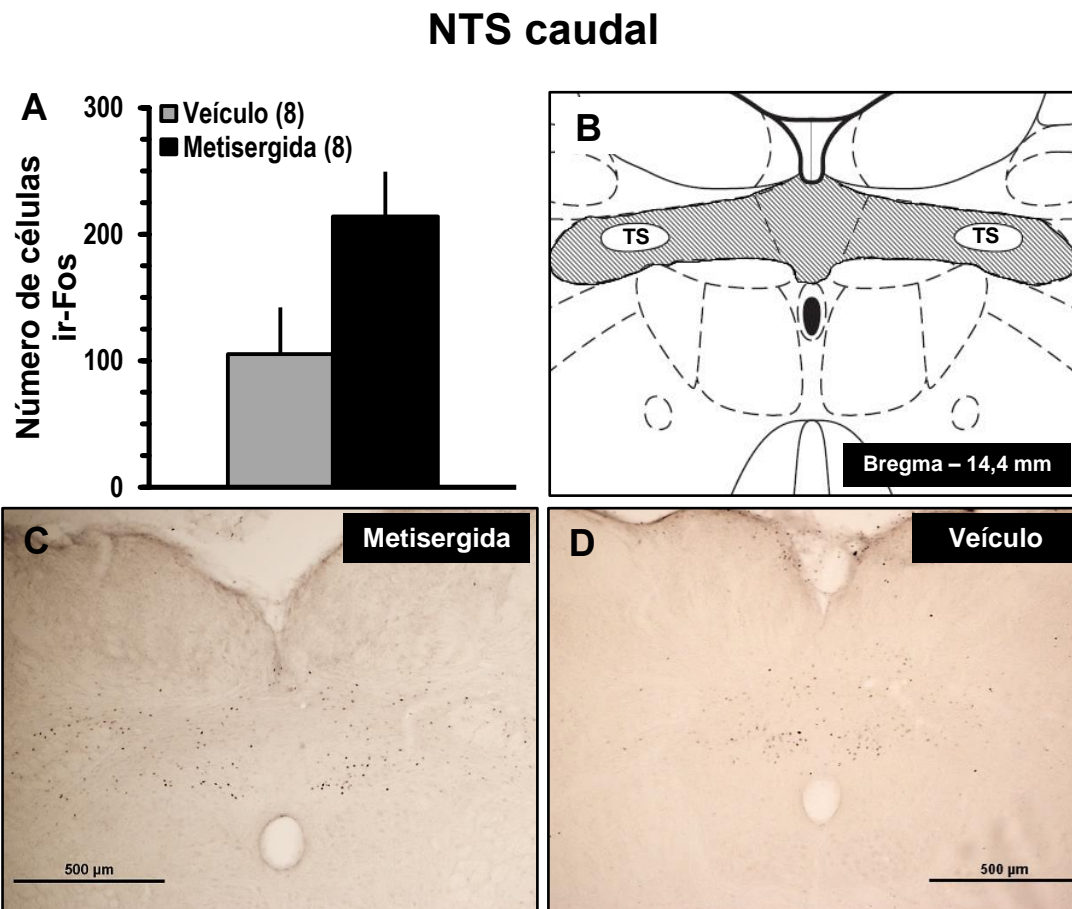


Figura 4. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) na porção caudal do NTS de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barra preta) ou veículo (barra cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização do NTS caudal (área hachurada) em seção coronal do tronco encefálico (bulbo) (B). Fotomicrografias de corte coronal do bulbo mostrando ir-Fos no NTS caudal em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.

Órgão subfornical

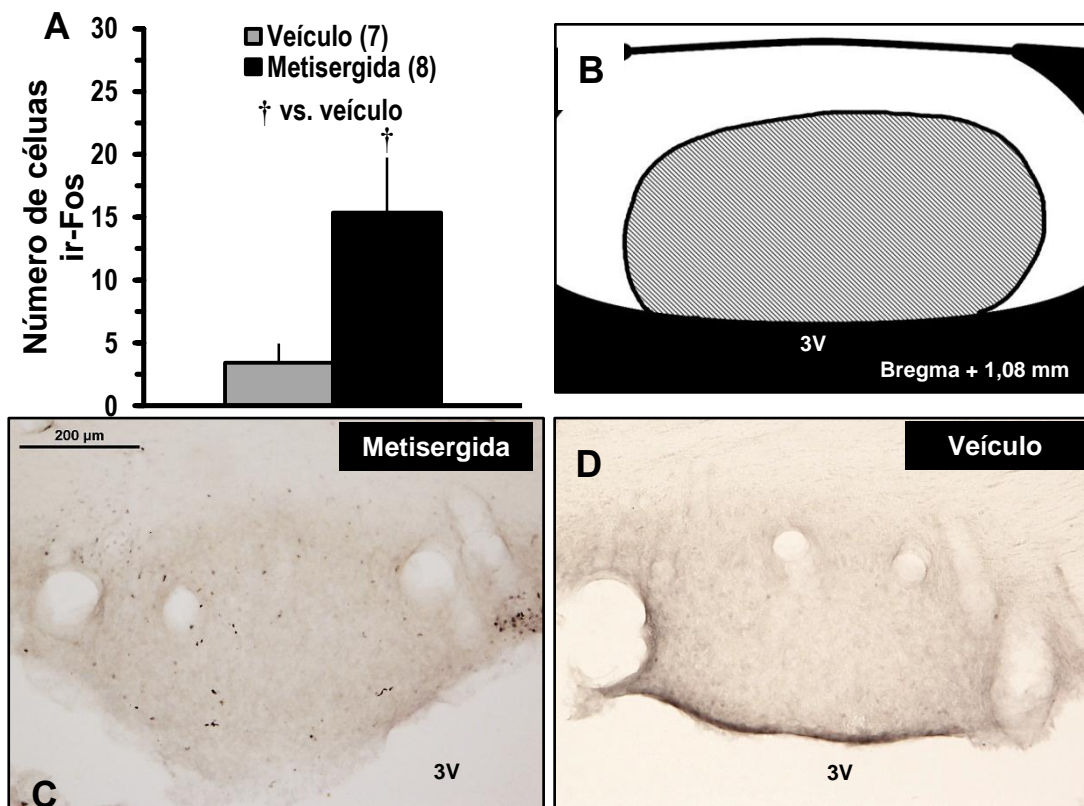


Figura 5. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) no SFO de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barra preta) ou veículo (barra cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) mostrando a localização do SFO (área hachurada) em seção coronal, dorsalmente ao terceiro ventrículo (3V) (B). Fotomicrografias de corte coronal ilustrando ir-Fos no SFO em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.

Órgão vasculoso da lâmina terminal

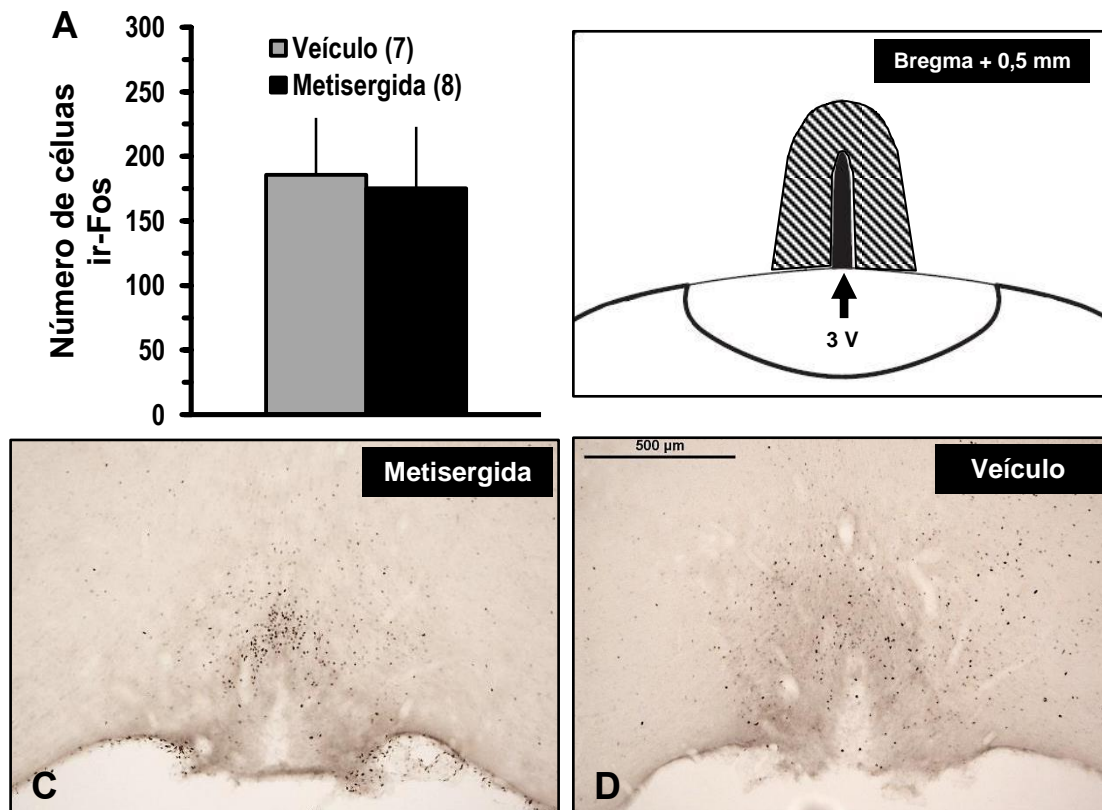


Figura 6. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) no OVLT de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barra preta) ou veículo (barra cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização do OVLT (área hachurada) em seção coronal, dorso-lateralmente ao terceiro ventrículo (3V) (B). Fotomicrografias de corte coronal mostrando ir-Fos no OVLT em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.

Núcleo accumbens

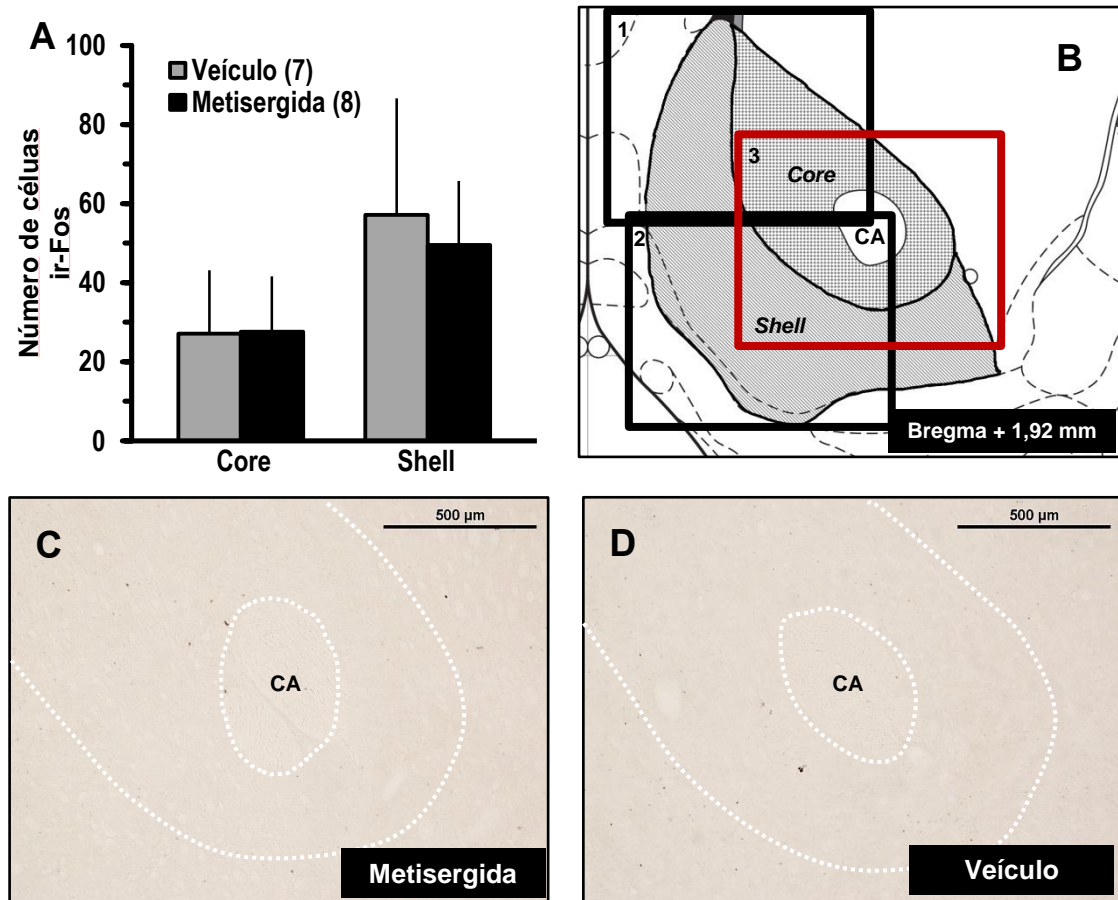


Figura 7. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (ir-Fos) nas regiões *core* e *shell* do NAC de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização das regiões *core* e *shell* do NAC (área hachurada) em seção coronal, dorso-lateralmente ao terceiro ventrículo (3V) (B). Fotomicrografias de corte coronal de uma das três regiões analisadas e delimitadas em B por retângulos, mostrando ir-Fos no NAC em aumento de 100x de rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.

Núcleo paraventricular do hipotálamo

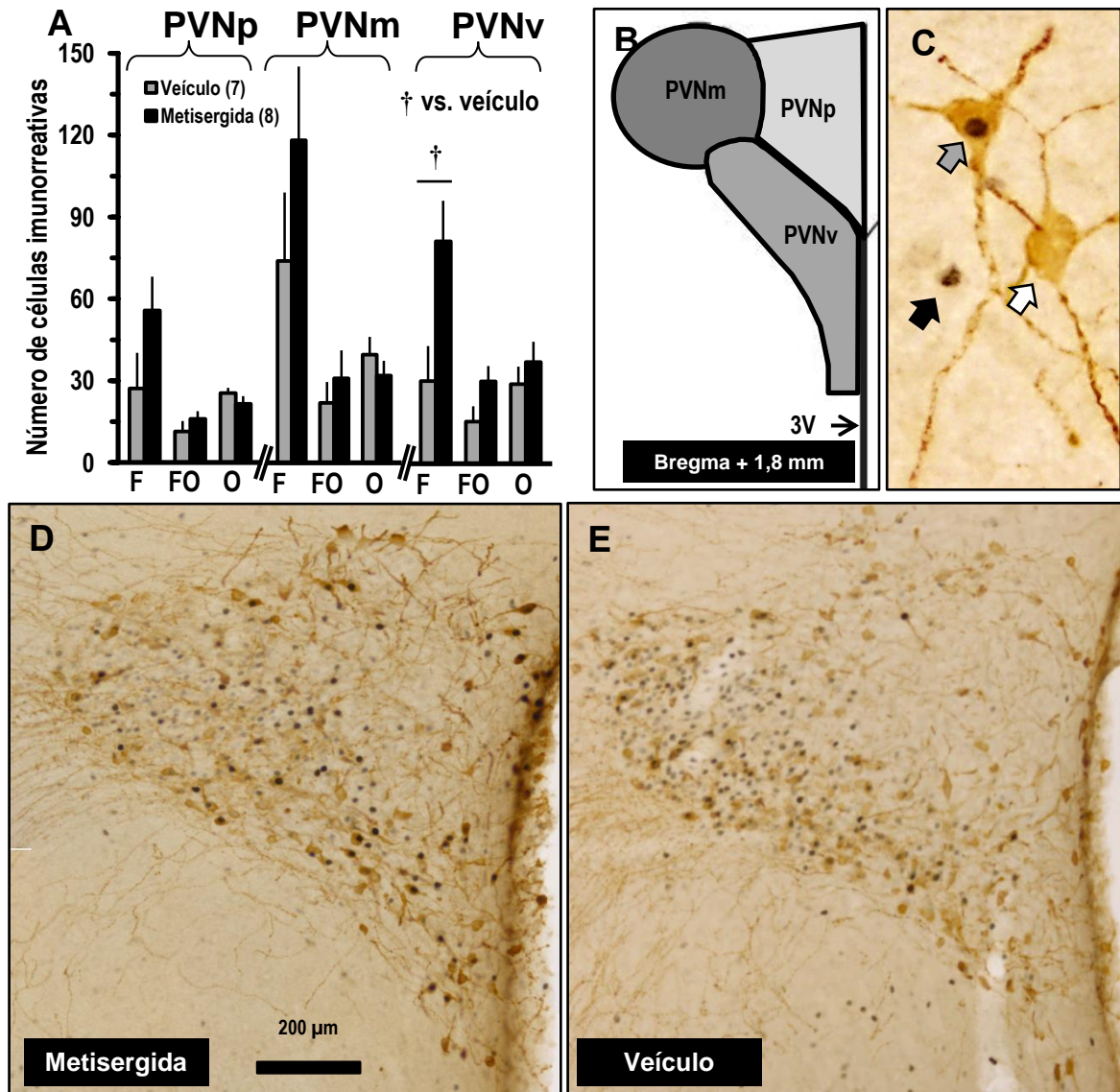


Figura 8. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (F), ocitocina (O) ou ambas (FO) nas regiões parvocelular, magnocelular e ventral do núcleo paraventricular do hipotálamo (PVNp, PVNm e PVNv, respectivamente) de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização das regiões do PVN descritas acima em seção coronal, lateralmente ao terceiro ventrículo (3V) (B). Fotomicrografia (800x) de exemplo contendo célula F (seta preta), FO (seta cinza) e O (seta branca) (C). Fotomicrografias de corte coronal, mostrando ir-Fos no PVN em aumento de 100x de um rato que recebeu metisergida (D) e outro veículo (E) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.

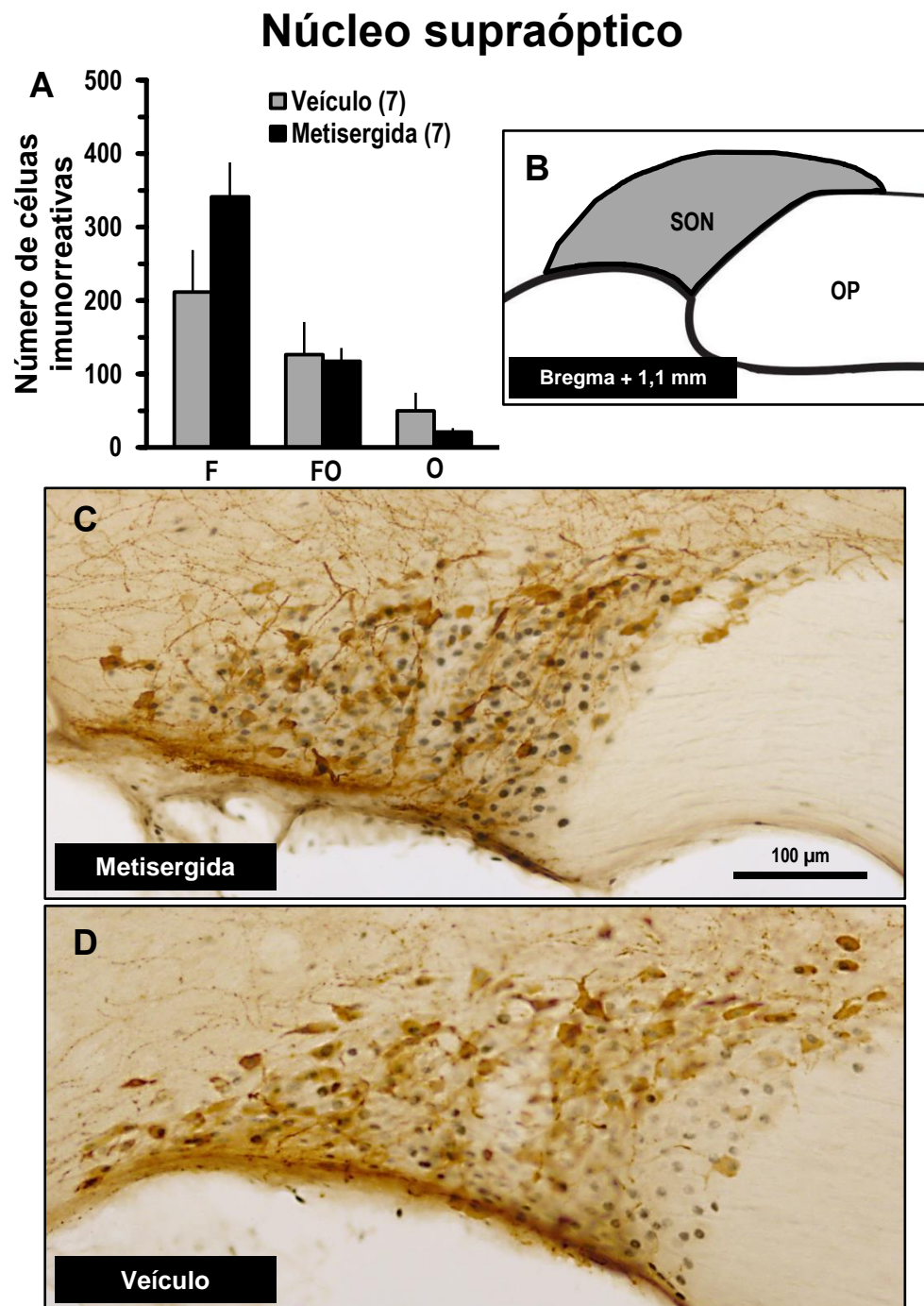


Figura 9. Número de células imunorreativas para a proteína c-Fos (F), ocitocina (O) ou ambas (FO) no SON de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL (A). Diagrama modificado de Paxinos e Watson (2005) ilustrando a localização do SON em seção coronal, dorso-lateralmente ao quiasma óptico (OP) (B). Fotomicrografias de corte coronal, em aumento de 200x, de um rato que recebeu metisergida (C) ou veículo (D) no NPBL. O número de animais por grupo experimental está descrito entre parênteses.

4.2.2 Concentração de hormônios neurohipofisários no plasma e de neurotransmissores em áreas límbicas, após injeção de metisergida no NPBL, em ratos com desidratação celular

Efeito da metisergida sobre a ingestão hidromineral

A injeção de metisergida aumentou em aproximadamente 6 vezes a ingestão de NaCl 0,3 M comparada à injeção de veículo [$t(18) = 4,8$; $p < 0,05$] sem modificar a ingestão de água entre os grupos [$t(18) = 1,2$; $p > 0,05$] (Tabela 2).

Tabela 2. Ingestão de água e sódio de ratos com desidratação celular: validação da injeção no NPBL.

Grupo	Ingestão (ml/120 min)	
	NaCl 0,3 M	Água
Veículo	1,8 ± 0,4	11,1 ± 1,3
Metisergida	10,7 ± 1,7 [†]	13,2 ± 1,8

Valores representados pela média ± erro padrão da média. [†]vs. veículo. N = 19/grupo.

Animais cujas injeções foram localizadas dorsalmente ao NPBL (n = 2) ou não puderam ser identificadas e apresentaram ingestão de NaCl inferior a 4 ml (n = 2) não apresentaram diferença entre os tratamentos na ingestão de NaCl 0,3 M [metisergida: 2,0 ± 1,5 ml/120 min. vs. veículo: 1,7 ± 1,2 ml/120 min.; $t(3) = 0,7$, $p > 0,05$] e de água [metisergida: 12,6 ± 5,7 ml/120 min. vs. veículo: 12,6 ± 2,4 ml/120 min.; $t(3) = 0,0$, $p > 0,05$].

a) Determinação da concentração plasmática de ocitocina e vasopressina

A injeção de metisergida no NPBL não produziu alteração na concentração plasmática de ocitocina [$t(17) = 0,9$; $p > 0,05$] e vasopressina [$t(16) = 0,7$; $p > 0,05$] comparada à injeção de veículo (Figura 10). Houve perda de uma amostra de vasopressina do grupo que recebeu metisergida.

Nos animais cujas injeções foram localizadas dorsalmente ao NPBL ou com histologia indefinida que apresentaram ingestão de sódio inferior a 4 ml no teste de ingestão, foi observado, para ocitocina, 10,1 ± 5,4 pg/ml de plasma após metisergida (n = 3) vs. 1,1 pg/ml de plasma após veículo (n = 1), e para vasopressina 3,6 ± 0,5 pg/ml de plasma após

metisergida (n = 3) vs. 3,0 pg/ml de plasma após veículo (n = 1). Devido ao reduzido número de animais, não foi realizado qualquer teste estatístico comparando os tratamentos.

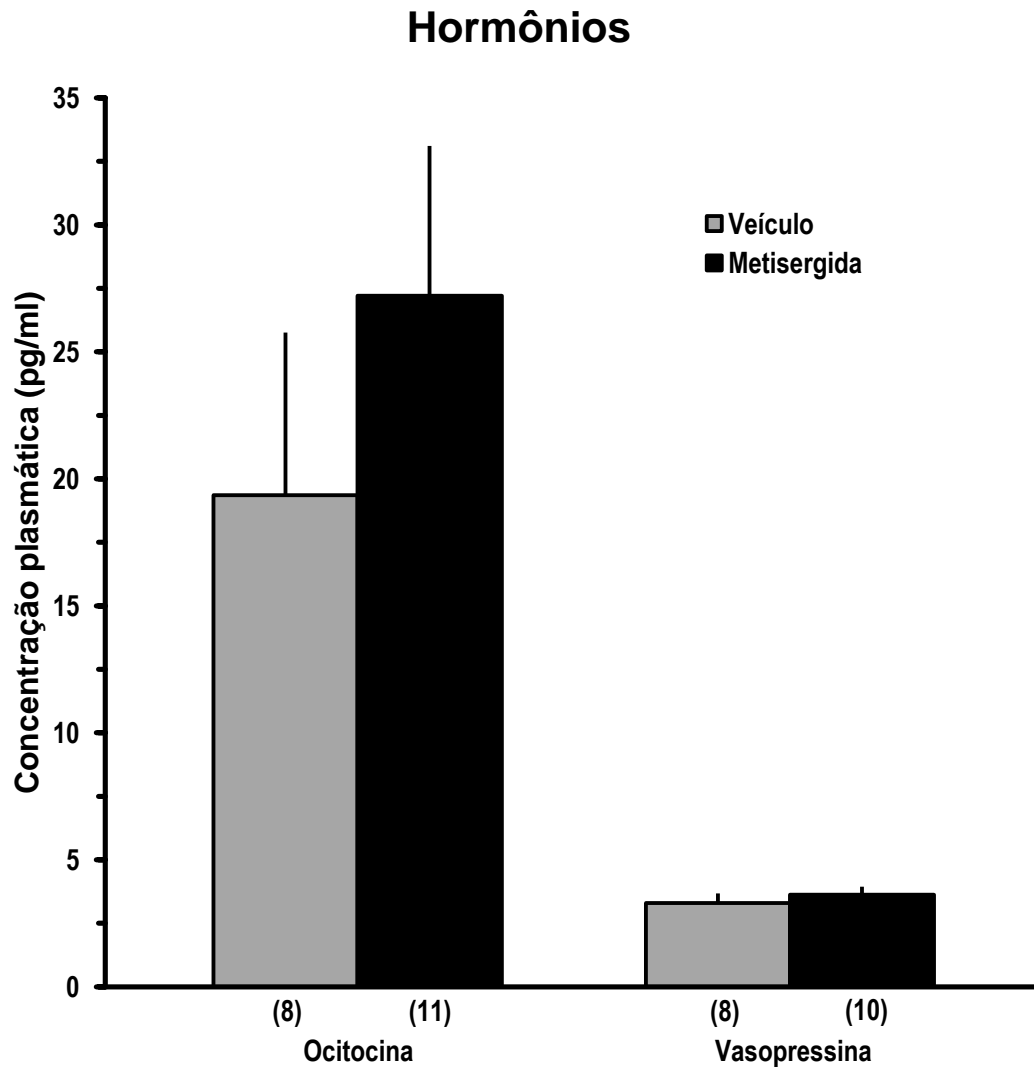


Figura 10. Concentração plasmática de ocitocina (direita) e vasopressina (esquerda) de ratos com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.

b) Determinação dos níveis de dopamina, serotonina e seus metabólitos no NAC e na amígdala

A injeção de metisergida no NPBL não produziu alteração na concentração tecidual de dopamina ou DA [t(17) = 0,6; p > 0,05], ácido 3,4-diidroxifenilacético ou DOPAC [t(17) = 0,1; p > 0,05], ácido homovanílico ou HVA [t(16) = 0,1; p > 0,05], serotonina ou 5-HT [t(8) = 0,7; p > 0,05] e ácido 5-hidroxi-indolacético ou 5-HIAA no núcleo accumbens comparado à injeção de veículo [t(17) = 0,9; p > 0,05] (Figura 11A). Não foram consideradas para análise amostras em que a concentração tecidual do neurotransmissor ou metabólito foi inferior ao limite de quantificação do método analítico.

A injeção de metisergida no NPBL aumentou a concentração tecidual de DA na amígdala comparada à injeção de veículo [t(17) = 2,3; p < 0,05], mas não alterou a concentração de DOPAC [t(17) = 1,8; p > 0,05], 5-HT [t(17) = 1,8; p > 0,05] e 5-HIAA [t(17) = 0,8; p > 0,05] (Figura 11B). Todas as amostras de tecido apresentaram concentrações de HVA inferiores ao limite de quantificação do método analítico e os resultados foram excluídos.

Nos animais cujas injeções foram localizadas dorsalmente ao NPBL ou com histologia indefinida que apresentaram ingestão de sódio inferior a 4 ml no teste de ingestão, foi observado no NAC: $2,0 \pm 0,3$ ng/mg de tecido (metisergida, n = 3) vs. 1,1 ng/mg de tecido (veículo, n = 1) para DA, $1,5 \pm 0,2$ ng/mg de tecido (metisergida, n = 3) vs. 1,6 ng/mg de tecido (veículo, n = 1) para DOPAC, $0,3 \pm 0,1$ ng/mg de tecido (metisergida, n = 3) vs. 0,2 ng/mg de tecido (veículo, n = 1) para HVA, $0,2 \pm 0,1$ ng/mg de tecido (metisergida, n = 3) sem amostra com veículo para 5-HT e $0,4 \pm 0,0$ ng/mg de tecido (metisergida, n = 3) sem amostra com veículo para 5-HIAA; na amígdala: $0,3 \pm 0,1$ ng/mg de tecido (metisergida, n = 3) vs. 0,4 ng/mg de tecido (veículo, n = 1) para DA, $0,2 \pm 0,0$ ng/mg de tecido (metisergida, n = 3) vs. 0,2 ng/mg de tecido (veículo, n = 1) para DOPAC, nenhuma amostra com metisergida vs. 0,1 ng/mg de tecido (veículo, n = 1) para HVA, $0,4 \pm 0,0$ ng/mg de tecido (metisergida, n = 3) vs. 0,5 ng/mg de tecido (veículo, n = 1) para 5-HT, $0,5 \pm 0,0$ ng/mg de tecido (metisergida, n = 3) vs. 0,8 ng/mg de tecido (veículo, n = 1) para 5-HIAA. Não foram consideradas amostras em que a concentração tecidual do neurotransmissor ou metabólito foi inferior ao limite de quantificação do método analítico. Devido ao reduzido número de animais, não foi realizado qualquer teste estatístico comparando os tratamentos.

Neurotransmissores e metabólitos

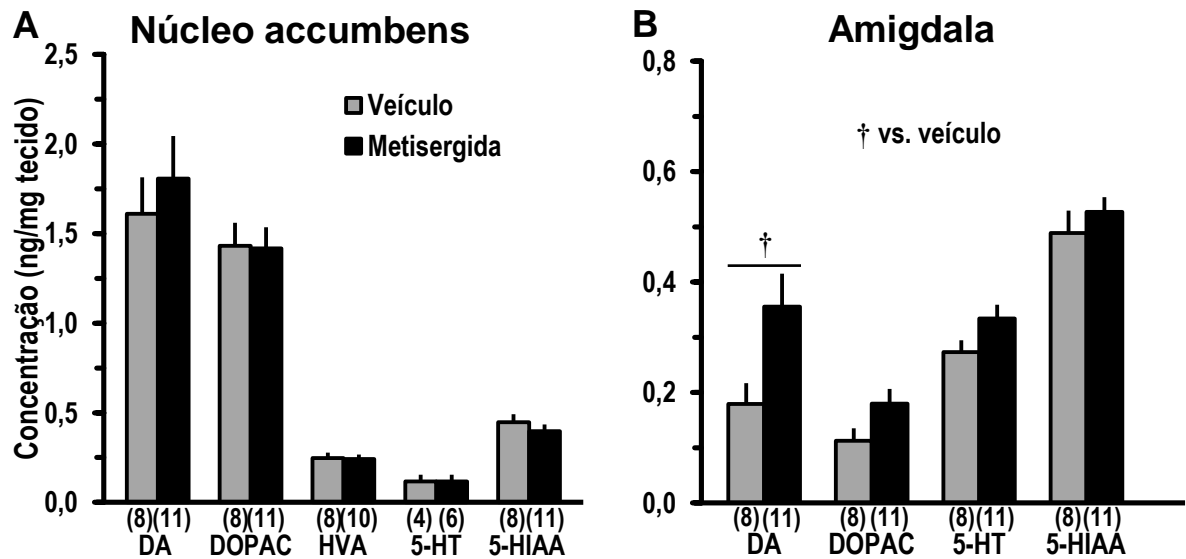


Figura 11. Concentração de dopamina (DA), ácido 3,4-diidroxifenilacético (DOPAC), ácido homovanílico (HVA), serotonina (5-HT) e ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA), no núcleo accumbens (A) e na amígdala (B) de animais com desidratação celular e que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.

4.3 Experimento 1b. Esvaziamento gástrico em ratos com desidratação celular após injeção de metisergida no NPBL

4.3.1 Esvaziamento gástrico de sobrecarga de NaCl isotônico ou hipertônico em ratos com desidratação celular

A gavagem de NaCl 0,3 M produziu um conteúdo líquido estomacal maior do que a gavagem de NaCl 0,15 M ou nenhuma gavagem (Tabela 3). Houve um efeito significativo do tratamento [$F(2, 12) = 29,4, p < 0,05$].

A gavagem de NaCl 0,3 M não produziu conteúdo líquido intestinal diferente da gavagem de NaCl 0,15 M ou nenhuma gavagem (Tabela 3). Não houve diferença significativa entre os tratamentos [$F(2, 12) = 2,0, p > 0,05$].

A gavagem de NaCl 0,3 M corou uma porção menor do intestino do que a gavagem de NaCl 0,15 M [$t(8) = 2,5, p < 0,05$] (Tabela 3). Não foi observado corante no intestino grosso de nenhum animal.

Tabela 3. Efeito da osmolaridade da solução de NaCl infundida por gavagem (3 ml) sobre o conteúdo líquido estomacal e intestinal de ratos com desidratação celular.

Grupo	Conteúdo líquido estomacal (g)	Conteúdo líquido intestinal (g)	Porção intestinal corada (%)
Sem gavagem	1,7 ± 0,1	5,7 ± 0,4	—
NaCl 0,15 M	3,2 ± 0,3 †	6,3 ± 0,4	68 ± 1
NaCl 0,3 M	3,9 ± 0,2 ††	6,8 ± 0,4	51 ± 7 †

Valores representados pela média ± erro padrão da média. † diferente da gavagem de NaCl 0,15 M, † vs. grupo sem gavagem. N = 5/grupo.

4.3.2 Desidratação celular induzida por infusão intravenosa de NaCl 2 M: efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre a ingestão de NaCl 0,3 M

A injeção de metisergida no NPBL produziu maior ingestão de NaCl 0,3 M aos 15 e 60 min. do teste de ingestão comparada à injeção de veículo (Figura 12A). Houve um efeito significativo do tratamento [$F(1, 20) = 24,8, p < 0,05$], tempo [$F(3, 60) = 5,4, p < 0,05$] e interação entre os dois fatores [$F(3, 60) = 4,2, p < 0,05$]. A ingestão total de NaCl 0,3 M foi

cinco vezes maior quando os animais receberam metisergida ($11,8 \pm 1,9$ ml/120 min.) em comparação ao tratamento com veículo ($2,2 \pm 0,5$ ml/120 min.) [$t(20) = 5,0$, $p < 0,05$].

O tratamento com metisergida no NPBL potencializou a ingestão de água aos 30 min. do teste de ingestão em comparação aos animais que receberam veículo (Figura 12B). Houve um efeito significativo do tratamento [$F(1, 20) = 17,5$, $p < 0,05$], tempo [$F(3, 60) = 5,7$; $p < 0,05$] e interação entre os dois fatores [$F(3, 60) = 4,2$, $p < 0,05$]. A ingestão final de água foi duas vezes maior em animais tratados com metisergida ($11,5 \pm 1,4$ ml/120 min.) em comparação ao tratamento com veículo ($6,1 \pm 0,9$ ml/120 min.) [$t(20) = 4,2$, $p < 0,05$].

A ingestão total de líquido após injeções de metisergida ($23,3 \pm 2,8$ ml/120 min) foi aproximadamente três vezes em comparação ao veículo ($8,3 \pm 1,0$ ml/120 min.) [$t(20) = 5,9$, $p < 0,05$].

Os ratos que não atingiram o critério de seleção na triagem, portanto não incluídos no teste de esvaziamento gástrico, apresentaram injeção: bilateral no NPBL ($n = 1$); no NPBL de um lado e fora do NPBL de outro ($n = 2$); ambas injeções fora do NPBL ($n = 5$). Não houve diferença na ingestão de NaCl 0,3 M entre os tratamentos com metisergida e veículo ($1,1 \pm 0,4$ e $1,8 \pm 0,6$ ml/120 min., respectivamente) [$t(7) = 1,0$, $p > 0,05$, $n = 8$]. Também não houve diferença na ingestão de água entre os tratamentos com metisergida e veículo ($5,5 \pm 1,1$ e $5,9 \pm 1,4$ ml/120 min., respectivamente) [$t(7) = 0,2$, $p > 0,05$, $n = 8$].

Desidratação celular

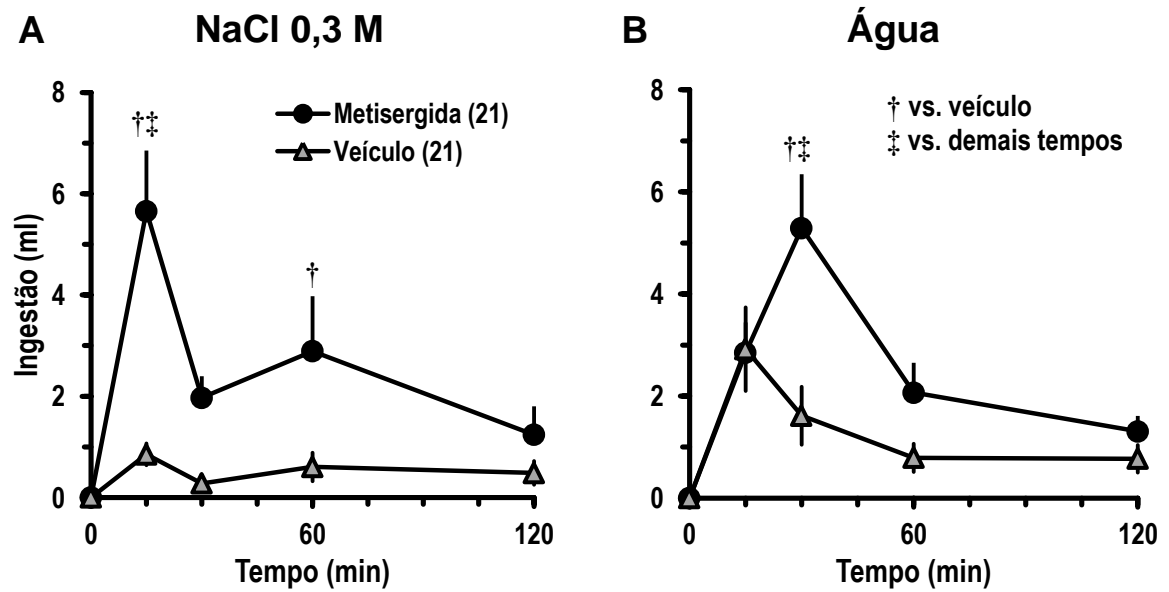


Figura 12. Ingestão não cumulativa de NaCl 0,3 M (A) e água (B), no teste da ingestão hidromineral de dois bebedouros, em animais com desidratação celular que receberam injeção de metisergida (círculos pretos) ou veículo (triângulos cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.

4.3.3 Esvazimento gástrico após injeção de metisergida no NPBL de ratos com desidratação celular

A injeção de metisergida no NPBL não alterou o conteúdo líquido do estômago 10 ou 15 min. após gavagem de NaCl 0,3 M comparada à injeção de veículo (Figura 13A). Não houve efeito significativo do tratamento [$F(1, 17) = 0,8, p > 0,05$], tempo [$F(1, 17) = 0,1, p > 0,05$] ou interação entre os fatores [$F(1, 17) = 2,0, p > 0,05$].

A injeção de metisergida no NPBL não alterou o conteúdo líquido do intestino delgado 10 ou 15 min. após gavagem de NaCl 0,3 M comparada à injeção de veículo (Figura 13B). Não houve efeito significativo do tratamento [$F(1, 17) = 0,4, p > 0,05$], tempo [$F(1, 17) = 1,6, p < 0,05$] ou interação entre os fatores [$F(1, 17) = 3,9, p > 0,05$]. A injeção de metisergida também não alterou a porção corada do intestino delgado (Figura 13C). Não houve efeito significativo do tratamento [$F(1, 17) = 0,4, p > 0,05$], tempo [$F(1, 17) = 1,9, p > 0,05$] ou interação entre os fatores [$F(1, 17) = 0,6, p > 0,05$]. Não foi encontrado corante no intestino grosso de nenhum animal.

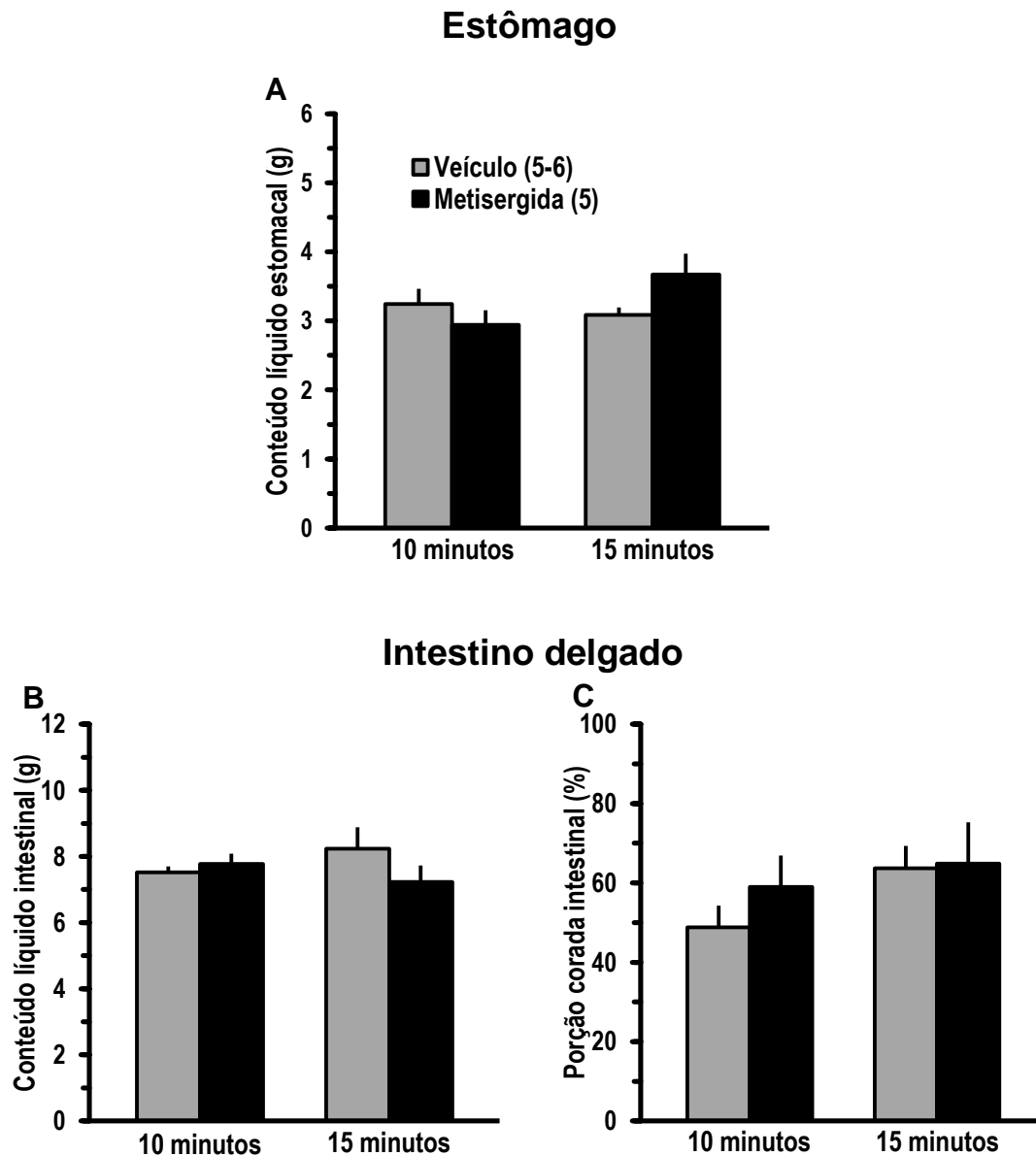


Figura 13. Conteúdo líquido estomacal (A) e intestinal (B), e porção do intestino delgado corada (C) após gavagem de NaCl 0,3 M de ratos com desidratação celular, que receberam injeção de metisergida (círculos pretos) ou veículo (triângulos cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.

4.4 Experimento 1c. Efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre ingestão de NaCl em teste de bebedouro único

4.4.1 Efeito da metisergida no NPBL sobre ingestão de água e NaCl 0,3 M em teste de bebedouro único

4.4.1.1 Desidratação celular induzida por gavagem de NaCl 2 M: efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em teste de dois bebedouros (triagem)

A injeção de metisergida no NPBL potencializou a ingestão de NaCl 0,3 M [$t(9) = 3,2$; $p < 0,05$], sem modificar a ingestão de água [$t(9) = 1,8$; $p > 0,05$] comparada à injeção de veículo, conforme descrito na tabela 4.

Tabela 4. Ingestão de água e sódio no teste de ingestão hidromineral.

Grupo	Ingestão (ml/120 min)	
	NaCl 0,3 M	Água
Veículo	1,7 ± 0,5	8,0 ± 1,1
Metisergida	10,0 ± 2,8 [†]	11,2 ± 1,3

Valores representados pela média ± erro padrão da média. [†]vs. veículo. N = 10/grupo.

4.4.1.2 Ingestão de água e de NaCl 0,3 M em testes de bebedouro único após a injeção de metisergida no NPBL durante desidratação celular

A ingestão de NaCl 0,3 M foi maior após o tratamento com metisergida em relação ao tratamento com veículo, porém a ingestão de água foi similar entre os tratamentos, havendo efeito significativo do fator tratamento [$F(1, 36) = 7,9$, $p < 0,05$]. Ao contrário do tratamento com veículo, a ingestão de NaCl 0,3 M foi maior em relação à de água após tratamento com metisergida, havendo efeito significativo do fator líquido [$F(1, 36) = 4,4$, $p < 0,05$]. Não houve efeito significativo da interação entre os fatores [$F(1, 36) = 3,9$, $p > 0,05$; Figura 14].

Teste de ingestão com bebedouro único

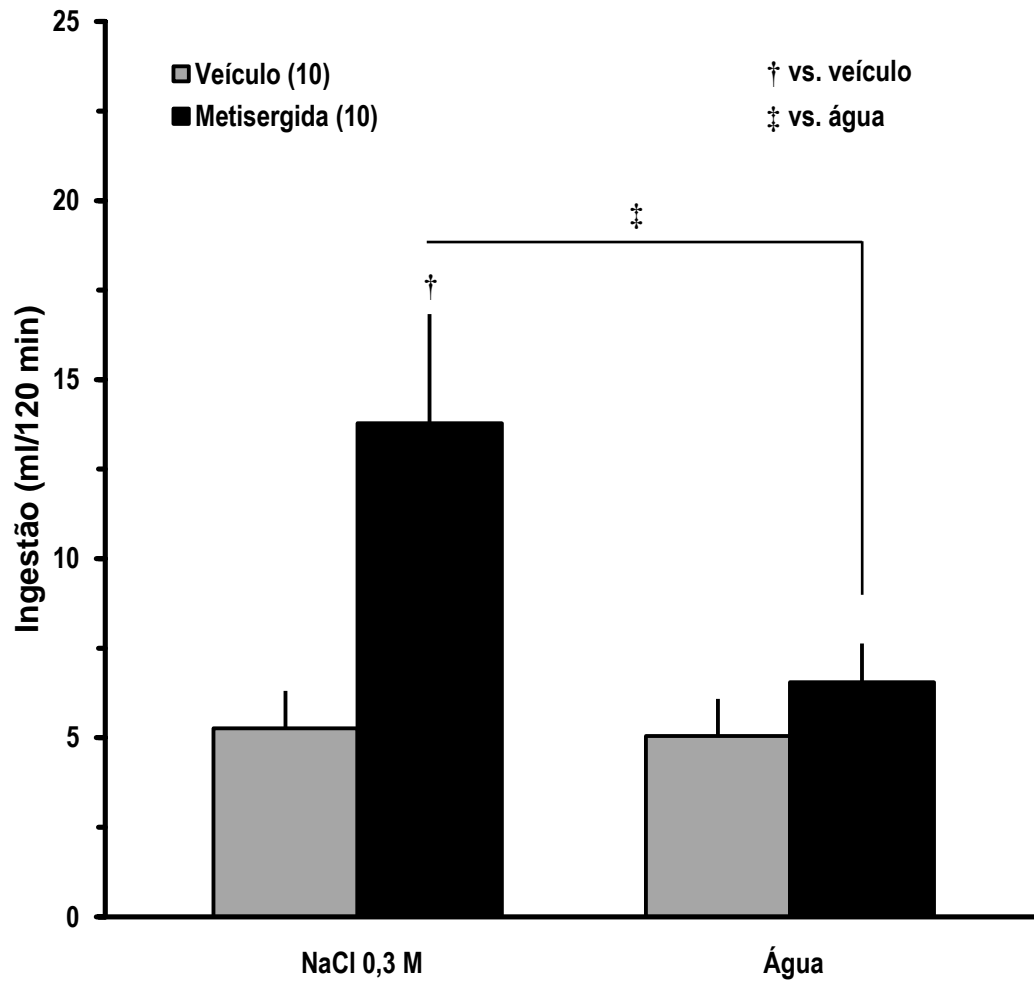


Figura 14. Ingestão de NaCl 0,3 M (esquerda) ou água (direita) durante testes de bebedouro único em animais com desidratação celular, que receberam injeção de metisergida (barras pretas) ou veículo (barras cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.

4.4.2 Efeito da metisergida no NPBL sobre ingestão de água e de NaCl 0,15 M em testes de dupla escolha ou bebedouro único

4.4.2.1 Desidratação celular induzida por gavagem de NaCl 2 M: efeito da injeção de metisergida no NPBL sobre a ingestão de água e NaCl 0,3 M em teste de dois bebedouros (triagem)

A injeção de metisergida no NPBL potencializou a ingestão de NaCl 0,3 M [$t(8) = 3,9$; $p < 0,05$], sem modificar a ingestão de água [$t(8) = 1,0$; $p > 0,05$] comparada à injeção de veículo, conforme descrito na tabela 5.

Tabela 5. Ingestão de água e sódio no teste de ingestão hidromineral.

Grupo	Ingestão (ml/120 min)	
	NaCl 0,3 M	Água
Veículo	2,5 ± 0,9	7,7 ± 1,8
Metisergida	12,7 ± 3,2 [†]	9,3 ± 1,6

Valores representados pela média ± erro padrão da média. [†]vs. veículo. N = 9/grupo.

4.4.2.2 Ingestão de água e de NaCl 0,15 M em testes de dois bebedouros após a injeção de metisergida no NPBL durante desidratação celular

A injeção de metisergida no NPBL produziu ingestão de NaCl 0,15 M significativamente diferente, aos 15 e aos 30 min., em relação ao tratamento com veículo e aos demais tempos do mesmo tratamento (Figura 15A). Houve um efeito significativo do tratamento [$F(1, 8) = 5,5$, $p < 0,05$], do tempo [$F(3, 24) = 9,1$, $p < 0,05$] e da interação entre os dois fatores [$F(3, 24) = 4,0$, $p < 0,05$]. A ingestão total de NaCl 0,15 M foi maior após tratamento com metisergida em comparação ao veículo [$t(8) = 2,3$, $p < 0,05$; Figura 15C].

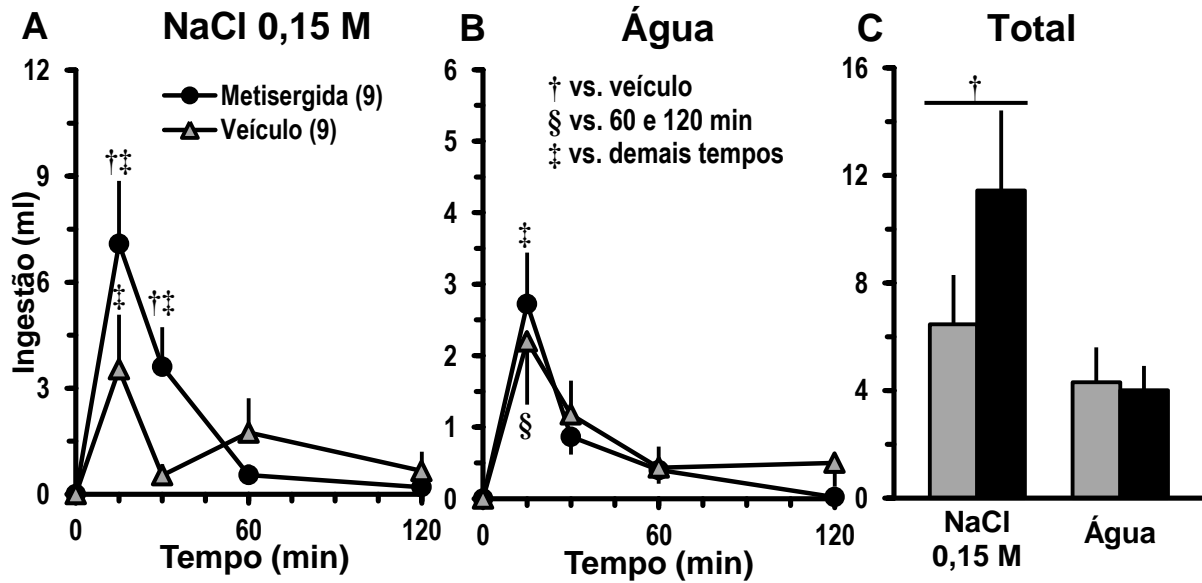
O tratamento com metisergida no NPBL não modificou a ingestão de água em comparação às injeções de veículo; a ingestão de água foi maior aos 15 min. em relação aos demais tempos após tratamento com metisergida e em relação aos tempos de 60 e 120 min. após o tratamento com veículo (Figura 15B). Houve um efeito significativo do tempo [$F(3, 24) = 8,2$, $p < 0,05$], mas não houve um efeito significativo do tratamento [$F(1, 8) = 0,1$, $p > 0,05$] ou interação entre os dois fatores [$F(3, 15) = 0,6$, $p > 0,05$]. A ingestão total de água

também foi semelhante entre os animais tratados com metisergida ou veículo [$t(8) = 0,8$, $p > 0,05$; Figura 15C].

4.4.2.3 Ingestão NaCl 0,15 M em testes de bebedouro único após a injeção de metisergida no NPBL durante desidratação celular

A injeção de metisergida no NPBL produziu ingestão de NaCl 0,15 M significativamente diferente, aos 15 e 30 min., em relação aos demais tempos do mesmo tratamento e ao tratamento com veículo; o tratamento com veículo promoveu maior ingestão aos 15 min. em relação aos demais tempos do mesmo tratamento (Figura 15D). Houve um efeito significativo do tratamento [$F(1, 8) = 15,6$, $p < 0,05$], do tratamento [$F(3, 24) = 29,1$, $p < 0,05$] e interação entre os dois fatores [$F(3, 24) = 9,1$, $p < 0,05$]. A ingestão total de NaCl 0,15 M aos 120 min. do teste também foi maior entre os animais tratados com metisergida em relação ao tratamento com veículo [$t(8) = 3,9$, $p < 0,05$; Figura 15E].

Dois bebedouros



Um bebedouro

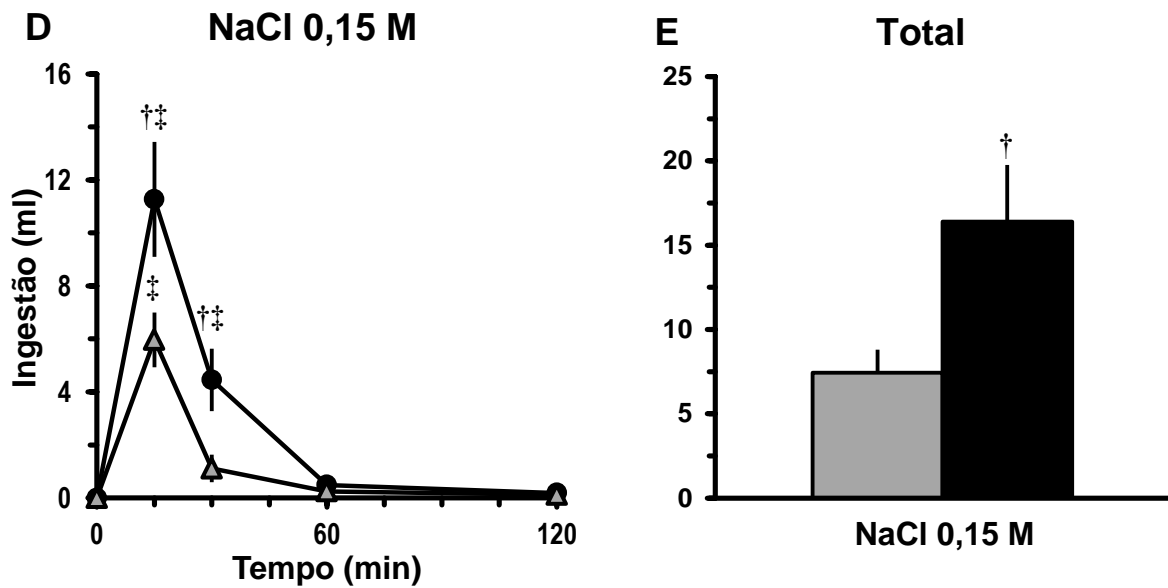


Figura 15. Ingestão não cumulativa de NaCl 0,15 M (A) ou água (B), ingestão total de NaCl 0,15 M ou água aos 120 min. do teste de ingestão hidromineral com dois bebedouros (C) e ingestão não cumulativa e total de NaCl 0,15 M (D e E, respectivamente) em teste com bebedouro único em animais com desidratação celular, que receberam injeção de metisergida (círculos ou barras pretas) ou veículo (triângulos ou barras cinza) no NPBL. O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.

4.5 Experimento 1d. Efeito da administração repetida de muscimol no NPBL sobre a sensibilização da ingestão de NaCl hipertônico

A ingestão de NaCl 0,3 M induzida pelo muscimol no grupo 3M com injeções no NPBL, no terceiro experimento, foi maior em relação aos demais grupos, e em relação ao resultado do próprio grupo nos testes anteriores. A ingestão de NaCl 0,3 M no grupo 2V1M com injeções no NPBL também foi maior no terceiro experimento em relação aos anteriores (Figura 16A). Houve um efeito significativo no fator grupo [$F(3, 57) = 9,0, p < 0,05$], no fator experimento [$F(2, 57) = 6,1, p < 0,05$] e na interação entre os fatores [$F(6, 57) = 3,5, p < 0,05$].

Não foi observada diferença na ingestão de água entre os grupos em nenhum teste de ingestão hidromineral (Figura 16B). Não houve um efeito significativo no fator grupo [$F(3, 57) = 1,8, p > 0,05$], no fator teste [$F(2, 57) = 1,1, p > 0,05$], assim como na interação entre os fatores [$F(6, 57) = 1,0, p > 0,05$].

Não foi observada diferença na ingestão diária média de NaCl 0,3 M (Figura 17A) e de água (Figura 17B), entre os grupos, nos períodos que compreendem a semana anterior ao primeiro teste (dias 1 a 6), e posterior ao primeiro (dias 8 a 13), segundo (dias 15 a 20) e terceiro teste (dias 22 a 27). Não houve um efeito significativo sobre os fatores período [NaCl 0,3 M: $F(3, 76) = 0,1, p > 0,05$; água: $F(3, 76) = 0,7, p > 0,05$] e tratamento [NaCl 0,3 M: $F(3, 76) = 1,4, p > 0,05$; água: $F(3, 76) = 2,5, p > 0,05$], assim como sobre a interação entre os fatores [NaCl 0,3 M: $F(9, 76) = 0,3; p > 0,05$; água: $F(9, 76) = 0,2; p > 0,05$].

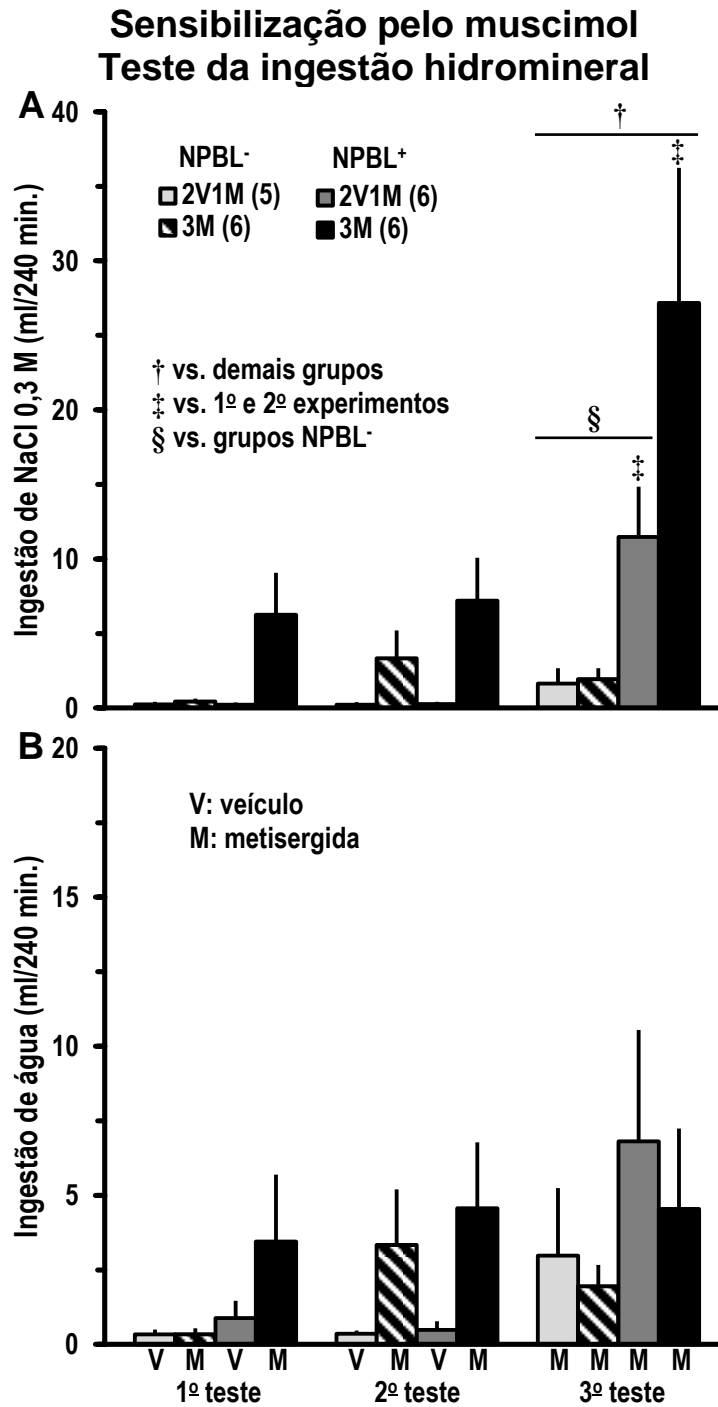


Figura 16. Ingestão de NaCl 0,3 M (A) e água (B) durante três testes de ingestão com dois bebedouros. Os animais, hidratados, receberam injeção de veículo (V) ou muscimol (M) no NPBL (NPBL⁺) ou fora dele (NPBL⁻) em cada teste de ingestão hidromineral. O número de animais em cada tratamento está descrito entre parênteses.

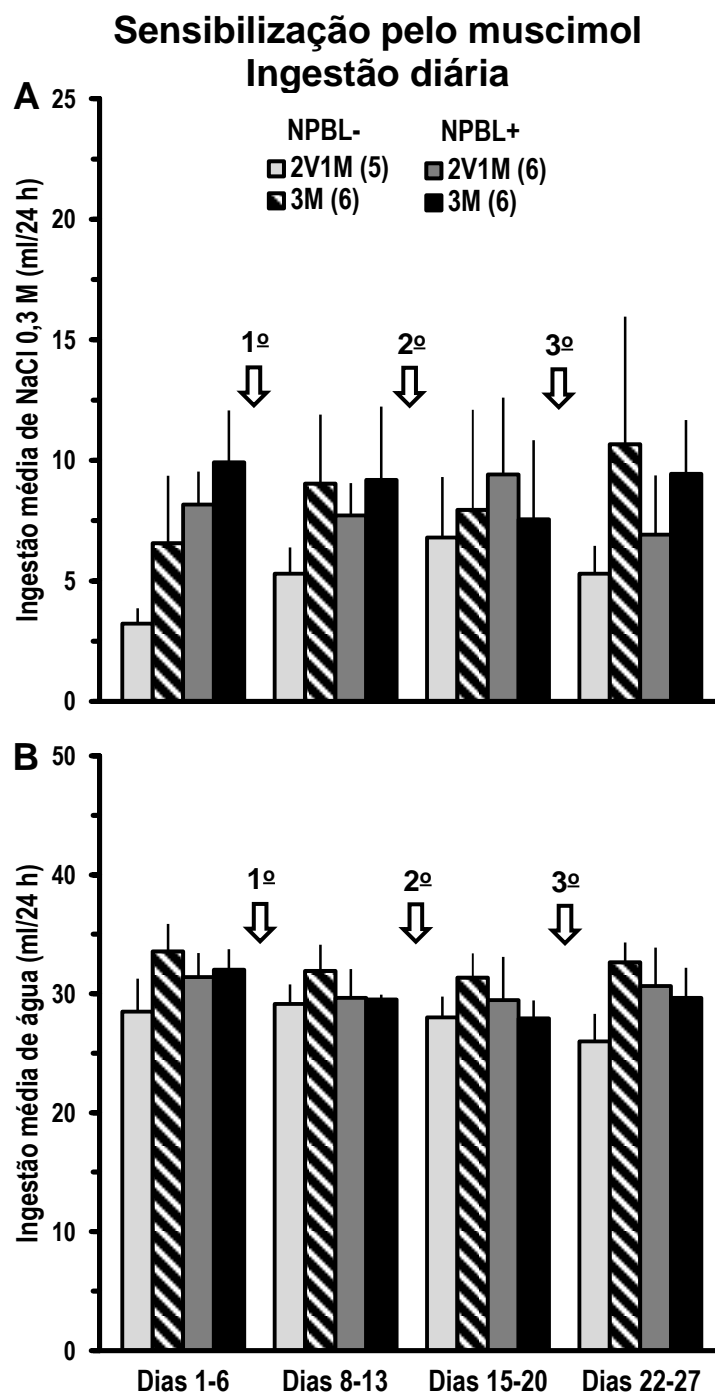


Figura 17. Ingestão diária média de NaCl 0,3 M (A) e água (B) correspondente ao período precedente ao primeiro teste de ingestão hidromineral (dias 1 a 6) e aos períodos subsequentes (dias 8 a 13, 15 a 20 e 22 a 27) a cada teste. Os animais hidratados receberam injeção de veículo (V) ou muscimol (M) no NPBL (NPBL⁺) ou fora dele (NPBL⁻) em cada teste de ingestão hidromineral (ver Figura 16). O número de animais em cada tratamento está descrito entre parênteses.

4.6 Experimento 2. Ingestão hidromineral induzida por PH-RP e intercalada à autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL)

4.6.1 Testes piloto da sede e do apetite ao sódio em resposta a um ciclo de privação hídrica (PH) e reidratação parcial (RP), PH-RP

No teste da sede, a ingestão de água do grupo privado foi maior comparada ao grupo hidratado nos instantes 15 e 30 min. (Figura 18A). A ingestão de água do grupo privado foi maior aos 15 min. comparada aos demais instantes e aos 30 min. comparada a 45 min. Não houve diferença entre instantes no grupo hidratado. Houve um efeito significativo do tratamento [$F(1, 5) = 110,9$; $p < 0,05$], tempo [$F(4, 20) = 190,7$; $p < 0,05$] e interação entre os fatores [$F(4, 20) = 56,8$; $p < 0,05$]. A ingestão total de água durante os 75 min. de teste (Figura 18B) foi maior no grupo privado comparado ao grupo controle [$t(5) = 10,5$; $p < 0,05$].

No teste do apetite ao sódio, realizado logo em seguida ao teste da sede, a ingestão de NaCl 0,15 M do grupo parcialmente hidratado (RP) foi máxima aos 15 e 30 min. e maior do que a ingestão do grupo hidratado (Figura 19A). Não houve diferença entre instantes no grupo hidratado. Houve um efeito significativo do tratamento [$F(1, 5) = 27,7$; $p < 0,05$], tempo [$F(4, 20) = 20,9$; $p < 0,05$] e interação entre os fatores [$F(4, 20) = 8,6$; $p < 0,05$]. A ingestão total de NaCl 0,15 M aos 75 min. (Figura 19C) foi maior no grupo RP em relação ao grupo hidratado [$t(5) = 5,3$; $p < 0,05$]. A ingestão de água não foi alterada em nenhum dos dois grupos durante o teste (Figura 19B). Não houve efeito significativo do tratamento [$F(1,5) = 1,6$; $p > 0,05$], tempo [$F(4, 20) = 0,9$; $p > 0,05$] e interação entre os fatores [$F(4, 20) = 0,4$; $p > 0,05$]. Não houve diferença entre os grupos na ingestão total de água aos 75 min. de teste (Figura 19D) [$t(5) = 1,3$; $p > 0,05$].

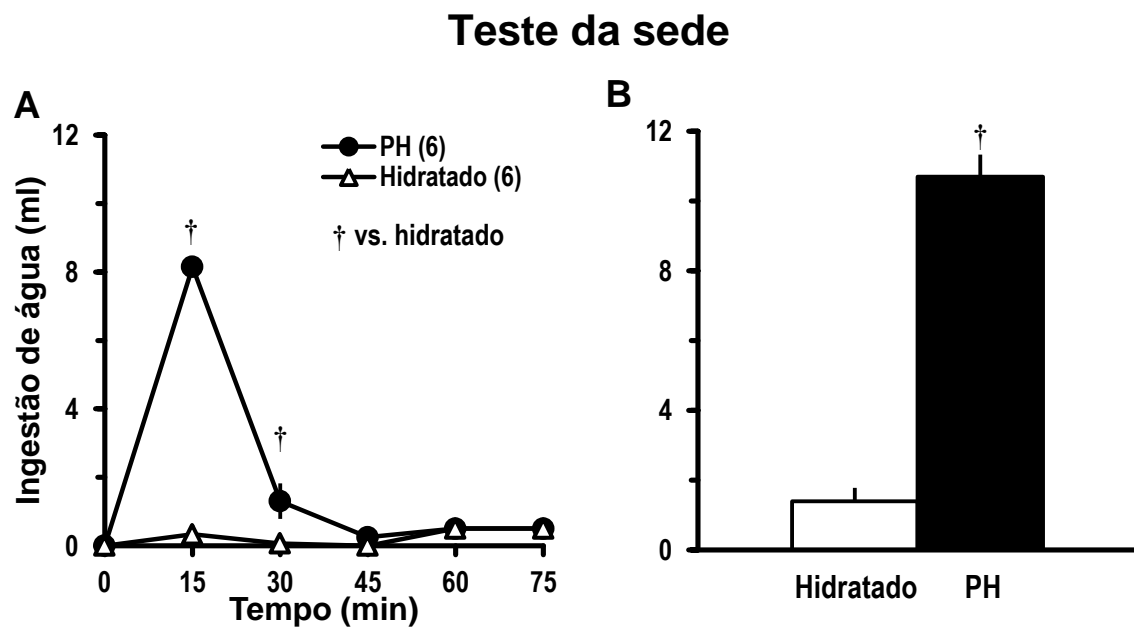
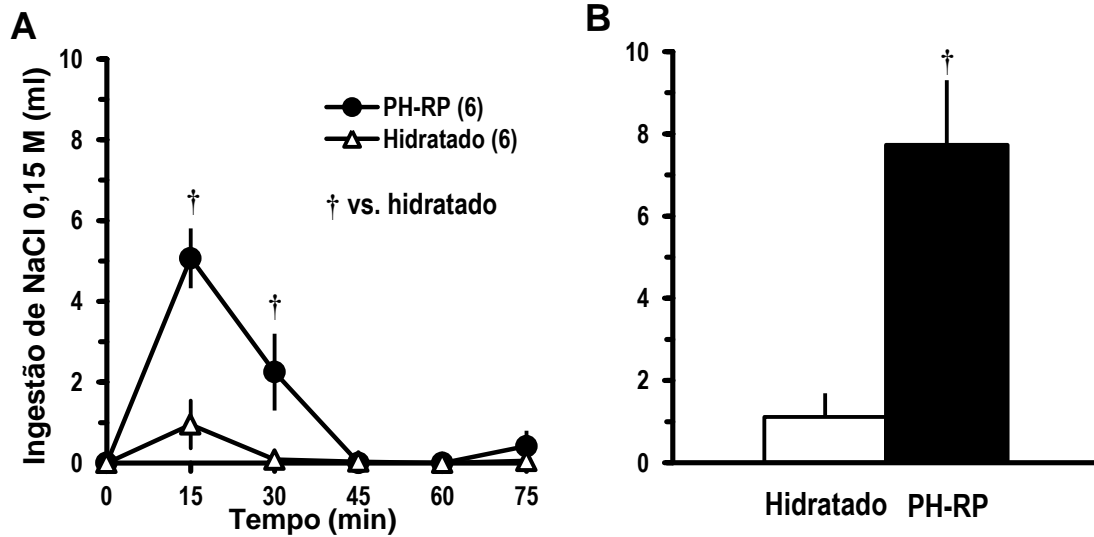


Figura 18. Teste da sede correspondente a um ciclo de PH-RP. Ingestão de água não cumulativa (A) e total ao final do teste da sede (B) de animais privados de água por 18 h (PH; círculos/barras pretas) ou hidratados (triângulos/barras brancas). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.

Teste do apetite ao sódio

Ingestão de NaCl 0,15 M



Ingestão de água

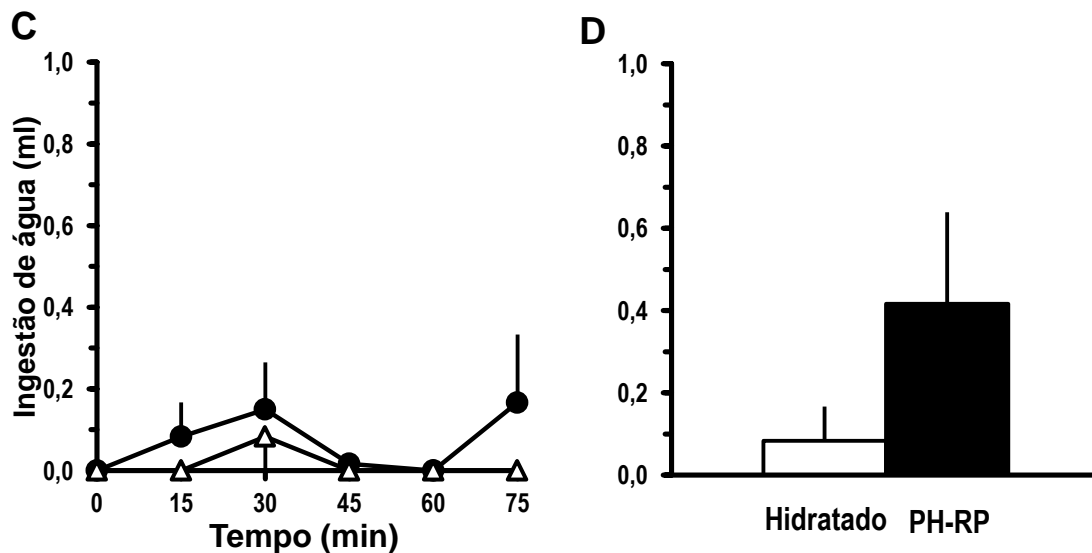


Figura 19. Teste do apetite ao sódio correspondente a um ciclo de PH-RP. Ingestão não cumulativa de NaCl 0,15 M (A) e água (C) e total ao final do teste do apetite ao sódio (B e D) de animais privados de água por 18 h e parcialmente reidratados no teste da sede da Figura 11 (PH-RP; círculos/barras pretas) ou hidratados (triângulos/barras brancas). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.

4.6.2 Ingestão de água e NaCl 0,15 M nos testes de sede e apetite ao sódio intercalados com AEHL

Dos 14 animais inicialmente designados para este experimento, 3 foram excluídos dos seus respectivos grupos experimentais por não cumprirem os critérios para a fase de treinamento ou experimental.

No teste da sede o grupo privado ingeriu mais água do que o grupo hidratado [$t(10) = 16,2$, $p < 0,05$; Tabela 6].

No teste de apetite ao sódio, o grupo privado e reidratado parcialmente ingeriu mais NaCl 0,15 M [$t(10) = 2,9$, $p < 0,05$] e mais água [$t(10) = 6,4$, $p < 0,05$] do que o grupo hidratado (Tabela 6).

Tabela 6. Ingestão (ml/30 min) de água e sódio nos testes da sede e do apetite ao sódio (protocolo PH-RP) intercalados a sessões de AEHL.

Grupo	Sede	Apetite ao sódio	
		NaCl 0,15 M	Água
Hidratado	0,2 ± 0,2	0,1 ± 0,1	0,1 ± 0,1
PH/PH-RP	8,6 ± 1,5 [†]	6,8 ± 1,0 [†]	1,2 ± 0,5 [†]

Valores representados pela média ± erro padrão da média. PH: privação hídrica de 18 h; PH-RP: reidratação parcial; [†] vs. hidratado. Grupo PH e PH-RP compostos dos mesmos animais.

4.6.3 Autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral (AEHL) intercalada pelos testes de sede e apetite ao sódio do protocolo PH-RP.

A ICP50 não foi alterada pela privação hídrica (PH) [$F(3, 30) = 1,6$, $p > 0,05$; Figura 20A, B], ingestão de água durante teste da sede (PH-RP) [$F(3, 30) = 0,7$, $p > 0,05$; Figura 21A, B] e ingestão de líquidos durante o teste do apetite ao sódio (PH-RPS) [$F(3, 30) = 0,1$, $p > 0,05$; Figura 22A, B], em comparação ao basal e ao grupo hidratado (controle). A RMPmax não foi alterada pela privação hídrica (PH) [$F(3, 30) = 0,4$, $p > 0,05$; Figura 20C], ingestão de água durante teste da sede (PH-RP) [$F(3, 30) = 0,7$, $p > 0,05$; Figura 21C] e ingestão de líquidos durante o teste do apetite ao sódio (PH-RPS) [$F(3, 30) = 2,7$, $p > 0,05$; Figura 22C], em comparação ao basal e ao grupo hidratado (controle).

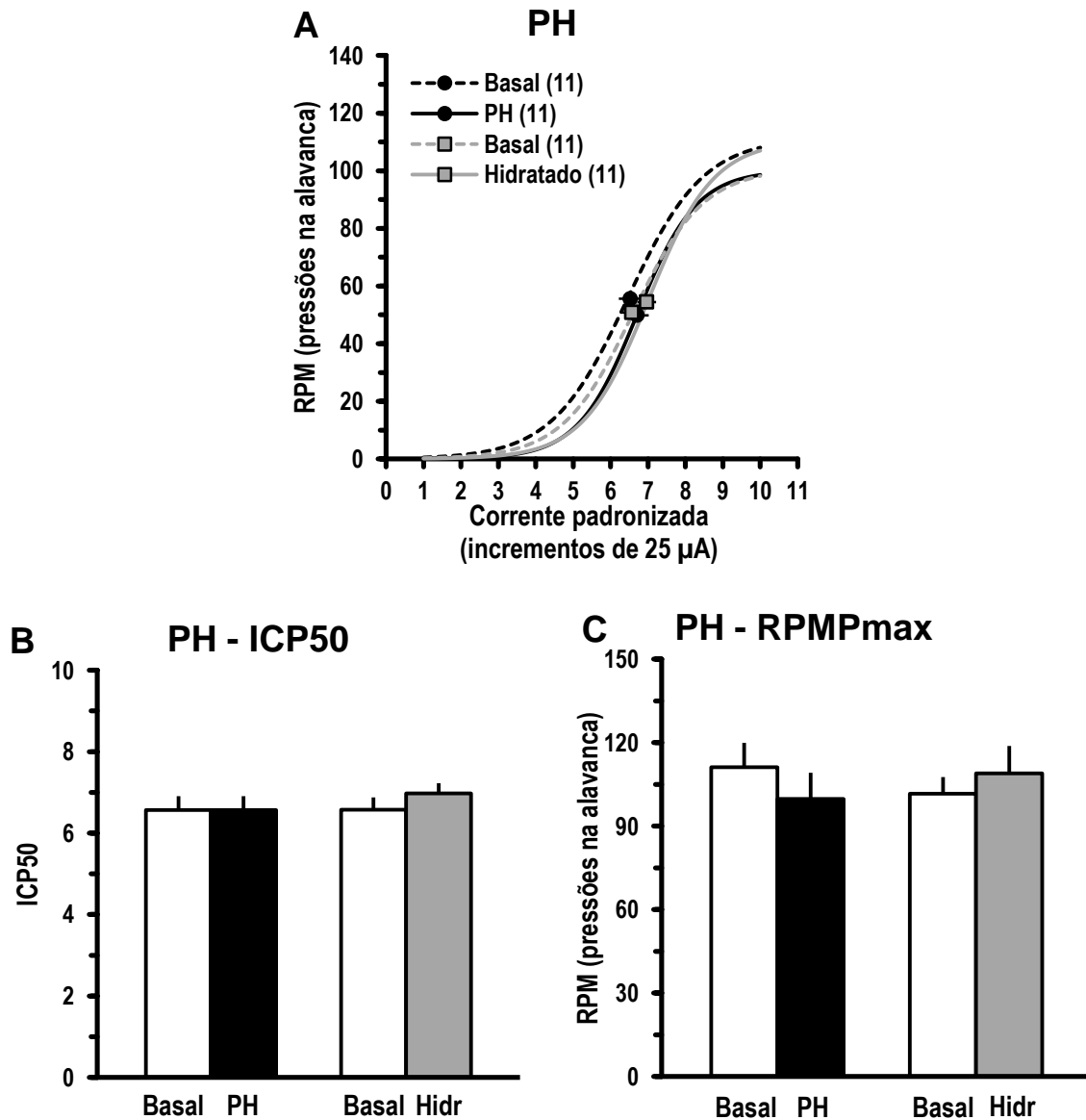


Figura 20. Autoestimulação elétrica no hipotálamo lateral ao final de um período de privação hídrica por animais privados (PH) ou hidratados (Hidr): curva corrente-resposta (A), intensidade de corrente padronizada equivalente a 50% da resposta máxima por min., ICP50 (B), resposta máxima padronizada por min., RPMPmax (C). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses.

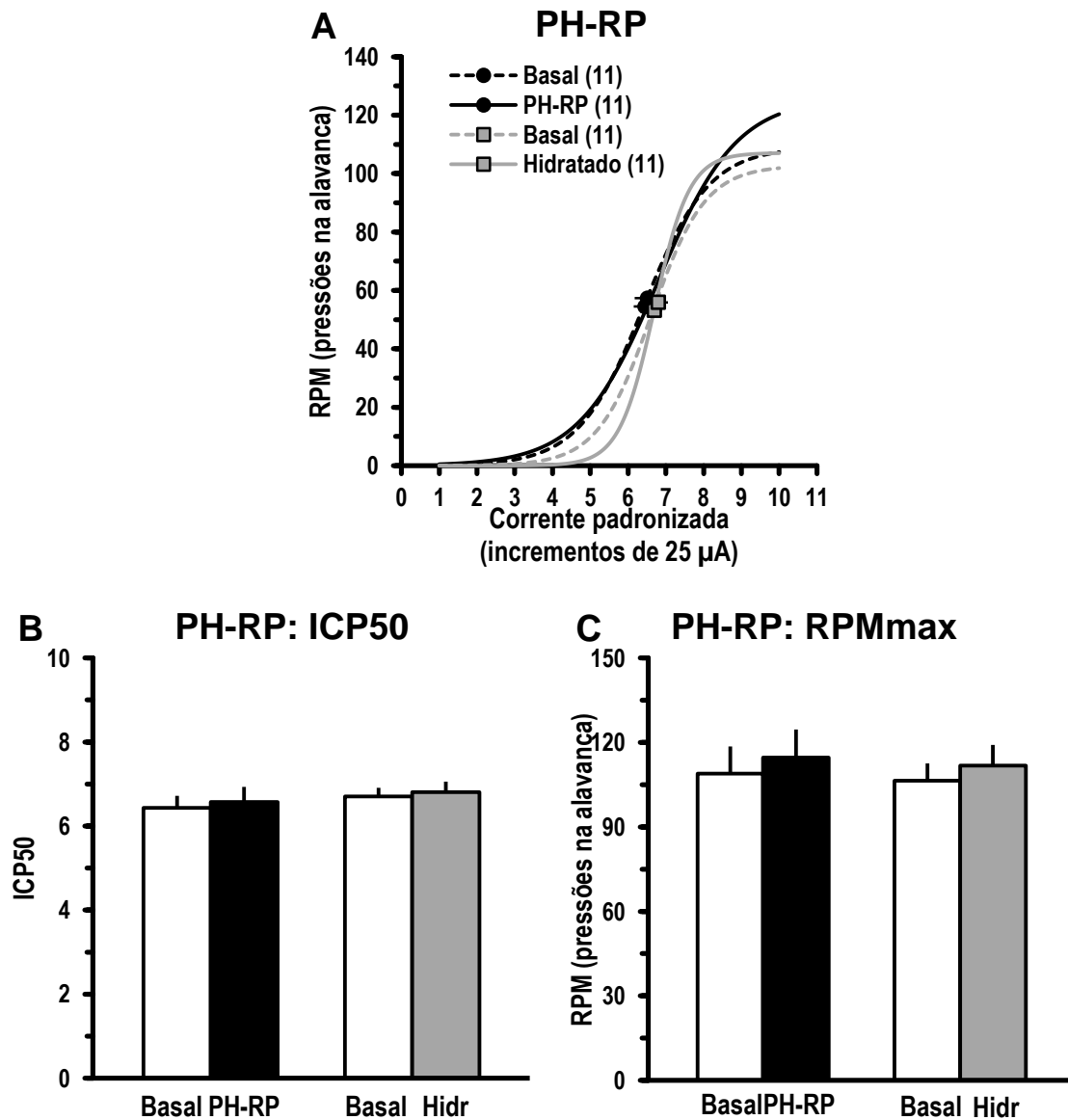


Figura 21. Autoestimulação elétrica no hipotálamo lateral ao final de um período de privação hídrica seguida de reidratação parcial no teste da sede por animais privados e parcialmente reidratados (PH-RP) ou hidratados (Hidr): curva corrente-resposta (A), intensidade de corrente padronizada equivalente a 50% da resposta máxima por min., ICP50 (B), resposta máxima padronizada por min., RPMmax (C). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses. Mesmos animais da Figura 20.

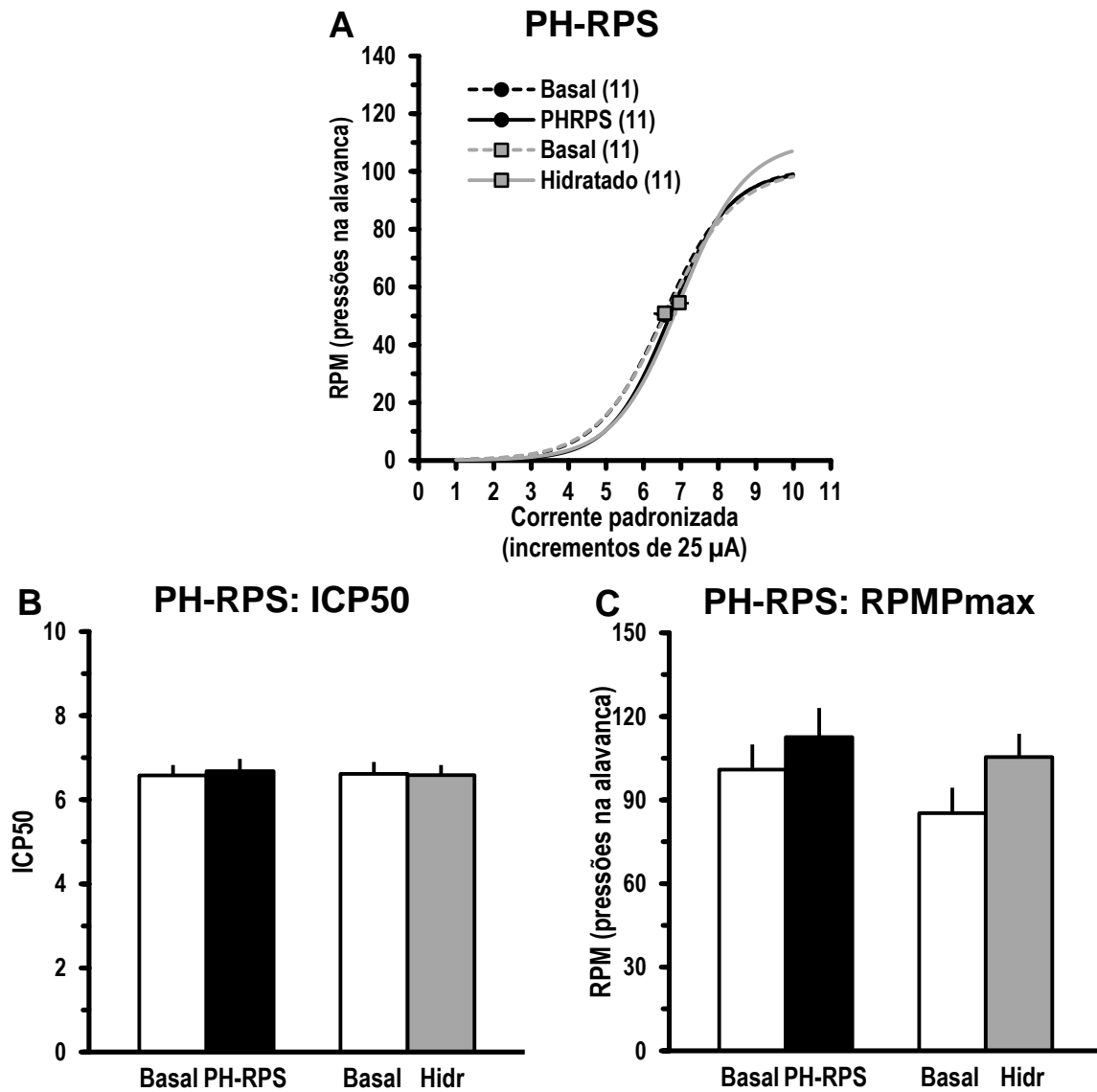


Figura 22. Autoestimulação elétrica no hipotálamo lateral ao final do teste do apetite ao sódio por animais PH-RP que desenvolvem apetite ao sódio (RPS) ou hidratados (Hidr): curva corrente-resposta (A), intensidade de corrente padronizada equivalente a 50% da resposta máxima por min., ICP50 (B), resposta máxima padronizada por min., RPMPmax (C). O número de animais de cada grupo está descrito entre parênteses. Mesmos animais das Figs. 20 e 21.

4.6.4 Autoestimulação elétrica do hipotálamo lateral após desidratação celular

Dos 16 animais inicialmente designados para este experimento, 6 foram excluídos dos seus respectivos grupos experimentais por não cumprirem os critérios para a fase de treinamento ou experimental.

Não houve diferença na ICP50 [$F(3, 27) = 1,3, p > 0,05$] e na RPMPmax [$F(3, 27) = 1,1, p > 0,05$] entre os grupos desidratado e controle (hidratado e seus respectivos períodos basais). Os resultados obtidos estão representados na tabela 7.

Tabela 7. Intensidade de corrente padronizada equivalente a 50% da resposta máxima por min. (ICP50) e resposta por min. máxima padronizada (RPMPmax) de ratos com desidratação celular operando AEHL na condição basal ou em resposta a gavagem de água (Hidratado) ou de NaCl 2 M (Desidratado)

Grupo	AEHL	
	ICP50	RPMPmax.
Basal	5,6 ± 0,4	105 ± 11
Hidratado	5,3 ± 0,4	100 ± 14
Basal	5,5 ± 0,3	93 ± 12
Desidratado	5,8 ± 0,5	94 ± 13

Valores representados pela média ± erro padrão da média. N = 10.

5 DISCUSSÃO

5.1 Inibição serotoninérgica do NPBL nas fases apetitiva e consumatória da ingestão de sódio paradoxal

Os estudos de imuno-histoquímica apresentados nesta tese foram realizados para investigar o efeito do bloqueio serotoninérgico do NPBL, na fase apetitiva da desidratação, sobre a atividade celular de núcleos envolvidos no controle da ingestão hidromineral. Os presentes resultados mostram que a metisergida injetada no NPBL promoveu, no tronco encefálico, um aumento da ir-Fos na AP e no NTS intermediário adjacente, além de uma tendência (não significante) de aumento na porção caudal do NTS, sem alterar a ativação do NMDV. A AP é circumventricular, livre de barreira hematoencefálica e sua atividade está relacionada à osmorrecepção, assim como a do NTS adjacente a ela⁶⁵. Da mesma forma que o NPBL e o PVN, a AP também é considerada, uma área inibidora do apetite ao sódio; ela está conectada a ambos os núcleos^{66,113,122,123} e sua ablação potencializa a ingestão salina^{70,161-163}. O aumento da atividade celular da AP e do NTS adjacente após a reidratação da PH-RP, fase a qual o apetite ao sódio está desinibido, foi observado em três linhagens de animais em estudos prévios do nosso laboratório¹⁴⁰, e por Dalmaso et al. (resultados não publicados). Coincidentemente, a ativação de células da AP observada nos presentes resultados ocorre na fase apetitiva da ingestão paradoxal de sódio o que sugere uma possível participação do NTS/AP na facilitação da ingestão de sódio. É possível também que a metisergida no NPBL aumente a resposta da AP ao estímulo osmótico, favorecendo o componente facilitador da hiperosmolaridade plasmática que, associado à desativação do mecanismo inibidor do próprio NPBL, induza ingestão de sódio. O NTS, por sua vez, possui uma população neuronal sensível à aldosterona e facilitadora da ingestão de sódio¹⁶⁴, que poderia estar envolvida também na ingestão de sódio paradoxal. De uma maneira geral, os presentes resultados associados à literatura sugerem que o eixo formado entre NTS/AP e o NPBL não seja exclusivamente inibidor da ingestão de sódio^{134,164}, embora a ablação desta região facilite a ingestão de sódio, como descrito acima. Estudos adicionais são necessários para a melhor compreensão sobre os subtipos neuronais ativados no NTS/AP, bem como a importância desta ativação durante a fase de expressão do apetite ao sódio.

O NTS e a AP são áreas também envolvidas no processamento da informação aferente proveniente do trato gastrointestinal e da modulação da resposta motora do NMDV

que, por sua vez, modula a taxa de esvaziamento gástrico¹¹¹. A redução da taxa do esvaziamento gástrico faz parte de um mecanismo inibidor da ingestão hidromineral em ratos desidratados, atuante desde a fase anterior à absorção (pré-sistêmica) da ingestão de NaCl e água^{50,56,107,108}. Considerando a participação do eixo formado por NTS/AP e NPBL na modulação do apetite ao sódio, este eixo poderia modular também a atividade triângulo entre NTS-AP-NMDV e, conseqüentemente, a atividade motora gastrointestinal que determina taxa de esvaziamento gástrico. Todavia, os resultados obtidos não confirmam a hipótese da modulação do NPBL sobre o controle motor gástrico, tomando como parâmetro a ausência de efeito da metisergida sobre a ir-Fos do NMDV. Além dos estudos imuno-histoquímicos durante a fase apetitiva, também foi avaliada a importância do NPBL para o mecanismo de controle do esvaziamento gástrico na fase consumatória da ingestão de sódio. Um pequeno volume de sódio ingerido em animais com desidratação intracelular poderia ativar mecanismos rápidos de saciedade dependentes da liberação de serotonina no NPBL, que operariam reduzindo a taxa de esvaziamento gástrico, e conseqüentemente reduzindo a ingestão de NaCl hipertônico.

No teste inicial de ingestão hidromineral, a injeção de metisergida no NPBL de ratos com desidratação intracelular, desta vez produzida por infusão iv de NaCl 2 M, induziu um aumento de 5 vezes na ingestão de NaCl 0,3 M logo nos primeiros 15 min., período coincidente ao surgimento da saciedade rápida^{56,107,108}. Esta é a primeira demonstração de ingestão paradoxal de NaCl 0,3 M induzido pelo aumento da osmolaridade plasmática por via endovenosa associada à desativação do NPBL, já que o modelo de desidratação celular usualmente utilizado em nosso laboratório é a gavagem hipertônica.

Nos mesmos animais que participaram do teste de ingestão hidromineral, novamente desidratados, a injeção de metisergida no NPBL, precedente a uma distensão gástrica hipertônica via gavagem, não alterou nenhum dos parâmetros gastrintestinais avaliados: conteúdo líquido estomacal, intestinal e distância percorrida pelo líquido infundido em relação ao tratamento controle. Este resultado sugere que a taxa de esvaziamento gástrico não foi modificada pela metisergida na fase pré-sistêmica da ingestão de sódio paradoxal, ao contrário da expectativa de aumento considerando a hipótese de trabalho. Os dados obtidos estão de acordo com os resultados imuno-histoquímicos pré-ingestivos, e sugerem que a ingestão paradoxal de sódio ocorre independentemente de uma modificação dos mecanismos que modulam a o esvaziamento gástrico. Apesar de não ter sido realizada imuno-histoquímica

após a ingestão de sódio, os resultados funcionais de esvaziamento gástrico não sugerem que a atividade do NMDV seria modificada pela metisergida no NPBL.

O método de avaliação do esvaziamento gástrico, validado em estudo prévio envolvendo avaliação do conteúdo gástrico hipertônico na sepse em nosso laboratório¹⁵⁹, permitiu verificar em um grupo adicional de ratos hiperosmóticos maior conteúdo líquido estomacal hipertônico em relação ao isotônico e menor segmento intestinal marcado com líquido hipertônico. Esta demonstração da redução da taxa esvaziamento gástrico do conteúdo hipertônico em relação ao isotônico se assemelha à redução observada em animais hipovolêmicos com acesso livre à ingestão de NaCl hipertônico ou isotônico¹⁰⁷.

Paralelamente aos mecanismos inibidores do tronco encefálico, o sistema ocitocinérgico hipotalâmico também tem sido descrito como inibidor do apetite ao sódio. Por isso, foi investigada a influência do bloqueio serotoninérgico no NPBL sobre a atividade ocitocinérgica hipotalâmica, medida pela expressão de ir-Fos em células ocitocinérgicas no PVN e no SON, e pela dosagem da concentração plasmática de ocitocina. A ocitocina plasmática é um importante agente natriurético de ação renal e está envolvida no aumento dos níveis de ANP, não inibindo propriamente o apetite ao sódio, mas considerada um marcador da atividade ocitocinérgica antinatriorexigênica central, presente tanto na hipovolemia como na hiperosmolaridade plasmática^{45,48,54,55}. Estudos recentes demonstraram que a injeção de moxonidina no NPBL de ratos com desidratação celular, além de ser um potente facilitador da ingestão de sódio, reduz os níveis plasmáticos de ocitocina e vasopressina, assim como a diurese e a natriurese⁹³. Resultados similares foram obtidos com a injeção de metisergida no NPBL de ratos submetidos ao protocolo de expansão isotônica de volume, reforçando a participação do NPBL no mecanismo de defesa contra a hipervolemia⁸⁷. Desta forma, hipótese testada previa que a metisergida no NPBL também iria reduzir a ativação de neurônios ocitocinérgicos no PVN e no SON de ratos com desidratação celular e, conseqüentemente, a concentração plasmática de ocitocina, bem como a ativação de neurônios ocitocinérgicos hipotalâmicos.

Todavia, os resultados obtidos não confirmaram a hipótese inicial a respeito da modulação do NPBL sobre o mecanismo ocitocinérgico hipotalâmico. Os experimentos realizados não demonstraram diferença nas concentrações plasmáticas de ocitocina e vasopressina entre os grupos de animais hiperosmóticos tratados com metisergida ou veículo no NPBL. Em concordância com paralelismo entre a ocitocina plasmática e central, foi notada ausência de efeito da metisergida no NPBL sobre a ativação de neurônios ocitocinérgicos nas

três sub-regiões do PVN estudadas (PVNm, PVNp e PVNv) e do SON, realizadas em um grupo de animais diferente daqueles utilizados para análise hormonal. É possível que o bloqueio serotoninérgico realizado nestes experimentos seja menos efetivo que o agonismo adrenérgico/imidazólico no NPBL para a desativação do mecanismo antinatriorexigênico, considerando que durante a hiperosmolaridade plasmática animais tratados com moxonidina ingerem em torno de 19 ml de NaCl 0,3 M/2 h⁵³, enquanto no presente estudo os animais selecionados em triagem ingeriram aproximadamente a 60% deste volume. Talvez a ausência de efeito do bloqueio serotoninérgico sobre os hormônios hipotalâmicos justifique esta evidente diferença na intensidade da ingestão de sódio hipertônico produzida por ambos os tratamentos. Também não houve diferença entre os tratamentos na ir-Fos de células não ocitocinérgicas no PVNp, assim como no PVNm e no SON, sendo as projeções destas duas últimas regiões encefálicas direcionadas em sua maioria para a neuro-hipófise¹⁶⁵, coerente com tal ausência de efeito da metisergida sobre os níveis plasmáticos de vasopressina, apesar da identificação fenotípica destes neurônios não ter sido realizada. Em suma, os presentes resultados e trabalhos prévios conjuntamente sugerem que a supressão do mecanismo ocitocinérgico hipotalâmico, considerado antinatriorexigênico^{55,166}, pode ocorrer ou não de acordo com o tipo de desativação promovida no NPBL, mas a natriorexigênese não depende necessariamente da redução do tônus ocitocinérgico central.

O efeito da metisergida no NPBL potencializando a ir-Fos no PVNv pode ter relação com o aumento da ativação no NTS/AP. Neurônios do PVNv e de porções mais caudais do PVN projetam-se para uma série de áreas posteriores do encéfalo, incluindo o NTS, a AP, o complexo parabraquial, além regiões pré-ganglionares autonômicas como o NMDV¹⁶⁵. A maior ativação do PVNv pela metisergida em ratos hiperosmóticos também ocorre na fase de reidratação parcial do protocolo PH-RP, a exemplo do NTS/AP discutido acima (Dalmaso et al., resultados não publicados). Talvez a desativação do mecanismo antinatriorexigênico do NPBL possa aumentar a atividade celular do PVNv e do NTS/AP através de suas conexões com o próprio NPBL ou ainda via amígdala/BNST, já que a amígdala parece exercer um controle centrífugo sobre áreas que a supre de informações gustatórias ou humorais^{167,168}. Como exemplo desta forma de controle, a lesão do CEA aumenta a ir-Fos no núcleo parabraquial medial, também envolvido no processamento do sistema gustatório¹²⁸. É possível que o mecanismo antinatriorexigênico do NPBL opere inibindo a atividade da amígdala, a qual, por sua vez, deixaria de modular a atividade de áreas

tronculares responsáveis pelo processamento de sinais osmorreceptivos, volemia, mineralocorticoides e palatabilidade ao sal, favorecendo a ingestão de NaCl.

Tanto a integridade SFO como a do OVLT é necessária para a ingestão de água e liberação de vasopressina em animais hiperosmóticos¹⁶⁹⁻¹⁷¹. O OVLT é uma área da lâmina terminal que possui atividade osmorreceptora intrínseca e cuja atividade neural depende diretamente da intensidade do estímulo osmótico¹³. No presente estudo, a atividade do OVLT não foi modificada pelo bloqueio serotoninérgico no NPBL, sugerindo que nem as conexões do NPBL via MnPO, nem o suposto controle centrífugo da amígdala parecem modular a atividade do OVLT. De um modo geral, a ativação do SFO observada é aparentemente muito inferior àquela promovida pelo protocolo PH-RP ou infusão iv de NaCl hipertônico encontrada na literatura^{140,172}, portanto, não é possível afirmar que o aumento da ir-Fos no SFO entre grupos tratados com metisergida ou veículo possua algum significado fisiológico para o controle da ingestão de sódio ou tecer qualquer comentário adicional sobre o resultado.

A ir-Fos no NAC não foi alterada pela metisergida no NPBL, assim como não foi alterada também a neurotransmissão dopaminérgica, marcadora de recompensa para estímulos gustatórios^{29,173}, nem a serotoninérgica, também envolvida na modulação da recompensa¹³⁵. Sendo o accumbens uma área envolvida na modulação do sistema de dopaminérgico de recompensa, os resultados sugerem que o mecanismo serotoninérgico do NPBL não modula a atividade do NAC, ao menos na fase apetitiva da ingestão de sódio paradoxal. Entretanto, o NPBL poderia participar da modulação do sistema de recompensa na fase consumatória da ingestão de sódio, possibilidade não testada nos presentes experimentos. Testes de reatividade gustatória em animais hipovolêmicos mostraram que a injeção de moxonidina no NPBL aumenta as respostas positivas (hedônicas) e reduz as negativas (aversivas) somente após a ingestão de sódio, sugerindo um papel modulador do NPBL sobre a recompensa ao sabor salgado¹⁷⁴. Talvez o mesmo ocorra na desidratação celular.

Na amígdala houve um aumento da concentração tecidual de dopamina, porém sem modificação na concentração tecidual de seus metabólitos, assim como não houve modificação da neurotransmissão serotoninérgica. Estes resultados sugerem uma modulação dopaminérgica na amígdala na fase pré-ingestiva da ingestão paradoxal de sódio, ainda que os níveis de DOPAC e HVA, semelhantes entre os tratamentos, encontrados não confirmem a liberação efetiva deste neurotransmissor. Neurônios dopaminérgicos provenientes da VTA projetam-se para áreas do sistema límbico, como o NAC e a amígdala¹³³. Ainda, neurônios do complexo parabraquial sensíveis à serotonina projetam-se para a VTA¹³², talvez com o papel

de inibir o tônus dopaminérgico na amígdala, logo a metisergida no NPBL reverteria esta inibição. Dado que a integridade da amígdala é necessária para a atuação do mecanismo inibidor do parabraquial sobre o apetite ao sódio^{129,175}, é possível que o NPBL também module a atividade da amígdala de forma indireta, via neurônios dopaminérgicos da VTA. Os resultados sugerem que a neurotransmissão dopaminérgica na amígdala possa ter alguma importância para a ingestão paradoxal de sódio.

5.2 Seletividade do NPBL à ingestão de NaCl

Estudos de ingestão hidromineral têm sido realizados em testes de bebedouro único, e testes de preferência, envolvendo dois ou mais bebedouros, geralmente com diferentes líquidos disponíveis. Muito úteis na investigação da preferência mineral durante a desidratação, os testes com múltiplos bebedouros podem apresentar uma maior ingestão total em relação ao bebedouro único^{91,92}. Ainda, a ingestão de um líquido pode influenciar a do outro, por exemplo, a ingestão de sódio pode aumentar a ingestão de água devido à ativação osmótica. Por outro lado, uma clara desvantagem do oferecimento de apenas um bebedouro é a ingestão de solução com baixa palatabilidade ou alta aversividade, a qual pode ocorrer em animais desidratados, quando esta é única fonte de água disponível^{92,176}.

A preferência ao sódio é dependente da natureza do sal e da concentração oferecida, e pode variar de acordo com a linhagem do rato. Para o NaCl, as concentrações próximas a isotonicidade normalmente são preferidas por ratos Sprague-Dawley, Long-Evans, Wistar, sendo que tal preferência é decrescente tanto para as soluções hipertônicas, como também para soluções hipotônicas. Desta forma, a curva de preferência ao NaCl em função da concentração assume o formato relativamente similar à letra “U” em posição invertida, conforme descrito em estudos prévios da literatura^{88,89,177}. Situações de hipovolemia provocam um deslocamento vertical da curva de preferência ao NaCl, ou seja, o pico de ingestão continua coincidindo com a isotonicidade, todavia o volume ingerido é maior⁸⁹. O pico de ingestão de solução contendo NaCl apresentado por ratos Holtzman em nosso laboratório, com apetite ao sódio induzido pelo protocolo furo/cap, situa-se entre 0,08 e 0,15 M (David et al., resultados não publicados). Aparentemente, ratos espontaneamente hipertensos apresentam uma curva de preferência deslocada à direita, com a concentração preferida pertencendo ao lado hipertônico da curva¹⁷⁷. Todavia, não há nenhum relato na literatura de curva de preferência ao NaCl em animais com apenas com desidratação

intracelular, ou seja, não se conhece a concentração preferida de NaCl neste tipo de desidratação.

A ativação celular no DRN (ir-Fos) após a ingestão de NaCl hipertônico ou isotônico induzida por hipovolemia, enquanto o NPBL aparentemente é responsivo apenas à ingestão de salina hipertônica, sugere funções diferentes para ambos os núcleos envolvidos no eixo serotoninérgico antinatriorexigênico: enquanto o DRN pode estar envolvido inespecificamente à saciedade da ingestão de sal, o NPBL inibiria especificamente sobre a ingestão de NaCl hipertônico⁷³. Corrobora esta hipótese o estudo prévio realizado no nosso laboratório, foi demonstrada uma potencialização da ingestão de NaCl hipertônico pela hipovolemia após metisergida no NPBL, porém este mesmo tratamento não promoveu qualquer alteração na ingestão de NaCl isotônico quando os mesmos ratos foram testados novamente⁷⁹. Baseado nestes estudos, foi testado se o bloqueio serotoninérgico no NPBL também potencializaria seletivamente a ingestão de NaCl hipertônico em ratos com desidratação celular.

Nos testes de ingestão mineral com dois bebedouros realizados para a triagem dos animais submetidos à desidratação celular, a metisergida promoveu um aumento de 4-5 vezes na ingestão de NaCl hipertônico, sem alterar a ingestão de água. Assim, considerando a ingestão de ambos os líquidos ao final do experimento, uma mistura praticamente isotônica foi obtida quando os animais foram tratados com metisergida (aproximadamente metade da ingestão total corresponde ao NaCl 0,3 M), contrastando com a ingestão hipotônica nos animais hiperosmóticos após o tratamento controle.

Nos testes de preferência entre água e NaCl isotônico, a hipótese de que o mecanismo inibidor do NPBL seria seletivo para a ingestão de NaCl hipertônico não foi confirmada, pois a ingestão de NaCl 0,15 M também foi potencializada pela metisergida em teste de dois bebedouros. Os resultados obtidos em testes de bebedouro único foram similares aos resultados obtidos nos testes com dois bebedouros, ou seja, a ingestão de NaCl hipertônico ou isotônico foi potencializada pela metisergida, mas não a de água. A única exceção foi a ingestão de NaCl hipertônico do grupo controle, porém esperada se considerarmos que o animal estava desidratado e não possuía outra fonte hídrica além da solução de NaCl, estando então o consumo de NaCl hipertônico de acordo com a ingestão não seletiva na ausência de água relatada na literatura^{92,176}. Desta forma, tal ingestão de NaCl hipertônico o que não deve ser interpretado como expressão da ingestão paradoxal de sódio.

Notadamente a serotonina no NPBL é capaz de inibir a ingestão de NaCl hipertônico e de isotônico durante a desidratação intracelular, reduzindo o valor hedônico do NaCl isotônico, o qual talvez sofra pouca ou nenhuma inibição em animais hidratados ou hipovolêmicos. Este resultado ainda é consistente com o papel protetor do NPBL contra a hiperosmolaridade plasmática, pois durante a desidratação celular a ingestão de água seria a mais adequada para restaurar a homeostase, mas os animais ainda assim ingerem sódio. Esta ingestão “indevida” de sódio talvez seja decorrente da alta palatabilidade do NaCl isotônico, ou de alguma forma de apetite mineral relativamente inespecífico²⁵. Vale ressaltar que mesmo soluções hipertônicas consideradas “aversivas” são consumidas de forma voluntária diariamente por ratos, ainda que em volume muito reduzido (vide exemplo da Figura 17A). Não é possível afirmar com certeza qual tipo de alteração na curva de preferência ao NaCl ocorreu após o tratamento com metisergida no NPBL de ratos hiperosmóticos, mas os resultados obtidos em teste com um bebedouro sugerem que a solução de NaCl hipertônico apresenta o mesmo grau de palatabilidade da solução isotônica.

Considerando que o esvaziamento gástrico para o NaCl hipertônico é mais lento em relação ao NaCl isotônico em animais hiperosmóticos, conforme demonstrado no presente resultado, a ingestão de NaCl isotônico em volume aproximadamente semelhante ao de solução hipertônica após tratamento com metisergida, nos testes de bebedouro único, constitui uma evidência adicional de que o mecanismo de esvaziamento gástrico não é o fator limitante para a expressão da ingestão paradoxal de NaCl. Caso fosse, animais deveriam ingerir maior volume de NaCl isotônico, já que os presentes resultados sugerem que a serotonina no NPBL não participa do controle gástrico em ratos hiperosmóticos.

Em suma, os presentes resultados também demonstram que, ao contrário do animal hipovolêmico, o NPBL não inibe seletivamente a ingestão de NaCl hipertônico no animal com desidratação celular. Sendo o NPBL um integrador de aferências viscerais gustatórias e osmorreceptivas, a serotonina liberada nesta área poderia fazer parte de um mecanismo redutor do valor hedônico do sabor salgado, com ação preferencial ao lado hipertônico da curva de preferência ao NaCl durante desidratação extracelular⁷⁹ e uma ação mais ampla durante a desidratação intracelular. Se isto for verdade, o bloqueio serotoninérgico poderia potencializar também a ingestão de NaCl hipotônico, porém experimentos adicionais seriam necessários para testar esta hipótese. Os presentes resultados indicam que o NPBL não inibe seletivamente a ingestão de NaCl hipertônico, mas também não descartam a proposição

do NPBL como um protetor contra o consumo excessivo e inapropriado de sódio, defendendo o organismo contra hiperosmolaridade e hipervolemia.

5.3 Injeções repetidas de muscimol no NPBL e sensibilização da ingestão de NaCl hipertônico

Os experimentos realizados nesta tese confirmaram as previsões que, em ratos hidratados, injeções sucessivas de muscimol no NPBL sensibilizariam a resposta natriorexigênica deste tratamento. A sensibilização da ingestão de sódio foi demonstrada pela primeira vez por Falk, na década de 60, em animais hipovolêmicos¹⁷⁸. Desde então, diversos laboratórios tem reproduzido experimentalmente este fenômeno utilizando modelos de natriorexigênese dependente de angiotensina II^{38,40,41}. O presente resultado é a primeira demonstração de sensibilização de ingestão de sódio pela desativação repetida de um mecanismo antinatriorexigênico, em animais hidratados, nos quais supostamente não foram ativados mecanismos facilitadores da ingestão de sódio. Os detalhes do mecanismo envolvido neste fenômeno ainda precisam ser investigados.

Todavia, ainda é possível que a angiotensina II também participe da sensibilização por desativação do NPBL. Recentes estudos realizados em nosso laboratório demonstraram que o efeito natriorexigênico do muscimol em ratos hidratados depende da ativação de receptores AT₁ centrais¹⁰¹, assim como da integridade no CEA¹²⁹. É possível que o muscimol remova uma inibição tônica do NPBL sobre a amígdala, amplificando o sinal facilitador proveniente de áreas circunventriculares sensíveis à angiotensina II. O histórico de inibições do NPBL poderia ativar mecanismos de plasticidade do eixo NPBL-amígdala, liberando o apetite ao sódio com maior intensidade em comparação à primeira desativação.

Animais sensibilizados possuem alterações morfológicas e funcionais em áreas encefálicas do sistema de recompensa, tornando-os indivíduos mais aptos à reidratação em caso de desidratação futura, uma considerável vantagem evolutiva em ambiente terrestre onde a abundância de água e sódio não é regra¹³⁶. Ainda, a sensibilização induzida por desidratações parece compartilhar sistema com a sensibilização a drogas de abuso, pois o efeito destas é potencializado em animais sensibilizados, assim como reciprocamente o histórico de administração de tais substâncias potencializa o apetite ao sódio^{44,179,180}. A desativação do NPBL pelo baclofeno, além de induzir ingestão de água e sódio, aumenta a ingestão de solução palatável de sacarose¹⁰⁰. Não se conhece alguma interação entre a

desativação repetida do NPBL e a atividade de áreas encefálicas relacionadas à recompensa, ou ainda sobre o efeito de drogas de abuso.

5.4 Testes da sede e do apetite ao sódio intercalados com AEHL

Os experimentos demonstraram que o protocolo PH-RP, constituído por 18 h de privação hídrica, promove sede e apetite ao sódio em ratos Sprague-Dawley, dissociáveis pelo acesso inicial à água e posterior ao NaCl isotônico, à semelhança de resultados prévios do nosso laboratório utilizando ratos Holtzman e um período maior de privação¹³⁷.

Nos experimentos envolvendo AEHL intercalada à ingestão a PH e a desidratação celular não causaram anedonia. Durante a fase em que mecanismos inibidores da ingestão de sódio estão ativados, como após a privação hídrica ou gavagem de NaCl 2 M, a AEHL não foi alterada. Após desinibição do apetite ao sódio da PH pela ingestão de NaCl, também não houve alteração da AEHL. A saciedade plena também não alterou a AEHL, assim como a ingestão de água e sódio não foi afetada pelos testes de AEHL. Os resultados indicam também que o protocolo PHRP utilizado não produziu qualquer comprometimento do desempenho do animal em operar a alavanca, pois a RPM máxima também não foi reduzida em nenhuma das etapas do protocolo. Em estudo paralelo, a ativação do NAC pela sequência do protocolo de PH (36 h) e reidratação parcial, medida por ir-Fos, foi parcialmente revertida após reidratação plena, sugerindo que o sistema de recompensa ligado à ingestão hidromineral é ativado na PH-RP, e a desativação do NAC pode ser um marcador de saciedade (Dalmasso e cols. resultados não publicados). Todavia, os resultados obtidos não confirmam a modificação do mecanismo de recompensa ao estímulo no HL em nenhuma das fases do ciclo PH-RP. Como foi demonstrado na literatura que a hipovolemia reduz o valor hedônico do estímulo elétrico 48 h após o início da desidratação, os resultados sugerem que a desidratação aguda, seja intracelular específica ou dupla, não alteram a recompensa associada à AEHL, ou seja, não modificam o estado hedônico do animal.

Apesar de a AEHL ser considerada um marcador da atividade do sistema de recompensa¹⁴²⁻¹⁴⁴, os dados obtidos sugerem que mecanismos de recompensa essencialmente independentes foram ativados na fase aguda da desidratação e pela AEHL. Estes resultados contrastam com a redução da AEHL (anedonia) em animais com hipovolemia crônica não resolvida, os quais demonstram alguma sobreposição de mecanismos de recompensa para a AEHL e para a desidratação^{144,150}.

6 CONCLUSÃO

Os estudos realizados nesta tese avaliaram o papel da supressão de mecanismos inibidores ao apetite ao sódio sobre diferentes aspectos centrais, sistêmicos e comportamentais relativos à natriorexigênese.

O esquema apresentado na Figura 23 sintetiza os pontos da via de controle ingestivo investigados (letras “a” até “e”), comentados abaixo.

- a. Na fase apetitiva da ingestão paradoxal de sódio, os estudos imunohistoquímicos e de detecção tecidual de neurotransmissores demonstram que NTS e a AP apresentam maior ativação, além de sugerirem a existência de uma modulação dopaminérgica na amígdala, mas não no NAC. Os testes de determinação da concentração plasmática de hormônios hipotalâmicos, assim como os testes da atividade de neurônios ocitocinérgicos no PVN e no SON, demonstram que o mecanismo serotoninérgico antinatriorexigênico do NPBL não modula o sistema ocitocinérgico hipotalâmico (também antinatriorexigênico), sugerindo que a expressão da ingestão de sódio não depende de tal sistema.
 - b. Os testes funcionais de avaliação de conteúdo gastrointestinal não confirmam a hipótese inicial da interação entre o mecanismo serotoninérgico antinatriorexigênico do NPBL e o controle da taxa de esvaziamento gástrico. A atividade inalterada do NMDV e os experimentos de ingestão paradoxal também sugerem que a modulação do esvaziamento gástrico não determina o surgimento nem a manutenção da ingestão paradoxal.
 - c. O mecanismo serotoninérgico do NPBL, em ratos com desidratação celular, inibe tanto a ingestão de NaCl hipertônico como a ingestão de solução isotônica.
 - d. Os estudos comportamentais demonstraram que episódios de ativação gabaérgica no NPBL produz sensibilização da ingestão de NaCl hipertônico.
 - e. A AEHL não é modificada na desidratação celular, nem após a remoção de mecanismos inibidores da ingestão de sódio pela saciedade da sede no modelo PH-RP.
-

Em suma, os resultados sugerem que a ingestão paradoxal de sódio durante a desidratação celular, produzida pela desativação do mecanismo serotoninérgico antinatriorexigênico do NPBL, ocorre independentemente do sistema ocitocínico hipotalâmico e da inibição periférica relacionada à saciedade rápida. A desativação aguda de mecanismos inibidores não modifica a recompensa à AEHL, mas desativações repetidas do NPBL sensibilizam a ingestão de NaCl, sugerindo a interação do NPBL com a recompensa ao sabor salgado. A determinação do papel fisiológico da ativação neuronal em áreas tronculares consideradas inibidoras e o papel da dopamina na amígdala durante a fase apetitiva da ingestão de sódio demandam estudos adicionais.

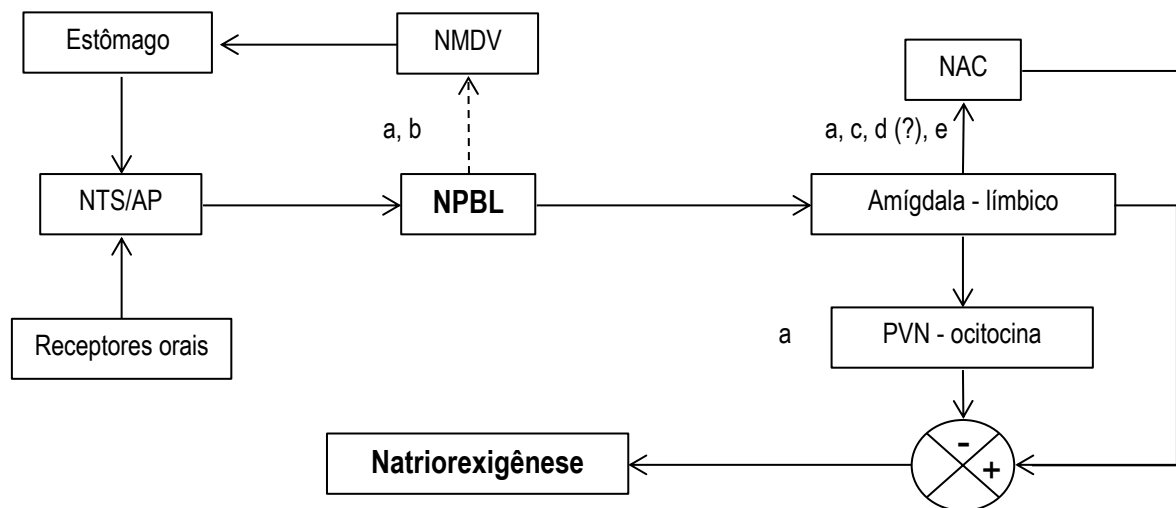


Figura 23. Fluxograma hipotético das vias neurais envolvidas com o controle do apetite ao sódio, com ênfase ao objeto de estudo proposto. As letras (a-e) referem-se aos comentários no texto. A via serotoninérgica no NPBL poderia ser ativada por sinais originados em osmorreceptores. Estão omitidas conexões recíprocas entre os diferentes núcleos (por ex., entre NPBL e CEA) e vias facilitadoras que recrutariam o CEA e NAC para induzir ingestão de sódio (+). A inibição da ingestão de sódio é representada por (-).

7 REFERÊNCIAS

- 1 JEQUIER, E.; CONSTANT, F. Water as an essential nutrient: the physiological basis of hydration. **European journal of clinical nutrition**, 2009.
 - 2 KLEINER, S. M. Water: an essential but overlooked nutrient. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 200-206, 1999.
 - 3 SUBUDHI, A. W.; ASKEW, E. W.; LUETKEMEIER, M. J. Dehydration. In: EDITOR-IN-CHIEF: BENJAMIN, C. **Encyclopedia of Human Nutrition**. Oxford: Elsevier, 2005. p.518-526.
 - 4 GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1264.
 - 5 CANNON, W. B. Organization for physiological homeostasis. **Physiological Reviews**, v. 9, n. 3, p. 399-431, 1929.
 - 6 TAKEI, Y. Comparative physiology of body fluid regulation in vertebrates with special reference to thirst regulation. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 50, n. 2, p. 171-186, 2000.
 - 7 LENT, R. **Cem Bilhões de Neurônios? Conceitos Fundamentais de Neurociência**. 2. São Paulo, SP: Editora Atheneu, 2010. 765.
 - 8 CRAIG, W. Appetites and aversions as constituents of instinctis. **Biological Bulletin**, v. 34, 1918.
 - 9 EPSTEIN, A. N. Instinct and motivation as explanations for complex behavior. In: PFAFF, D. W. **The Physiology of Motivation**. New York: Springer-Verlag, 1982. p.25-58.
-

-
- 10 ROLLS, B. J.; ROLLS, E. T. **Thirst**. Cambridge: Cambridge University Press, 1982.
- 11 STRICKER, E. M. Thirst. In: STRICKER, E. M. e WOODS, S. C. **Handbook of behavioral neurobiology**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. p.507-545.
- 12 FITZSIMONS, J. T. Thirst. **Physiological Reviews**, v. 52, n. 2, p. 468-561, 1972.
- 13 BOURQUE, C. W. Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation. **Nature reviews Neuroscience**, v. 9, n. 7, p. 519-531, 2008.
- 14 JOHNSON, A. K. The sensory psychobiology of thirst and salt appetite. **Medicine and science in sports and exercise**, v. 39, n. 8, p. 1388-1400, 2007.
- 15 RICHTER, C. P. Increased salt appetite in adrenalectomized rats. **The American journal of physiology**, v. 115, p. 155-161, 1936.
- 16 WILKINS, L.; RICHTER, C. P. A great craving for salt by a child with cortico-adrenal insufficiency. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 114, n. 10, p. 866-868, 1940.
- 17 EPSTEIN, A. N. Prospectus: thirst and salt appetite. In. **Neurobiology of Food and Fluid Intake**, 1990. p.489-512.
- 18 FLUHARTY, S. J.; EPSTEIN, A. N. Sodium appetite elicited by intracerebroventricular infusion of angiotensin II in the rat: II. Synergistic interaction with systemic mineralocorticoids. **Behavioral Neuroscience**, v. 97, n. 5, p. 746-758, 1983.
- 19 SCHULKIN, J. **Sodium hunger: the search for a salty taste**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991.
-

-
- 20 DE LUCA JR., L. A.; VENDRAMINI, R. C.; PEREIRA, D. T. B.; COLOMBARI, D. A.; DAVID, R. B.; PAULA, P. M.; MENANI, J. V. Water deprivation and the double-depletion hypothesis: common neural mechanisms underlie thirst and salt appetite. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 40, n. 5, p. 707-712, 2007.
- 21 DAVID, R. B.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. Central angiotensin II induces sodium bicarbonate intake in the rat. **Appetite**, v. 51, n. 1, p. 82-89, 2008.
- 22 ROWLAND, N. E.; MORIAN, K. R. Roles of aldosterone and angiotensin in maturation of sodium appetite in furosemide-treated rats. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 276, n. 5 Pt 2, p. R1453-R1460, 1999.
- 23 STRICKER, E. M.; WOLF, G. Hypovolemic thirst in comparison with thirst induced by hyperosmolality. **Physiology & Behavior**, v. 2, p. 33-37, 1967.
- 24 SMITH, D. F.; STRICKER, E. M. The influence of need on the rat's preference for dilute NaCl solutions. **Physiology & Behavior**, v. 4, p. 407-410, 1969.
- 25 CONSTANCIO, J.; PEREIRA-DERDERIAN, D. T. B.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR, L. A. Mineral intake independent from gastric irritation or pica by cell-dehydrated rats. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 5, p. 659-665, 2011.
- 26 PEREIRA, D. T. B.; VENDRAMINI, R. C.; DAVID, R. B.; NOZAKI, P. N.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. Isotonic NaCl intake by cell-dehydrated rats. **Physiology & Behavior**, v. 76, n. 4-5, p. 501-505, 2002.
- 27 PEREIRA, D. T. B.; DAVID, R. B.; VENDRAMINI, R. C.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. Potassium intake during cell dehydration. **Physiology & Behavior**, v. 85, n. 2, p. 99-106, 2005.
-

-
- 28 DAVID, R. B. **Especificidade do apetite ao sódio: uma possível contribuição hormonal**. 2006. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.
- 29 NORGREN, R.; HAJNAL, A.; MUNGARNDEE, S. S. Gustatory reward and the nucleus accumbens. **Physiology & Behavior**, v. 89, n. 4, p. 531-535, 2006.
- 30 QUARTERMAIN, D.; MILLER, N. E.; WOLF, G. Role of experience in relationship between sodium deficiency and rate of bar pressing for salt. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 63, n. 3, p. 417-20, 1967.
- 31 GRIPPO, A. J.; MOFFITT, J. A.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Reduced hedonic behavior and altered cardiovascular function induced by mild sodium depletion in rats. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 5, p. 1133-43, 2006.
- 32 TANDON, S.; SIMON, S. A.; NICOLELIS, M. A. L. Appetitive changes during salt deprivation are paralleled by widespread neuronal adaptations in nucleus accumbens, lateral hypothalamus, and central amygdala. **Journal of Neurophysiology**, v. 108, n. 4, p. 1089-1105, 2012.
- 33 OLDS, M. E.; FOBES, J. L. The central basis of motivation: intracranial self-stimulation studies. **Annual review of psychology**, v. 32, p. 523-74, 1981.
- 34 FALK, J. L. Water intake and NaCl appetite in sodium depletion. **Psychological Reports**, v. 16, n. 1, p. 315-325, 1965.
- 35 SAKAI, R. R.; FINE, W. B.; EPSTEIN, A. N.; FRANKMANN, S. P. Salt appetite is enhanced by one prior episode of sodium depletion in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 101, n. 5, p. 724-731, 1987.
- 36 EPSTEIN, A. N. Neurohormonal control of salt intake in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 27, n. 3-4, p. 315-320, 1991.
-

-
- 37 LESHEM, M.; KAVUSHANSKY, A.; DEVYS, J. M.; THORNTON, S. Enhancement revisited: the effects of multiple depletions on sodium intake in rats vary with strain, substrain, and gender. **Physiology & Behavior**, v. 82, n. 2-3, p. 571-580, 2004.
- 38 SAKAI, R. R.; FRANKMANN, S. P.; FINE, W. B.; EPSTEIN, A. N. Prior episodes of sodium depletion increase the need-free sodium intake of the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 103, n. 1, p. 186-192, 1989.
- 39 FRANKMANN, S. P.; DORSA, D. M.; SAKAI, R. R.; SIMPSON, J. B. A single experience with hyperoncotic colloid dialysis persistently alters water and sodium intake. In: DE CARO, G.; EPSTEIN, A. N., et al. **The Physiology of Thirst and Sodium Appetite**. New York, NY, USA: Plenum Press, 1986.
- 40 PEREIRA, D. T. B.; DAVID, R. B.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. Episodes of water deprivation enhance daily hypertonic NaCl intake in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 4, p. 465-468, 2002.
- 41 PEREIRA, D. T. B.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. FURO/CAP: A protocol for sodium intake sensitization. **Physiology & Behavior**, v. 99, n. 4, p. 472-481, 2010.
- 42 ROITMAN, M. F.; NA, E.; ANDERSON, G.; JONES, T. A.; BERNSTEIN, I. L. Induction of a salt appetite alters dendritic morphology in nucleus accumbens and sensitizes rats to amphetamine. **The Journal of Neuroscience**, v. 22, n. 11, p. RC225 (1-5), 2002.
- 43 CLARK, J. J.; BERNSTEIN, I. L. Reciprocal cross-sensitization between amphetamine and salt appetite. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 78, n. 4, p. 691-698, 2004.
- 44 HUI, P.; RUI, C.; LIU, Y.; XU, F.; WU, J.; WU, L.; CHEN, Y.; LIAO, J.; MAO, C.; XU, Z. Remodeled salt appetite in rat offspring by perinatal exposure to nicotine. **Appetite**, v. 52, n. 2, p. 492-497, 2009.
-

-
- 45 ANTUNES-RODRIGUES, J.; CASTRO, M.; ELIAS, L. L. K.; VALENÇA, M. M.; MCCANN, S. M. Neuroendocrine control of body fluid metabolism. **Physiological Reviews**, v. 84, p. 169-208, 2004.
- 46 ANDERSON, J. W.; WASHBURN, D. L.; FERGUSON, A. V. Intrinsic osmosensitivity of subfornical organ neurons. **Neuroscience**, v. 100, n. 3, p. 539-547, 2000.
- 47 FITZSIMONS, J. T. Angiotensin, thirst, and sodium appetite. **Physiological Reviews**, v. 78, n. 3, p. 583-686, 1998.
- 48 STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Sodium appetite. In: STRICKER, E. M. **Handbook of Behavioral Neurobiology**. New York: Plenum Press, 1990. p.387-419.
- 49 DE LUCA JR., L. A.; VIVAS, L. M.; MENANI, J. V. Controle neuroendócrino da ingestão de água e sódio. In: ANTUNES-RODRIGUES, J. A.; MOREIRA, A. C., et al. **Neuroendocrinologia básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. p.116-134.
- 50 STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Central inhibition of salt appetite by oxytocin in rats. **Regulatory Peptides**, v. 66, n. 1-2, p. 83-85, 1996.
- 51 DE LUCA JR., L. A.; BARBOSA, S. P.; MENANI, J. V. Brain serotonin blockade and paradoxical salt intake in rats. **Neuroscience**, v. 121, n. 4, p. 1055-1061, 2003.
- 52 KIMURA, E. H.; OLIVEIRA, L. B.; COLOMBARI, D. S.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V.; CALLERA, J. C. Sodium intake by hyperosmotic rats treated with a GABA_A receptor agonist into the lateral parabrachial nucleus. **Brain Research**, v. 1190, p. 86-93, 2008.
- 53 ANDRADE, C. A.; DE LUCA JR., L. A.; 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. 21-28, 2006.
-

-
- 54 BLACKBURN, R. E.; SAMSON, W. K.; FULTON, R. J.; STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Central oxytocin inhibition of salt appetite in rats: evidence for differential sensing of plasma sodium and osmolality. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 90, n. 21, p. 10380-10384, 1993.
- 55 BLACKBURN, R. E.; SAMSON, W. K.; FULTON, R. J.; STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Central oxytocin and ANP receptors mediate osmotic inhibition of salt appetite in rats. **The American journal of physiology**, v. 269, n. 2 Pt 2, p. R245-R251, 1995.
- 56 STRICKER, E. M.; STRICKER, M. L. Pre-systemic controls of fluid intake and vasopressin secretion. **Physiology & Behavior**, v. 103, p. 86-88, 2011.
- 57 XAVIER-NETO, J.; DOS SANTOS, A. A.; ROLA, F. H. Acute hypervolaemia increases gastroduodenal resistance to the flow of liquid in the rat. **Gut**, v. 31, n. 9, p. 1006-1010, 1990.
- 58 FERGUSON, A. V.; KASTING, N. W. Angiotensin acts at the subfornical organ to increase plasma oxytocin concentrations in the rat. **Regulatory Peptides**, v. 23, n. 3, p. 343-352, 1988.
- 59 MENANI, J. V.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus and serotonergic mechanisms in the control of salt appetite in rats. **The American journal of physiology**, v. 270, n. 1 Pt 2, p. R162-R168, 1996.
- 60 OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Lesions in the lateral parabrachial nucleus enhance drinking to angiotensin II and isoproterenol. **The American journal of physiology**, v. 251, n. R504, p. R509, 1986.
- 61 OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Role of lateral parabrachial nucleus in the inhibition of water intake produced by right atrial stretch. **Brain Research**, v. 695, n. 2, p. 275-278, 1995.
-

-
- 62 MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial serotonergic mechanisms: angiotensin-induced pressor and drinking responses. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 269, n. 5, p. R1044-R1049, 1995.
- 63 OHMAN, L. E.; JOHNSON, A. K. Brain stem mechanisms and the inhibition of angiotensin-induced drinking. **The American journal of physiology**, v. 256, n. 1 Pt 2, p. R264-9, 1989.
- 64 EDWARDS, G. L.; JOHNSON, A. K. Enhanced drinking after excitotoxic lesions of the parabrachial nucleus in the rat. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 261, n. 4, p. R1039-R1044, 1991.
- 65 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. **Neuroscience Letters**, v. 158, n. 1, p. 47-50, 1993.
- 66 LANÇA, A. J.; VAN DER KOOY, D. A serotonin-containing pathway from the area postrema to the parabrachial nucleus in the rat. **Neuroscience**, v. 14, n. 4, p. 1117-1126, 1985.
- 67 PETROV, T.; KRUKOFF, T. L.; JHAMANDAS, J. H. The hypothalamic paraventricular and lateral parabrachial nuclei receive collaterals from raphe nucleus neurons: a combined double retrograde and immunocytochemical study. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 318, n. 1, p. 18-26, 1992.
- 68 REIS, L. C. Role of the serotonergic system in the sodium appetite control. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 79, p. 261-283, 2007.
- 69 CAVALCANTE-LIMA, H. R.; BADAUÊ-PASSOS JR., D.; DE-LUCCA JR., W.; LIMA, H. R. C.; COSTA-E-SOUSA, R. H.; OLIVARES, E. L.; CEDRAZ-MERCEZ, P. L.; REIS, R. O.; MEDEIROS, M. A.; CÔRTEZ, W. S.; REIS, L. C. Chronic excitotoxic
-

lesion of the dorsal raphe nucleus induces sodium appetite. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, n. 11, p. 1669-1675, 2005.

70 CURTIS, K. S.; HUANG, W.; SVED, A. F.; VERBALIS, J. G.; STRICKER, E. M. Impaired osmoregulatory responses in rats with area postrema lesions. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 277, n. 1, p. R209-R219, 1999.

71 TANAKA, J.; HAYASHI, Y.; YAMATO, K.; MIYAKUBO, H.; NOMURA, M. Involvement of serotonergic systems in the lateral parabrachial nucleus in sodium and water intake: a microdialysis study in the rat. **Neuroscience Letters**, v. 357, n. 1, p. 41-44, 2004.

72 FRANCHINI, L. F.; JOHNSON, A. K.; DE OLMOS, J.; VIVAS, L. Sodium appetite and Fos activation in serotonergic neurons. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 1, p. R235-R243, 2002.

73 GODINO, A.; DE LUCA JR., L. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J. A.; VIVAS, L. M. Oxytocinergic and serotonergic systems involvement in sodium intake regulation: satiety or hypertonicity markers? **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 293, n. 3, p. R1027-R1036, 2007.

74 BARNES, N. M.; SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**, v. 38, n. 8, p. 1083-152, 1999.

75 HOYER, D.; HANNON, J. P.; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 71, n. 4, p. 533-54, 2002.

76 SCHOEFFTER, P.; HOYER, D. Centrally acting hypotensive agents with affinity for 5-HT_{1A} binding sites inhibit forskolin-stimulated adenylate cyclase activity in calf hippocampus. **British journal of pharmacology**, v. 95, n. 3, p. 975-85, 1988.

-
- 77 COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Forebrain angiotensin type 1 receptors and parabrachial serotonin in the control of NaCl and water intake. **The American journal of physiology**, v. 271, n. 6 Pt 2, p. R1470-R1476, 1996.
- 78 MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A.; JOHNSON, A. K. Lateral parabrachial nucleus serotonergic mechanisms and salt appetite induced by sodium depletion. **The American journal of physiology**, v. 274, n. 2 Pt 2, p. R555-R560, 1998.
- 79 DAVID, R. B.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. Serotonergic receptor blockade in the lateral parabrachial nucleus: different effects on hypertonic and isotonic NaCl intake. **Brain Research**, v. 1187, p. 137-145, 2008.
- 80 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 Research**, v. 801, n. 1-2, p. 29-35, 1998.
- 81 DE GOBBI, J. I.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA JR., L. A.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K.; MENANI, J. V. Activation of serotonergic 5-HT_{1A} receptors in the lateral parabrachial nucleus increases NaCl intake. **Brain Research**, v. 1066, n. 1-2, p. 1-9, 2005.
- 82 DE GOBBI, J. I.; DE LUCA JR., L. A.; JOHNSON, A. K.; MENANI, J. V. Interaction of serotonin and cholecystokinin in the lateral parabrachial nucleus to control sodium intake. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 280, n. 5, p. R1301-R1307, 2001.
- 83 DE GOBBI, J. I.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus on DOCA-induced sodium intake. **Brain Research**, v. 880, n. 1-2, p. 131-138, 2000.
- 84 MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A.; THUNHORST, R. L.; JOHNSON, A. K. Hindbrain serotonin and the rapid induction of sodium appetite. **American Journal of**
-

Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 279, n. 1, p. R126-R131, 2000.

85 MENANI, J. V.; BARBOSA, S. P.; DE LUCA JR., L. A.; DE GOBBI, J. I.; JOHNSON, A. K. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus and cholinergic-induced sodium appetite. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 3, p. R837-R841, 2002.

86 HOELLER, A. A.; DOS SANTOS, T. S.; BRUXEL, R. R.; DALLAZEN, A. R.; DO AMARAL SILVA, H. T.; ANDRÉ, E. S.; MARINO-NETO, J. Serotonergic control of ingestive and post-ingestive behaviors in pigeons (*Columba livia*): The role of 5-HT_{1A} receptor-mediated central mechanisms. **Behavioural Brain Research**, v. 236, p. 118-130, 2013.

87 MARGATHO, L. O.; GIUSTI-PAIVA, A.; MENANI, J. V.; ELIAS, L. L. K.; VIVAS, L. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Serotonergic mechanisms of the lateral parabrachial nucleus in renal and hormonal responses to isotonic blood volume expansion. **The American journal of physiology**, v. 292, n. 3, p. R1190-R1197, 2007.

88 RICHTER, C. P. Salt appetite of mammals: its dependence on instinct and metabolism. In: AUTUORI, M. **L'Instinct dans le Comportement des Animaux et de l'Home**. Paris: Masson, 1956. p.577-632.

89 BRESLIN, P. A. S.; KAPLAN, J. M.; SPECTOR, A. C.; ZAMBITO, C. M.; GRILL, H. J. Lick rate analysis of sodium taste-state combinations. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 264, n. 2 Pt 2, p. R312-R318, 1993.

90 DE LUCA JR., L. A.; DAVID, R. B.; GODINO, A.; VIVAS, L. M.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MENANI, J. V. The lateral parabrachial nucleus controls hypertonic, not isotonic, NaCl intake. **Appetite**, v. 51, n. 2, p. 362-362, 2008.

-
- 91 TORDOFF, M. G.; BACHMANOV, A. A. Mouse taste preference tests: why only two bottles? **Chemical Senses**, v. 28, n. 4, p. 315-324, 2003.
- 92 SCALERA, G. Taste preference and acceptance in thirsty and dehydrated rats. **Physiology & Behavior**, v. 71, n. 5, p. 457-468, 2000.
- 93 ANDRADE, C. A. F.; MARGATHO, L. O.; ANDRADE-FRANZÉ, G. M. F.; DE LUCA JR., L. A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; MENANI, J. V. Moxonidine into the lateral parabrachial nucleus reduces renal and hormonal responses to cell dehydration. **Neuroscience**, v. 208, n. 0, p. 69-78, 2012.
- 94 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 Research**, v. 1372, p. 49-58, 2011.
- 95 ANDRADE, C. A. F.; BARBOSA, S. P.; DE, L., JR.; MENANI, J. V. Activation of α_2 -adrenergic receptors into the lateral parabrachial nucleus enhances NaCl intake in rats. **Neuroscience**, v. 129, n. 1, p. 25-34, 2004.
- 96 MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Cholecystokinin actions in the parabrachial nucleus: effects on thirst and salt appetite. **The American journal of physiology**, v. 275, p. R1431-R1437, 1998.
- 97 CALLERA, J. C.; OLIVEIRA, L. B.; BARBOSA, S. P.; COLOMBARI, D. S.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. GABA_A receptor activation in the lateral parabrachial nucleus induces water and hypertonic NaCl intake. **Neuroscience**, v. 134, n. 3, p. 725-735, 2005.
- 98 GASPARINI, S.; DE LUCA JR., L. A.; 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. 370-379, 2009.
-

-
- 99 DE OLIVEIRA, L. B.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Opioid activation in the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium intake. **Neuroscience**, v. 155, n. 2, p. 350-8, 2008.
- 100 DE OLIVEIRA, L. B.; KIMURA, E. H.; CALLERA, J. C.; DE LUCA JR, L. A.; COLOMBARI, D. S. A.; MENANI, J. V. Baclofen into the lateral parabrachial nucleus induces hypertonic sodium chloride and sucrose intake in rats. **Neuroscience**, v. 183, n. 0, p. 160-170, 2011.
- 101 RONCARI, C. F.; DAVID, R. B.; DE PAULA, P. M.; COLOMBARI, D. S. A.; DE LUCA JR., L. A.; MENANI, J. V. Importance of central AT₁ receptors for sodium intake induced by GABAergic activation of the lateral parabrachial nucleus. **Neuroscience**, v. 196, n. 0, p. 147-152, 2011.
- 102 DONG, H. W.; SWANSON, L. W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, dorsomedial nucleus: implications for cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and drinking responses. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 494, n. 1, p. 75-107, 2006.
- 103 GRAY, T. S.; CARNEY, M. E.; MAGNUSON, D. J. Direct projections from the central amygdaloid nucleus to the hypothalamic paraventricular nucleus: possible role in stress-induced adrenocorticotropin release. **Neuroendocrinology**, v. 50, n. 4, p. 433-446, 1989.
- 104 JOHNSON, A. K.; OLMOS, J.; PASTUSKOVAS, C. V.; ZARDETTO-SMITH, A. M.; VIVAS, L. The extended amygdala and salt appetite. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 877, p. 258-280, 1999.
- 105 KARIMNAMAZI, H.; TRAVERS, J. B. Differential projections from gustatory responsive regions of the parabrachial nucleus to the medulla and forebrain. **Brain Research**, v. 813, n. 2, p. 283-302, 1998.
-

-
- 106 SMITH, G. P. Ontogeny of ingestive behavior. **Developmental Psychobiology**, v. 48, n. 5, p. 345-359, 2006.
- 107 SMITH, C. A.; CURTIS, K. S.; SMITH, J. C.; STRICKER, E. M. Presystemic influences on thirst, salt appetite, and vasopressin secretion in the hypovolemic rat. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 292, n. 5, p. R2089-R2099, 2007.
- 108 STRICKER, E. M.; BYKOWSKI, M. R.; HOSSLER, C. A. S.; CURTIS, K. S.; SMITH, J. C. Gastric emptying and intestinal absorption of ingested water and saline by hypovolemic rats. **Physiology & Behavior**, v. 98, n. 5, p. 570-578, 2009.
- 109 WOOD, J. D. Enteric neurophysiology. **The American journal of physiology**, v. 247, n. 6, p. G585-G598, 1984.
- 110 KARIMNAMAZI, H.; TRAVERS, S. P.; TRAVERS, J. B. Oral and gastric input to the parabrachial nucleus of the rat. **Brain Research**, v. 957, n. 2, p. 193-206, 2002.
- 111 ROGERS, R. C.; HERMANN, G. E.; TRAVAGLI, R. A. Brainstem control of gastric function. In: JOHNSON, L. R. **Physiology of the Gastrointestinal Tract**. San Diego, CA: Elsevier, 2006. p.851-875.
- 112 MCKINLEY, M. J.; MCALLEN, R. M.; DAVERN, P.; GILES, M. E.; PENSCHOW, J.; SUNN, N.; USCHAKOV, A.; OLDFIELD, B. J. **The sensory circumventricular organs of the mammalian brain**. 2003. 122.
- 113 PRICE, C. J.; HOYDA, T. D.; FERGUSON, A. V. The area postrema: a brain monitor and integrator of systemic autonomic state. **The Neuroscientist**, v. 14, n. 2, p. 182-194, 2008.
- 114 THORNTON, S. N.; NICOLAIDIS, S. Long-term mineralocorticoid-induced changes in rat neuron properties plus interaction of aldosterone and ANG II. **American**
-

Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, v. 266, n. 2, p. R564-R571, 1994.

115 XUE, B.; ZHANG, Z.; RONCARI, C. F.; GUO, F.; JOHNSON, A. K. Aldosterone acting through the central nervous system sensitizes angiotensin II-induced hypertension. **Hypertension**, v. 60, n. 4, p. 1023-1030, 2012.

116 BOURQUE, C. W.; OLIET, S. H. R.; RICHARD, D. Osmoreceptors, Osmoreception, and Osmoregulation. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 15, n. 3, p. 231-274, 1994.

117 SIMPSON, J. B.; ROUTTENBERG, A. Subfornical organ: site of drinking elicitation by angiotensin II. **Science**, v. 181, n. 4105, p. 1172-5, 1973.

118 MANGIAPANE, M. L.; SIMPSON, J. B. Subfornical organ: forebrain site of pressor and dipsogenic action of angiotensin II. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 239, n. 5, p. R382-R389, 1980.

119 THRASHER, T. N.; KEIL, L. C. Regulation of drinking and vasopressin secretion: role of organum vasculosum laminae terminalis. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 253, p. R108-R120, 1987.

120 JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. The neuroendocrinology of thirst and salt appetite: visceral sensory signals and mechanisms of central integration. **Frontiers in Neuroendocrinology**, v. 18, n. 3, p. 292-353, 1997.

121 DANIELS, D.; FLUHARTY, S. J. Salt appetite: a neurohormonal viewpoint. **Physiology & Behavior**, v. 81, n. 2, p. 319-337, 2004.

122 VAN DER KOOY, D.; KODA, L. Y. Organization of the projections of a circumventricular organ: The area postrema in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 219, n. 3, p. 328-338, 1983.

-
- 123 SHAPIRO, R. E.; MISELIS, R. R. The central neural connections of the area postrema of the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 234, p. 344-364, 1985.
- 124 COVIAN, M. R.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; GENTIL, C. G.; SAAD, W. A.; CAMARGO, L. A.; SILVA NETO, C. R. Central control of salt balance. In: MOGENSEN, G. J. e CALARESU, F. R. **Neural integration of physiological mechanisms and behavior (J.A.F. Stevenson Memorial Volume)**: University of Toronto Press, 1975. p.267-282.
- 125 NORGREN, R. Gustatory system. In: PAXINOS, G. **The rat nervous system**. San Diego, CA: Academic Press, 1995. p.751-771.
- 126 GALAVERNA, O.; DE LUCA JR., L. A.; 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 Research Bulletin**, v. 28, n. 1, p. 89-98, 1992.
- 127 ZARDETTO-SMITH, A. M.; BELTZ, T. G.; JOHNSON, A. K. Role of the central nucleus of the amygdala and bed nucleus of the stria terminalis in experimentally-induced salt appetite. **Brain Research**, v. 645, n. 1-2, p. 123-134, 1994.
- 128 VENDRAMINI, R. C.; PEREIRA, D. T.; BORELLA, T. L.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. Damage to the central amygdala produces differential encephalic c-fos expression in the water deprivation-partial rehydration protocol. **Brain Research**, v. 1304, p. 80-89, 2009.
- 129 ANDRADE-FRANZÉ, G. M.; ANDRADE, C. A.; DE LUCA JR., L. A.; DE PAULA, P. M.; COLOMBARI, D. S.; MENANI, J. V. Lesions in the central amygdala impair sodium intake induced by the blockade of the lateral parabrachial nucleus. **Brain Research**, v. 1332, p. 57-64, 2010.
- 130 SEWARDS, T. V. Dual separate pathways for sensory and hedonic aspects of taste. **Brain Research Bulletin**, v. 62, n. 4, p. 271-283, 2004.
-

-
- 131 SMITH, G. P. Accumbens Dopamine is a Physiological Correlate of the Rewarding and Motivating Effects of Food. In: STRICKER, E. M. e WOODS, S. C. **Handbook of behavioral neurobiology**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, 2004. p.15-42.
- 132 MILLER, R. L.; STEIN, M. K.; LOEWY, A. D. Serotonergic inputs to FoxP2 neurons of the pre-locus coeruleus and parabrachial nuclei that project to the ventral tegmental area. **Neuroscience**, v. 193, n. 0, p. 229-240, 2011.
- 133 SWANSON, L. W. The projections of the ventral tegmental area and adjacent regions: A combined fluorescent retrograde tracer and immunofluorescence study in the rat. **Brain Research Bulletin**, v. 9, n. 1-6, p. 321-353, 1982.
- 134 SHEKHTMAN, E.; GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Aldosterone-sensitive neurons of the nucleus of the solitary tract: multisynaptic pathway to the nucleus accumbens. **The Journal of Comparative Neurology**, v. 501, n. 2, p. 274-289, 2007.
- 135 KRANZ, G. S.; KASPER, S.; LANZENBERGER, R. Reward and the serotonergic system. **Neuroscience**, v. 166, n. 4, p. 1023-1035, 2010.
- 136 FESSLER, D. M. An evolutionary explanation of the plasticity of salt preferences: prophylaxis against sudden dehydration. **Medical Hypotheses**, v. 61, n. 3, p. 412-415, 2003.
- 137 DE LUCA JR., L. A.; PEREIRA-DERDERIAN, D. T.; VENDRAMINI, R. C.; DAVID, R. B.; MENANI, J. V. Water deprivation-induced sodium appetite. **Physiology & Behavior**, v. 100, n. 5, p. 535-544, 2010.
- 138 DI NICOLANTONIO, R.; MENDELSON, F. A. Plasma renin and angiotensin in dehydrated and rehydrated rats. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 250, n. 5, p. R898-R901, 1986.
-

-
- 139 DE LUCA JR., L. A.; XU, Z.; SCHOORLEMMER, G. H.; THUNHORST, R. L.; BELTZ, T. G.; MENANI, J. V.; JOHNSON, A. K. Water deprivation-induced sodium appetite: humoral and cardiovascular mediators and immediate early genes. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 282, n. 2, p. R552-R559, 2002.
- 140 PEREIRA-DERDERIAN, D. T.; VENDRAMINI, R. C.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR., L. A. Water deprivation-induced sodium appetite and differential expression of encephalic c-Fos immunoreactivity in the spontaneously hypertensive rat. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 298, p. 1298-1309, 2010.
- 141 FONTANINI, A.; GROSSMAN, S. E.; FIGUEROA, J. A.; KATZ, D. B. Distinct Subtypes of Basolateral Amygdala Taste Neurons Reflect Palatability and Reward. **Journal of Neuroscience**, v. 29, n. 8, p. 2486-2495, 2009.
- 142 WISE, R. A. Addictive drugs and brain stimulation reward. **Annual review of neuroscience**, v. 19, p. 319-40, 1996.
- 143 OLDS, J. Hypothalamic Substrates of Reward. **Physiological Reviews**, v. 42, n. 4, p. 554-604, 1962.
- 144 MORRIS, M. J.; NA, E. S.; JOHNSON, A. K. Mineralocorticoid receptor antagonism prevents hedonic deficits induced by a chronic sodium appetite. **Behavioral Neuroscience**, v. 124, n. 2, p. 211-224, 2010.
- 145 FRUTIGER, S. A. Changes in self-stimulation at stimulation-bound eating and drinking sites in the lateral hypothalamus during food or water deprivation, glucoprivation, and intracellular or extracellular dehydration. **Behavioral Neuroscience**, v. 100, n. 2, p. 221-9, 1986.
- 146 MOGENSEN, G. J. Water deprivation and excessive water intake during self-stimulation. **Physiology & Behavior**, v. 4, n. 3, p. 393-397, 1969.
-

-
- 147 EDMONDS, D. E.; GALLISTEL, C. R. Parametric analysis of brain stimulation reward in the rat: III. Effect of performance variables on the reward summation function. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, v. 87, n. 5, p. 876-883, 1974.
- 148 MILIARESSIS, E.; ROMPRE, P. P.; LAVIOLETTE, P.; PHILIPPE, L.; COULOMBE, D. The curve-shift paradigm in self-stimulation. **Physiology & Behavior**, v. 37, n. 1, p. 85-91, 1986.
- 149 TINDELL, A. J.; SMITH, K. S.; PECINA, S.; BERRIDGE, K. C.; ALDRIDGE, J. W. Ventral Pallidum Firing Codes Hedonic Reward: When a Bad Taste Turns Good. **Journal of Neurophysiology**, v. 96, n. 5, p. 2399-2409, 2006.
- 150 MORRIS, M. J.; NA, E. S.; GRIPPO, A. J.; JOHNSON, A. K. The effects of deoxycorticosterone-induced sodium appetite on hedonic behaviors in the rat. **Behavioral Neuroscience**, v. 120, n. 3, p. 571-9, 2006.
- 151 SCHOORLEMMER, G. H. M.; JOHNSON, A. K.; THUNHORST, R. L. Circulating angiotensin II mediates sodium appetite in adrenalectomized rats. **American Journal of Physiology Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 281, n. 3, p. R723-R729, 2001.
- 152 PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Amsterdam: Elsevier Academic Press 2005.
- 153 CRUZ, F. C.; MARIN, M. T.; LEÃO, R. M.; PLANETA, C. S. Stress-induced cross-sensitization to amphetamine is related to changes in the dopaminergic system. **Journal of Neural Transmission**, v. 119, n. 4, p. 415-424, 2012.
- 154 BADAUE-PASSOS JR., D.; GODINO, A.; JOHNSON, A. K.; VIVAS, L.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Dorsal raphe nuclei integrate allostatic information evoked by depletion-induced sodium ingestion. **Experimental Neurology**, v. 206, n. 1, p. 86-94, 2007.
-

-
- 155 GODINO, A.; GIUSTI-PAIVA, A.; ANTUNES-RODRIGUES, J.; VIVAS, L. Neurochemical brain groups activated after an isotonic blood volume expansion in rats. **Neuroscience**, v. 133, n. 2, p. 493-505, 2005.
- 156 FRANCHINI, L. F.; VIVAS, L. Distribution of Fos immunoreactivity in rat brain after sodium consumption induced by peritoneal dialysis. **The American journal of physiology**, v. 276, n. 4 Pt 2, p. R1180-R1187, 1999.
- 157 GIUSTI-PAIVA, A.; ELIAS, L. L. K.; ANTUNES-RODRIGUES, J. Inhibitory effect of gaseous neuromodulators in vasopressin and oxytocin release induced by endotoxin in rats. **Neuroscience Letters**, v. 381, n. 3, p. 320-324, 2005.
- 158 MORRIS, M.; ALEXANDER, N. Baroreceptor influences on oxytocin and vasopressin secretion. **Hypertension**, v. 13, n. 2, p. 110-114, 1989.
- 159 ALMEIDA, R. L.; DAVID, R. B.; CONSTANCIO, J.; FRACASSO, J. F.; MENANI, J. V.; DE LUCA JR, L. A. Inhibition of sodium appetite by lipopolysaccharide: involvement of α_2 -adrenoceptors. **American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 301, n. 1, p. R185-R192, 2011.
- 160 PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. New York: Academic Press, 1986.
- 161 HYDE, T. M.; MISELIS, R. R. Area postrema and adjacent nucleus of the solitary tract in water and sodium balance. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 247, n. 1, p. R173-R182, 1984.
- 162 CONTRERAS, R. J.; STETSON, P. W. Changes in salt intake lesions of the area postrema and the nucleus of the solitary tract in rats. **Brain Research**, v. 211, n. 2, p. 355-66, 1981.
-

-
- 163 EDWARDS, G. L.; BELTZ, T. G.; POWER, J. D.; JOHNSON, A. K. Rapid-onset "need-free" sodium appetite after lesions of the dorsomedial medulla. **American Journal of Physiology**, v. 264, n. 6 Pt 2, p. R1242-R1247, 1993.
- 164 SHIN, J.-W.; GEERLING, J. C.; LOEWY, A. D. Vagal innervation of the aldosterone-sensitive HSD2 neurons in the NTS. **Brain Research**, v. 1249, p. 135-147, 2009.
- 165 ARMSTRONG, W. E. Hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei. In: PAXINOS, G. **The Rat Nervous System**. Amsterdam: Elsevier, 2004. p.369-388.
- 166 BLACKBURN, R. E.; DEMKO, A. D.; HOFFMAN, G. E.; STRICKER, E. M.; VERBALIS, J. G. Central oxytocin inhibition of angiotensin-induced salt appetite in rats. **American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology**, v. 263, n. 6, p. R1347-R1353, 1992.
- 167 KU, Y.-H.; LI, Y.-H. Subfornical organ-angiotensin II pressor system takes part in pressor response of emotional circuit. **Peptides**, v. 24, n. 7, p. 1063-1067, 2003.
- 168 LUNDY, R. F., JR.; NORGREN, R. Activity in the Hypothalamus, Amygdala, and Cortex Generates Bilateral and Convergent Modulation of Pontine Gustatory Neurons. **Journal of Neurophysiology**, v. 91, n. 3, p. 1143-1157, 2004.
- 169 MANGIAPANE, M. L.; THRASHER, T. N.; KEIL, L. C.; SIMPSON, J. B.; GANONG, W. F. Role for the subfornical organ in vasopressin release. **Brain Research Bulletin**, v. 13, n. 1, p. 43-47, 1984.
- 170 MCKINLEY, M. J.; DENTON, D. A.; LEKSELL, L. G.; MOUW, D. R.; SCOGGINS, B. A.; SMITH, M. H.; WEISINGER, R. S.; WRIGHT, R. D. Osmoregulatory thirst in sheep is disrupted by ablation of the anterior wall of the optic recess. **Brain Research**, v. 236, n. 1, p. 210-215, 1982.
-

-
- 171 THRASHER, T. N.; KEIL, L. C.; RAMSAY, D. J. Lesions of the organum vasculosum of the lamina terminalis (OVLT) attenuate osmotically-induced drinking and vasopressin secretion in the dog. **Endocrinology**, v. 110, n. 5, p. 1837-9, 1982.
- 172 OLDFIELD, B. J.; BICKNELL, R. J.; MCALLEN, R. M.; WEISINGER, R. S.; MCKINLEY, M. J. Intravenous hypertonic saline induces Fos immunoreactivity in neurons throughout the lamina terminalis. **Brain Research**, v. 561, n. 1, p. 151-6, 1991.
- 173 HAJNAL, A.; NORGRÉN, R.; KOVACS, P. Parabrachial coding of sapid sucrose: relevance to reward and obesity. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1170, p. 347-364, 2009.
- 174 ANDRADE, C. A. F.; ANDRADE-FRANZÉ, G. M. F.; DE LUCA JR, L. A.; JOHNSON, A. K.; MENANI, J. V. Changes in taste reactivity to intra-oral hypertonic NaCl after lateral parabrachial injections of an α_2 -adrenergic receptor agonist. **Physiology & Behavior**, v. 104, n. 5, p. 702-708, 2011.
- 175 ANDRADE-FRANZÉ, G. M.; ANDRADE, C. A.; DE LUCA JR., L. A.; DE PAULA, P. M.; MENANI, J. V. Lateral parabrachial nucleus and central amygdala in the control of sodium intake. **Neuroscience**, v. 165, n. 3, p. 633-41, 2010.
- 176 RAMSAY, D. J.; THRASHER, T. N. Regulation of fluid intake in dogs following water deprivation. **Brain Research Bulletin**, v. 27, n. 3-4, p. 495-499, 1991.
- 177 TORDOFF, M. G.; ALARCON, L. K.; LAWLER, M. P. Preferences of 14 rat strains for 17 taste compounds. **Physiology & Behavior**, v. 95, n. 3, p. 308-332, 2008.
- 178 FALK, J. L. Serial sodium depletion and NaCl solution intake. **Physiology & Behavior**, v. 1, n. 1, p. 75-77, 1966.
- 179 BERNSTEIN, I. L. Interaction between natural motivational systems and those which respond to drugs of abuse. **Appetite**, v. 41, n. 3, p. 333-334, 2003.
-

180 NA, E. S.; MORRIS, M. J.; JOHNSON, A. K. Behavioral cross-sensitization between morphine-induced locomotion and sodium depletion-induced salt appetite. **Pharmacology, biochemistry, and behavior**, v. 93, n. 4, p. 368-374, 2009.
